

50376  
1993  
334

50376  
1993  
334

THESE

présentée à l'université de Lille 1

N° d'ordre 1083

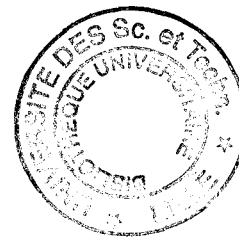
pour obtenir

Le titre de DOCTEUR de l'UNIVERSITE de LILLE 1

mention: Sciences de la Vie et de la Santé  
Option: Neuroendocrinologie

par

**Eric MAUBERT**



**NEUROPEPTIDE Y, AUTRES NEUROPEPTIDES ET  
CATECHOLAMINES DANS LA GLANDE SURRENALE DU RAT**

**Soutenue le 17 décembre 1993 devant la commission d'examen:**

Président:	J.P.DUPOUY	Professeur, Université de Lille 1
Rapporteurs:	J.C.BEAUPELLAIN	Directeur de Recherches INSERM, Lille 2
	J. EPELBAUM	Directeur de Recherches INSERM, Paris
	G. TRAMU	Professeur, Université de Bordeaux 1
Examineurs:	F. BERNET	Professeur, Université de Lille 1
	A. DHAINAUT	Professeur, Université de Lille 1

A mes parents,  
A ma sœur,  
A l'ensemble de ma famille.



J'exprime tous mes remerciements,

A Monsieur le Professeur J.P. DUPOUY,

Recevez ici l'expression de ma plus grande gratitude pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire pendant ces années de DEA et de thèse. Vous avez largement contribué à la réalisation de ce travail en me prodiguant conseils et soutien. Je rends hommage à votre patience, à l'excellent enseignement que vous m'avez dispensé ainsi qu'à vos qualités scientifiques et humaines. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur G. TRAMU,

Vous avez suscité et permis la réalisation d'une partie de mes travaux. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde admiration et ma sincère gratitude. Je vous remercie de me faire l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur le Docteur J. EPELBAUM,

Vous m'avez fait l'honneur de vous intéresser à mes recherches. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir, malgré vos lourdes charges scientifiques, accepté de juger cette thèse bien qu'elle n'intègre que partiellement les résultats prometteurs obtenus au cours d'une expérimentation commune.

A Monsieur le Docteur J.C. BEAUVILLAIN,

Avec votre équipe, vous m'avez initié aux techniques d'hybridation *in situ* et intéressé aux techniques immunocytochimiques. Votre expérience dans le domaine de la neuroendocrinologie, vos conseils et vos encouragements font que je vous en suis très reconnaissant et vous sais gré d'avoir accepté de juger les travaux présentés dans ce mémoire.

A Monsieur le Professeur F. BERNET,

Dans le domaine de l'enseignement et de la recherche, je ne saurais oublier combien, par vos conseils, vos explications, vos encouragements, votre disponibilité et vos qualités humaines, vous avez activement collaboré à l'aboutissement de cette thèse et à ma formation d'enseignant-chercheur.

A Monsieur le Professeur A DHAINAUT,

Soyez assuré de ma profonde gratitude pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

A tous les membres du Laboratoire de Neuroendocrinologie du Développement qui par leur disponibilité, sympathie, enthousiasme et constant soutien ont permis mon intégration au sein du laboratoire et favorisé mes activités d'enseignement et de recherche.

Au Professeur A. CHATELAIN, aux Docteurs S. DELOOF et C. Laborie (enseignants chercheurs).

A V. MONTEL, F. LEFEVRE, J. BERNARD et C. GUICHARD, dont l'assistance technique a largement favorisé la réalisation de ce mémoire.

A Monsieur le Professeur M. MAZZUCA,  
L'accueil au sein de son Unité INSERM, ses témoignages de confiance m'ont aidé et ont largement contribué à la réalisation de cette thèse. Qu'il soit assuré de ma plus profonde gratitude.

Au Docteur P. CIOFI,  
Je lui dois beaucoup pour ses conseils, sa disponibilité et son humour. J'ai aussi beaucoup apprécié ses qualités scientifiques.

Aux Docteurs V. MITCHELL et D. CROIX, à Madame D. DENEUX et à Monsieur A. PILLEZ pour leur participation à ma formation ainsi que pour leur accueil sympathique qui ont favorisé mon séjour dans l'U.156 de l'INSERM.

Aux étudiants et techniciens de l'U.156 de l'INSERM, qu'ils veuillent accepter mes excuses de pas être nommément cités.

Aux membres de l'Unité 159 de l'INSERM, et plus particulièrement au Docteur A. SLAMA qui a largement participé à la réalisation des travaux concernant l'étude des sites de liaison de la somatostatine. Que soient également remerciés Madame C. VIDEAU, C. GRENET et P. DOURNAUD qui, par leur sympathie, ont favorisé mes séjours dans ce laboratoire parisien.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Madame le Professeur LECOMTE-HOUCKE pour l'intérêt qu'elle a porté à mes travaux et les collaborations que nous avons entreprises.

Enfin, je remercie le Professeur P. DELORME, et tous les membres du laboratoire dirigé par le Professeur P. GUILBAULT qui ont largement contribué à mon intégration dans l'équipe d'enseignants de Physiologie à l'Université de Lille I.



# SOMMAIRE

# SOMMAIRE

<b>CHAPITRE 1</b> : Distribution de messagers chimiques dans la surrénale du rat adulte et au cours du développement embryonnaire. Caractérisation des dérivés sympathosurrénaliens	p 1
<b>SOMMAIRE chapitre 1</b>	p 2
<b>I - INTRODUCTION</b>	p 5
A - La médullosurrénale	p 8
1°) Les types cellulaires de l'adulte	p 8
2°) Les messagers biologiques des cellules médullosurrénaliennes	—
3°) L'innervation médullosurrénalienne	p 15
4°) Ontogenèse de la médullosurrénale	p 17
B - La corticosurrénale	p 26
1°) Cellules stéroïdogéniques et hormones stéroïdiennes	p 26
2°) L'innervation corticale	p 30
3°) Ontogenèse du cortex surrénalien	p 32
<b>II - MATERIEL ET METHODES</b>	p 35
A - Techniques d'immunohistochimie	p 35
1°) Les animaux	p 35
2°) Traitements des organes et tissus	p 36
3°) Les immunsérums	p 37
4°) Réactions immunohistochimiques	p 39
5°) Spécificité de la réaction immunohistologique	p 41
6°) Techniques immunohistologiques de mise en évidence de plusieurs antigènes tissulaires sur une même coupe	p 43
7°) Réaction histochimique de deshydrogénation	p 44
B - Techniques d'hybridation <i>in situ</i>	p 45
1°) Détection des ARN messagers codant pour le NPY	p 45
2°) Marquage de la sonde	p 45
3°) Hybridation sur coupes histologiques	p 47
<b>III- RESULTATS</b>	p 50

A - Localisation de neuropeptides et d'amines biogènes dans la glande surrénale de l'adulte	p 50
1°) Les cellules chromaffines	p 50
2°) Les neurones ganglionnaires intramédullaires	p 54
3°) L'innervation surrénalienne	p 55
4°) Révélation histochimique d'une activité NADPH-diaphorase	p 59
 B - Ontogenèse de la lignée sympathosurrénalienne et ontogenèse surrénalienne au cours du développement embryonnaire	p 60
1°) Chaîne paravertébrale et plexus prévertébraux	p 60
2°) Ontogenèse surrénalienne	p 65
 <b>IV - DISCUSSION</b>	p 72
 <b><u>CHAPITRE 2</u> : Effets de la démyélinisation surrénalienne <i>in vivo</i> sur les catécholamines et le NPY de la zone capsulo-glomérulaire</b>	p 122
 <b><u>SOMMAIRE chapitre 2</u></b>	p 123
<b>I - INTRODUCTION</b>	p 124
<b>II - MATERIEL ET METHODES</b>	p 126
A - Animaux	p 126
B - Expériences de démyélinisation	p 126
C - Dosages des catécholamines, du NPY, de la corticostérone et de l'aldostérone	p 126
1°) Catécholamines	—
2°) NPY	p 127
3°) Corticostérone	p 128
4°) Aldostérone	p 130
 <b>III - RESULTATS</b>	p 132
A - Stéroïdes surrénaliens et plasmatiques	p 132
B - Catécholamines (CA) surrénaliennes et plasmatiques	p 132
1°) Effets de la démyélinisation unilatérale	—
2°) Effets de la démyélinisation bilatérale	p 133
C - NPY surrénalien	p 134
 <b>IV - DISCUSSION</b>	p 135

## **CHAPITRE 3 : Récepteurs surrenaliens au NPY.**

Effets stéroïdogéniques du NPY, du PYY et du VIP sur la zone capsulo-glomérulaire

p 139

### **SOMMAIRE chapitre 3**

p 140

#### **I - INTRODUCTION**

p 141

#### **II - MATERIEL ET METHODES**

p 145

A - Animaux

p 145

B - Prélèvement des zones capsulo-glomérulaires et  
préparation des membranes pour les études de liaison

p 145

1°) Prélèvements

—

2°) Préparation des membranes surrenaliennes

—

3°) Liaison du NPY aux membranes

p 146

C - Incubations et périfusions de zones capsulo-  
glomérulaires intactes

p 147

1°) Incubations statiques

p 147

2°) Périfusions

p 148

D - Incubation de cellules capsulo-glomérulaires isolées

p 149

1°) Isolement des cellules par la collagénase et la  
DNase

p 149

2°) Incubation des cellules isolées

—

3°) Dosage de l'aldostérone

p 150

#### **III - RESULTATS**

p 151

A - Sites de liaison membranaire du NPY dans la zone  
capsulo-glomérulaire

p 151

B - Effets du VIP, du NPY et du PYY sur la sécrétion  
d'aldostérone

p 152

1°) Incubation statique de zones  
capsulo-glomérulaires

p 152

2°) Périfusion de zones capsulo-glomérulaires

—

3°) Incubation statique de cellules isolées

p 153

C - Effets du VIP, du NPY et du PYY sur la sécrétion de  
corticostérone

p 153

#### **IV - DISCUSSION**

p 154

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

p 159

### **RESUME**

p 178



# CHAPITRE I

## **Chapitre 1**

**Distribution de messagers chimiques dans la  
surrénale du rat adulte et au cours du  
développement embryonnaire.**

**Caractérisation des dérivés sympathosurrénaliens.**



## Chapitre 1

### Distribution de messagers chimiques dans la surrénale du rat adulte et au cours du développement embryonnaire.

#### Caractérisation des dérivés sympathosurréaliens.

<b>I - INTRODUCTION</b>		p 5
<b>A - La médullosurrénale</b>		p 8
1°) Les types cellulaires de l'adulte		
2°) Les messagers biologiques des cellules médullo surréaliennes		—
a) Amines biogènes		p 9
b) Neuropeptides		p 10
<i>Neuropeptide Y</i>		
<i>Peptides opioïdes</i>		p 11
<i>CGRP</i>		p 12
<i>Galanine (GAL)</i>		—
<i>Neurotensine (NT)</i>		p 13
<i>Polypeptide intestinal vasoactif (VIP)</i>		
<i>Substance P (SP)</i>		p 14
<i>Somatostatine (SRIF)</i>		—
<i>Arginine vasopressine (AVP) et</i> <i>ocytocine (OT)</i>		p 15
<i>Corticolibérine (CRF) et</i> <i>corticostimuline (ACTH)</i>		—
3°) L'innervation médullosurrénalienne		p 15
4°) Ontogenèse de la médullosurrénale		p 17
a) Ontogenèse de la lignée sympathosurrénalienne		p 18
b) Colonisation surrénalienne		p 21
c) Apparition des messagers chimiques dans les cellules médullosurréaliennes		p 23
c1) Les amines biogènes		—
c2) Les neuropeptides médullosurréaliens		p 24
c3) Ontogenèse de l'innervation médullo- surrénalienne		p 25
<b>B - La corticosurrénale</b>		p 26
1°) Cellules stéroïdogéniques et hormones stéroïdiennes		p 26
a) Zone glomérulée (ZG)		p 27
b) Zones fasciculée et réticulée		p 29
2°) L'innervation corticale		p 30
a) Innervation catécholaminergique		p 30

b) Innervation peptidergique	p 31
c) Innervation cholinergique	p 32
3°) Ontogénèse du cortex surrénalien	p 32

## II - MATERIEL ET METHODES p 35

A - Techniques d'immunohistochimie	p 35
1°) Les animaux	p 35
a) Les adultes	—
b) Les foetus	—
c) Les nouveau-nés	—
2°) Traitements des organes et tissus	p 36
a) Le fixateur	—
b) Perfusion/Immersion	—
c) Inclusion	p 37
d) Coupes	—
3°) Les immunosérums	p 37
4°) Réactions immunohistochimiques	p 39
a) Application du sérum spécifique	—
b) Application du sérum marqué	—
b1) Marqueur enzymatique	—
b2) Marqueurs fluorescents	p 40
5°) Spécificité de la réaction immunohistologique	p 41
a) Spécificité des immunosérums	p 42
b) Spécificité des composés marqués	—
c) Vérification de l'absence de peroxydase et de fluorescence endogènes	—
6°) Techniques immunohistologiques de mise en évidence de plusieurs antigènes tissulaires sur une même coupe	p 43
a) Technique d'élution	—
b) Technique du double marquage en immunofluorescence	p 44
7°) Réaction histochimique de deshydrogénation	p 44
B - Techniques d'hybridation <i>in situ</i>	p 45
1°) Détection des ARN messagers codant pour le NPY	p 45
2°) Marquage de la sonde	p 45
a) Protocole de marquage de la sonde	p 46
b) Purification de la sonde marquée	—
3°) Hybridation sur coupes histologiques	p 47
a) Fixation et congélation des coupes	—
b) Préhybridation	—
c) Hybridation	p 48
d) Lavages	—
e) Radioautographie en microscopie électronique	p 49

<b>III- RESULTATS</b>	p 50
<b>A - Localisation de neuropeptides et d'amines biogènes dans la glande surrénale de l'adulte</b>	p 50
1°) Les cellules chromaffines	p 50
a) Les amines biogènes des cellules chromaffines	p 51
b) Les neuropeptides des cellules chromaffines	p 51
b1) NPY et Met-enképhaline-Arg <sup>6</sup> -Gly <sup>7</sup> -Leu <sup>8</sup>	
b2) NPY et neurotensine (NT)	p 52
b3) NPY et CGRP	—
b4) NPY et galanine (GAL)	p 53
b5) NPY et substance P (SP)	—
b6) NPY et autres neuropeptides	—
2°) Les neurones ganglionnaires intramédullaires	p 54
3°) L'innervation surrénalienne	p 55
a) Innervation de la corticosurrénale	—
b) Innervation de la médullosurrénale	p 57
4°) Révélation histochimique d'une activité NADPH-diaphorase	p 59
<b>B - Ontogenèse de la lignée sympathosurrénalienne et ontogenèse surrénalienne au cours du développement embryonnaire</b>	p 60
1°) Chaîne paravertébrale et plexus prévertébraux	p 60
2°) Ontogenèse surrénalienne	p 65
a) Colonisation surrénalienne	—
b) Cellules chromaffines et activité NADPH-diaphorase	p 66
c) Neurones intra- ou péricurrénaliens	p 69
d) Innervation surrénalienne	p 70
<b>IV - DISCUSSION</b>	p 72
Distribution de messagers chimiques dans la surrénale du rat adulte	p 72
Distribution de messagers chimiques dans la surrénale au cours du développement embryonnaire. Caractérisation des dérivés sympathosurrénaliens	p 93

## I - INTRODUCTION

Au début du dix-septième siècle, SPIGELIUS et HIGHMORE n'imaginaient pas d'autre fonction pour la surrénale que l'occupation de l'espace libre autour des reins (revue in TISCHLER et DeLELLIS, 1988).

Nous savons aujourd'hui que les fonctions de la surrénale sont multiples et qu'elle est notamment impliquée dans les manifestations physiologiques accompagnant divers types de stress (revue in BRESLOW, 1992) tout comme dans le contrôle, vital pour l'organisme, de l'équilibre hydrominéral.

La glande surrénale des mammifères est constituée de deux tissus endocrines distincts par leurs origines et leurs fonctions : la **corticosurrénale** à la périphérie et la **médullosurrénale** au centre ; l'ensemble est entouré d'une capsule conjonctive externe (Figure 1-1).

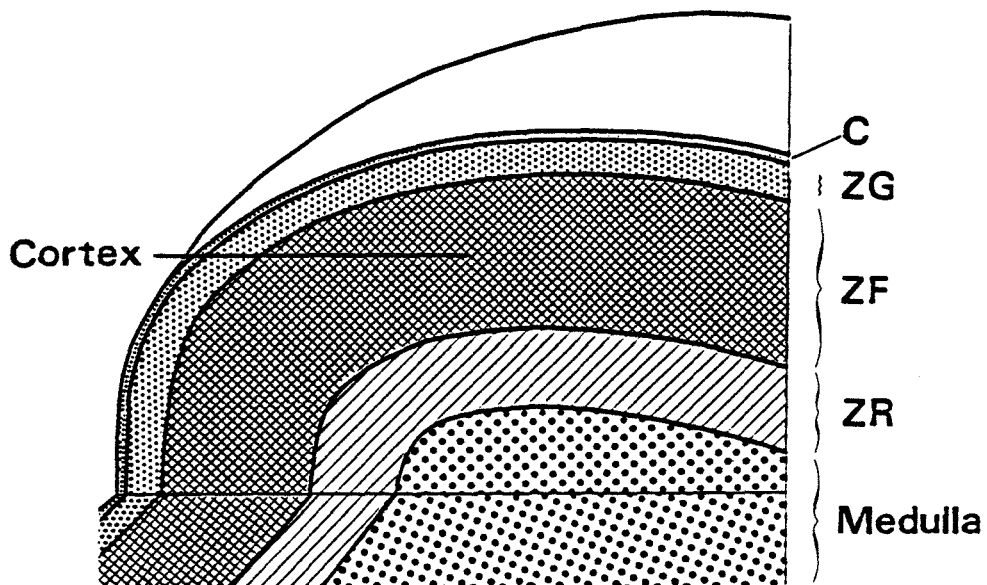


Figure 1-1 :

Représentation schématique d'une glande surrénale de mammifère. Le cortex surrénalien, périphérique, et la médullosurrénale (Médulla), centrale, sont entourés par une capsule fibreuse (C). Le cortex est subdivisé en trois grandes zones qui sont, de la périphérie vers le centre, la zone glomérulée (ZG), la zone fasciculée (ZF) et la zone réticulée (ZR).

Les cellules de la **médullosurrénale** ont une origine ectodermique. Bien avant la naissance, durant l'ontogenèse surrénalienne, des cellules de la lignée sympathosurrénalienne (LSS) colonisent le cortex fœtal pour former cette partie de la surrénale. Chez l'adulte, les cellules les plus nombreuses de la médullosurrénale sont les cellules chromaffines qui synthétisent et libèrent dans le sang des catécholamines (adrénaline et noradrénaline).

Les cellules de la **corticosurrénale** dérivent du mésoderme (revue in TISCHLER et DeLELLIS, 1988). Organisées de l'extérieur vers l'intérieur en zones glomérulée, fasciculée et réticulée (Figure 1-1), elles constituent le tissu stéroïdien car elles synthétisent des hormones dérivées du cholestérol (aldostérone, corticostérone (rat), cortisol (homme) et androgènes).

Il était admis jusqu'à ces dernières années que l'activité des cellules du tissu stéroïdien et du tissu chromaffine était contrôlée par des facteurs distincts (revue in CHARLTON, 1990). Les cellules chromaffines, qui ont été assimilées à des cellules sympathiques "post-ganglionnaires", reçoivent une innervation cholinergique préganglionnaire, aussi leur activité est-elle principalement contrôlée par des facteurs nerveux. Les cellules corticales, quant à elles, semblaient contrôlées essentiellement par des facteurs hormonaux ; néanmoins des études plus récentes suggèrent de surcroît un contrôle nerveux de l'activité stéroïdogénique (HOLZSWARTH et coll., 1987 ; CHARLTON, 1990).

De nombreuses études neuroanatomiques ont cherché à localiser l'origine des fibres nerveuses innervant la surrénale. Chez le rat, les corps cellulaires des neurones à l'origine des fibres cholinergiques préganglionnaires sont situés dans la colonne intermédiolatérale de la moelle épinière, entre les segments thoracique T1 et lombaire L1 (la grande majorité des corps cellulaires est présente autour des segments T8/T9) (SCHRAMM et coll., 1975 ; KESSE et coll., 1988). En plus de cette innervation surrénalienne préganglionnaire, il existe une innervation postganglionnaire dont l'origine n'est pas clairement élucidée. Une étude récente rapporte en effet l'existence de corps cellulaires marqués par voie rétrograde après injection de traceur dans la surrénale, au niveau de la chaîne paravertébrale et du ganglion suprarénal, mais pas dans le plexus cœliaque (KESSE et coll., 1988). Par opposition, d'autres études similaires rapportent la présence de corps cellulaires dans le ganglion cœliaque (PELTO-HUIKKO, 1989). Chez le rat, ce ganglion serait pair pour certains auteurs et impair pour d'autres (revue in BALJET et DRUKKER,

1979). Pour CHEVENDRA et WEAVER, (1992), les ganglions cœliaques pourraient fusionner avec le ganglion mésentérique supérieur pour constituer le plexus solaire. La distribution des ganglions prévertébraux est très ambiguë et il n'existe actuellement aucune description claire les concernant. De rares études neuroanatomiques ont été menées soit chez le rat mâle, soit chez la femelle, et l'organisation de ces ganglions paraît présenter un dimorphisme sexuel (revue in BALJET et DRUKKER, 1979). Par ailleurs, il semble exister d'importantes variations inter-individuelles pour un même sexe (BALJET et DRUKKER, 1979 ; NIEL et JULE, 1990). L'existence d'une innervation sensitive provenant du ganglion noueux (un ganglion sensitif du nerf vague) a été rapportée récemment chez le rat et le cobaye (COUPLAND et coll., 1989). La glande surrénale serait également innervée par des fibres sensibles provenant des ganglions spinaux (revue in TOMLINSON et COUPLAND, 1990). En plus de ces facteurs nerveux, des facteurs hormonaux interviendraient dans le contrôle de l'activité surrénalienne. Cortico- et médullosurrénale pourraient posséder une vascularisation indépendante (Figure. 1-2). Chaque système vasculaire serait soumis à une régulation par des stimuli spécifiques (BRESLOW, 1992). L'existence d'un système porte reliant cortex et médullosurrénale a été postulée par WURTMAN (1966), mais n'a jamais été confirmée (COUPLAND et SELBY, 1976 ; BRESLOW, 1992).

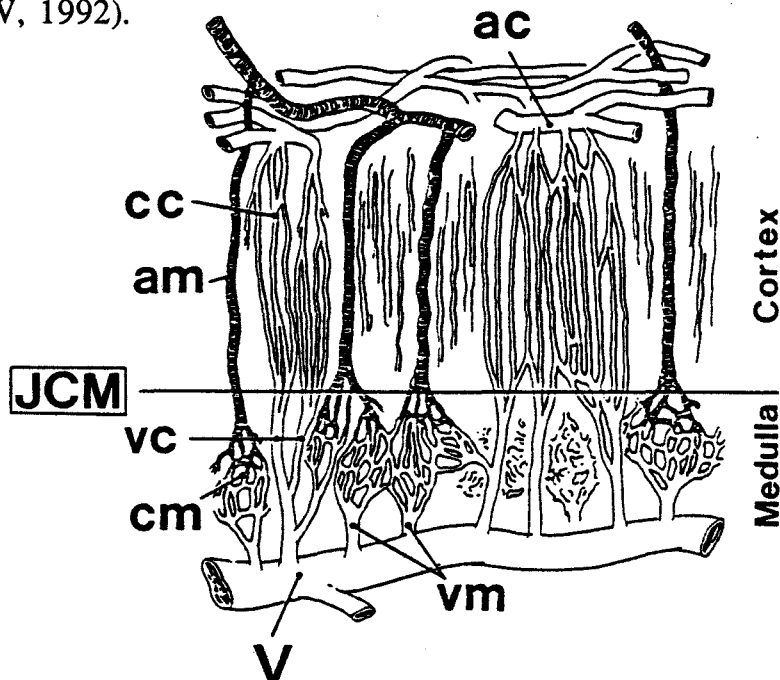


Figure 1-2 : Représentation schématique de la vascularisation surrénalienne d'après BRESLOW (1992).

La vascularisation corticale et médullaire se fait par des artérioles et des capillaires spécifiques. Au niveau de la jonction cortico-médullaire (JCM), les capillaires corticaux deviennent des veines qui se projettent, avec les veines médullaires (vm), dans la veine centrale (V).

ca : artère corticale ; am : artère médullaire ; cc : capillaire cortical ; cm : capillaire médullaire ; cv : veine corticale ; vm : veine médullaire et V : veine centrale.

## A - La médullosurrénale

### 1°) Les types cellulaires de l'adulte

Chez l'adulte, la médullosurrénale est schématiquement constituée de deux grands types cellulaires : *les cellules chromaffines* (majoritaires) et *les neurones ganglionnaires*. On observe également des cellules catécholaminergiques dont la morphologie est intermédiaire entre cellules chromaffines et neurones ganglionnaires. Leur taille est comparable à celle des cellules chromaffines classiques mais elles en diffèrent par des granules de sécrétion plus petits et l'existence de courts prolongements (revue in TISCHLER et DeLELLIS, 1988). Ces cellules, nommées cellules SGC (*Small Granule-Containing Cells*), ne représentent que 1% des cellules chromaffines (TISCHLER et DeLELLIS, 1988). Des cellules ayant des caractéristiques communes avec les cellules gliales sont également associées au tissu chromaffine. Ces dernières ont été diversement nommées : *cellules de support*, *cellules sustentaculaires*, *cellules satellites* ou encore *cellules de Schwann* (KACHI et coll., 1993). Ces cellules établiraient davantage de contacts avec les neurones et les cellules chromaffines noradrénergiques qu'avec les cellules adrénérgiques (KACHI et coll., 1993).

### 2°) Les messagers biologiques des cellules médullosurrénaliennes

Chez les mammifères, plus de vingt neuropeptides différents ont été mis en évidence dans les cellules chromaffines. Des molécules biologiquement actives ont été colocalisées dans les mêmes granules chromaffines, comme par exemple le CGRP (*Calcitonin gene related peptide*), le NPY (Neuropeptide Y) et l'adrénaline (LASLOP et coll., 1989). La sécrétion de ces messagers biologiques à partir des granules peut être induite par stimulation des fibres préganglionnaires du nerf splanchnique. Ces messagers sont libérés dans l'espace extracellulaire et leur action pourrait s'exercer sur la cellule chromaffine dont ils proviennent (sécrétion de type autocrine), sur les cellules voisines (sécrétion de type paracrine) ou sur des cellules encore plus éloignées atteintes après leur passage dans la circulation (sécrétion de type endocrine). De nombreuses études suggèrent un rôle paracrine et/ou endocrine de ces messagers médullosurrénaliens sur le cortex de la



surrénale (revue in MALENDOWICZ, 1993). Les messagers biologiques de la médullosurrénale peuvent être classés en deux grandes catégories : les amines biogènes et les neuropeptides. Des molécules associées aux granules de sécrétion, telles que les chromogranines, pourraient également être libérées avec ces substances actives (HOFLE et coll., 1991). Les fonctions des chromogranines restent en partie énigmatiques, mais certaines études suggèrent qu'elles pourraient être des précurseurs de peptides biologiquement actifs (revue in HANSEN et coll., 1992).

### a) Amines biogènes

Les cellules chromaffines sont catécholaminergiques. Elles synthétisent toutes de la dopamine et de la noradrénaline ; la majorité d'entre elles possèdent de la PNMT (Phényléthanolamine N-méthyl transférase) et synthétisent de l'adrénaline (Figure. 1-3).

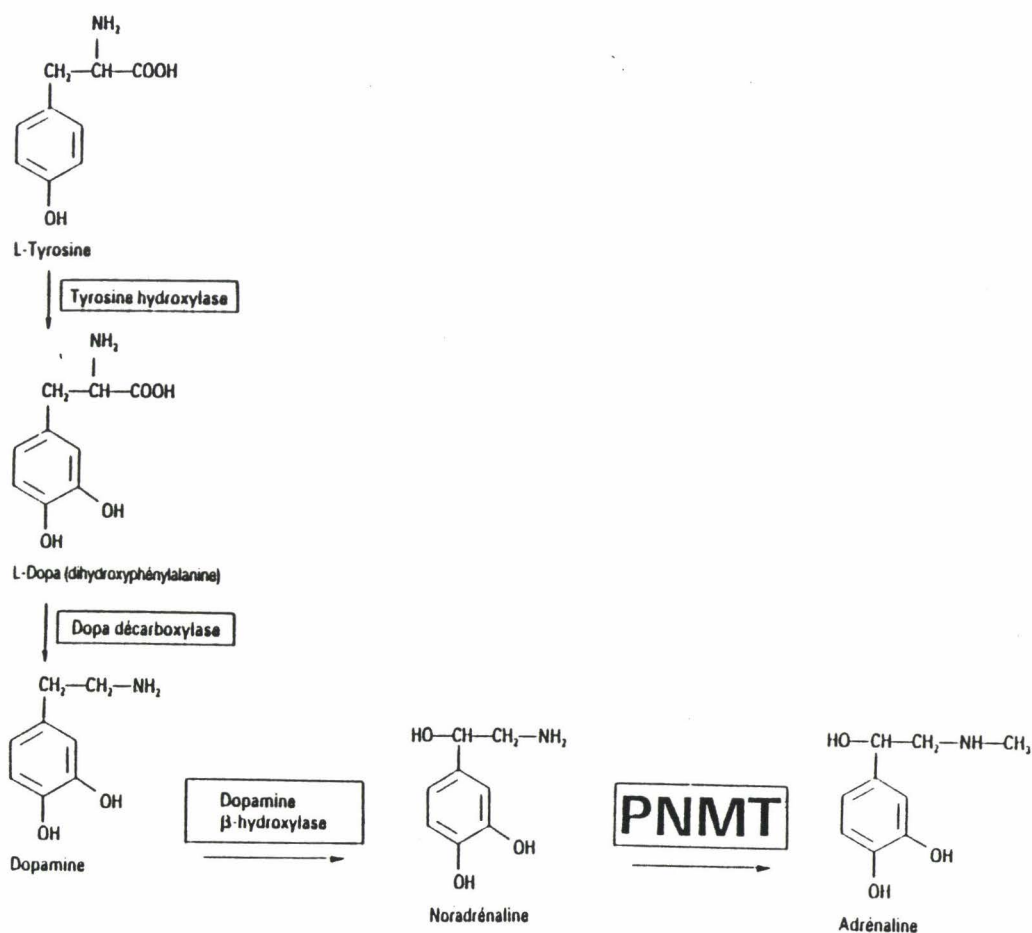


Figure 1-3 :

Voie de biosynthèse des catécholamines

PNMT : Phényléthanolamine N-méthyl transférase.



Ainsi, la présence ou l'absence de PNMT permet-elle de distinguer les cellules chromaffines adrénérgiques (A) qui synthétisent l'adrénaline, des cellules typiquement noradrénérgiques (NA) qui contiennent de la noradrénaline mais sont dépourvues de PNMT donc d'adrénaline. Chez le rat adulte, ces dernières représentent environ 20% des cellules chromaffines (revue in TISCHLER et DeLELLIS, 1988). Il existe cependant des différences interspécifiques quant à la nature des cellules chromaffines de l'adulte. C'est ainsi que chez le cobaye et le lapin, toutes les cellules sont adrénérgiques (revues in PELTO-HUIKKO, 1989 ; JOUSSELIN-HOSAJA et DERBIN, 1993).

Dans les neurones ganglionnaires, le phénotype catécholaminérgique ne serait pas exprimé (SCHALLING et coll., 1988b ; OOMORI et coll., 1989 ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990). Toutefois, DAGERLIND et coll. (1990) et OOMORI et coll. (1991) rapportent, chez le rat, la présence d'enzymes de synthèse des catécholamines dans des neurones ganglionnaires.

D'autres amines biogènes ont été détectées dans les cellules chromaffines. Chez le rat, la sérotonine (5-HT) est présente dans les cellules chromaffines adrénérgiques (VERHOFSTAD et JONSSON, 1983 ; HOLZWARTH et coll., 1984 ; HOLZWARTH et SAWETAWAN, 1985) alors que l'histamine ne serait présente que dans les cellules noradrénérgiques (HAPPÖLA et coll., 1985). Il n'est pas clairement établi si ces amines sont synthétisées dans ces cellules ou accumulées grâce à un mécanisme de capture spécifique (revue in TISCHLER, 1989).

### **b) Neuropeptides**

Nous rappellerons ici de manière non exhaustive quels sont les principaux neuropeptides présents dans les cellules médullosurrénaliennes des mammifères. Nous focaliserons surtout notre attention sur les travaux réalisés chez le rat, modèle expérimental étudié dans notre laboratoire et sur les neuropeptides dont nous avons étudié la distribution.

#### **Le neuropeptide Y (NPY)**

Le neuropeptide Y est un neuropeptide de 36 acides aminés très largement distribué dans le système nerveux central et périphérique (revue in TATEMOTO, 1989). Dans la glande surrénale, les études immunohistochimiques ne sont pas univoques. Le NPY a été décrit associé spécifiquement aux cellules chromaffines adrénérgiques du rat

(KURAMOTO et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990) ou au contraire, aux cellules noradrénergiques chez le rat ou d'autres espèces de mammifères (VARNDELL et coll., 1984) et chez le bœuf (MAJANE et coll., 1985). Chez le rat, SCHALLING et coll. (1988b) ont signalé qu'il pouvait être présent dans les deux types de cellules chromaffines (adrénergiques et noradrénergiques). Selon les auteurs, la proportion de cellules chromaffines NPYergiques peut être de moins de 50% (HENION et LANDIS, 1990) ou bien plus élevée (SCHALLING et coll., 1988b). La détection des ARN messagers (ARNm) codant pour le NPY a permis d'établir que ce peptide est synthétisé non seulement dans les cellules chromaffines mais aussi dans des neurones intramédullaires (SCHALLING et coll., 1988a et b, 1991 ; DAGERLIND et coll., 1990). L'existence de ces neurones NPYergiques n'a été révélée que récemment (SCHALLING et coll., 1988b ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990). Pour ces auteurs, ces neurones auraient une origine parasymphatique puisqu'ils ne seraient pas de nature catécholaminergique. Néanmoins, DAGERLIND et coll. (1990) ont détecté la présence d'ARNm codant pour la dopamine  $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H) et une immunoréactivité anti-TH dans ces neurones considérés comme des neurones postganglionnaires sympathiques. Les divergences des données de la littérature concernant la distribution intracellulaire du neuropeptide Y justifient une nouvelle investigation.

### Peptides opioïdes

La présence de peptides opioïdes a été maintes fois signalée dans la surrenale des mammifères mais d'importantes différences interspécifiques existent concernant leur distribution (SCHULTZBERG et coll., 1978 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Il existe trois familles de précurseurs de peptides opioïdes : la prépro-énképhaline A (ppENK A) contient en plusieurs exemplaires la séquence en acides aminés de la Méthionine-énképhaline (Met-ENK) et en exemplaire unique celle de la Leucine-énképhaline (Leu-ENK) (ZAMIR et coll., 1984) ; la prépro-opiomélanocortine (pPOMC) renferme la Met-ENK (J. HUGHES cité in JP. DUPOUY, 1993) et on retrouve la Leu-ENK dans la prépro-Dynorphine ou prépro-énképhaline B (ppDYN) (ZAMIR et coll., 1984). Chez le rat, des ARNm codant pour la ppENK A ont été mis en évidence dans les cellules chromaffines ; il est donc vraisemblable que les peptides opioïdes détectés par immunohistologie proviennent d'un clivage de la ppENK A (BLOCH et coll., 1986). La majorité des auteurs rapporte que, chez le rat,

les cellules chromaffines immunoréactives pour les peptides opioïdes sont absentes ou peu nombreuses (SCHULTZBERG et coll., 1978 ; BOHN et coll., 1983 ; BLOCH et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990 et 1992). Cependant, selon KONDO et coll. (1984) et KONDO (1985), près d'un quart des cellules chromaffines seraient enképhalinergiques. Néanmoins, des cellules non marquées contiendraient des ARNm de la ppENKA (BLOCH et coll., 1986). Les enképhalines paraissent spécifiquement associées aux cellules noradrénergiques chez le rat normal mais sont présentes aussi bien dans les cellules adrénérgiques que noradrénergiques après splanchnectomie (SCHULTZBERG et coll., 1978). A l'inverse, chez le rat normal, HENION et LANDIS (1990) rapportent la présence d'enképhalines dans 10% de cellules chromaffines adrénérgiques. KONDO (1985), pour qui plus de 20% des cellules sont immunoréactives, rapporte une localisation aussi bien dans les cellules adrénérgiques que dans les cellules noradrénergiques.

### **CGRP**

Le CGRP ou "*calcitonin gene related peptide*" est un peptide de 37 acides aminés dont la découverte repose sur des études de biologie moléculaire relatives au gène de la calcitonine (revue in KURAMOTO et coll., 1987). Le CGRP est très largement distribué dans le système nerveux central et périphérique (revue in HÖKFELT et coll., 1992). Dans la glande surrénale, les données immunohistochimiques révèlent la présence de ce peptide dans de rares cellules adrénérgiques (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1987 ; PELTO-HUIKKO, 1989) qui seraient par ailleurs NPYergiques (KURAMOTO et coll., 1987). Cette localisation du CGRP dans des cellules adrénérgiques a été confirmée à l'échelle ultrastructurale (LASLOP et coll., 1989 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Les cellules CGRP(+) ne représenteraient pas plus de 1% des cellules chromaffines et seraient dépourvues d'enképhalines (KURAMOTO et coll., 1987 ; PELTO-HUIKKO, 1989).

### **Galanine (GAL)**

La galanine est un peptide de 29 acides aminés, initialement isolé de l'intestin de porc mais également exprimé dans le système nerveux central et périphérique (revue in ZENTEL et coll., 1990). La présence de matériel GAL-like a été rapportée dans la médullosurrénale de nombreux mammifères, dont celle de l'homme (BAUER et coll., 1986 ;

PELTO-HUIKKO, 1989 ; HOLST et coll., 1991). Peu de cellules chromaffines GAL(+) ont pu être observées dans la surrenale du rat (PELTO-HUIKKO, 1989) mais une localisation préférentielle de GAL dans des cellules adrénergiques ou noradrénergiques n'a pas été établie. De leur côté, ZENTEL et coll. (1990) rapportent des différences interspécifiques pour ce peptide et signalent que les cellules chromaffines du rat sont dépourvues de GAL. Une colocalisation de GAL et de NPY a été établie dans la surrenale de cobaye (FRIED et coll., 1991).

### Neurotensine (NT)

La neurotensine est un peptide de 13 acides aminés, initialement isolé et caractérisé à partir d'extraits hypothalamiques bovins (revue in GOEDERT et coll., 1983) puis mis ultérieurement en évidence dans bien d'autres organes ou tissus. Chez le rat, 1% seulement des cellules chromaffines adrénergiques contiendrait de la neurotensine mais ces cellules seraient beaucoup plus abondantes après une dénervation de la glande (PELTO-HUIKKO, 1989). Selon TISCHLER et coll. (1991), la NT ne serait pas détectée *in situ* chez le rat, mais elle apparaîtrait *in vitro* lorsque les cellules sont placées dans des milieux de culture particuliers. De plus, le même auteur signale que, dans les espèces où la NT est détectée *in situ*, elle est associée aux cellules noradrénergiques (TISCHLER, 1989 ; TISCHLER et coll., 1991).

### Polypeptide intestinal vasoactif (VIP)

Le polypeptide intestinal vasoactif est un peptide de 28 acides aminés isolé initialement de l'intestin de porc mais retrouvé dans d'autres organes ou tissus, en particulier dans le système nerveux central et périphérique (revue in GOZES et BRENNEMAN, 1989).

KONDO (1985) et KONDO et coll. (1986) rapportent, suite à des observations immunohistologiques, que la surrenale du rat possède des cellules chromaffines et des neurones qui contiennent du VIP. Selon eux, ce neuropeptide serait associé à de rares cellules chromaffines adrénergiques. L'existence de VIP dans la médullosurrenale a été mentionnée chez d'autres espèces, dont l'homme et le bœuf (revue in TSUCHIYA et coll., 1990). Chez le rat, la présence de VIP ne se limiterait pas aux cellules chromaffines puisque des "neurones" en contiennent (HÖKFELT et coll., 1981 ; HOLZWARTH, 1983, 1984 ; KONDO, 1985 ; KONDO et coll., 1986 ; HOLZWARTH et coll., 1987 ; PELTO-HUIKKO, 1989).

HOLZWARTH (1983, 1984), HOLZWARTH et coll. (1987) et HÖKFELT et coll. (1981) ne signalent pas l'existence de cellules chromaffines VIP(+). Les observations de ces auteurs diffèrent quant à la taille des "neurones" ganglionnaires immunoréactifs ; pour deux groupes d'auteurs, ces neurones auraient un diamètre de l'ordre de 25 à 50  $\mu\text{m}$  (HÖKFELT et coll., 1981 ; KONDO, 1985 ; KONDO et coll., 1986), pour PELTO-HUIKKO (1989), il serait de 15 à 25  $\mu\text{m}$  alors que pour HOLZWARTH (1983, 1984), le diamètre serait inférieur à celui des cellules chromaffines. On peut néanmoins signaler que ces "neurones" surrénaliens n'ont été observés, la plupart du temps, qu'à la suite de traitements physiques (dénervation) ou chimiques (colchicine) (HOLZWARTH, 1984 ; KONDO, 1985 ; KONDO et coll., 1986). Les neurones VIP(+) seraient, pour de nombreux auteurs, différents des neurones à NPY (SCHALLING et coll., 1988b ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; DAGERLIND et coll., 1990). La recherche du VIP dans les cellules chromaffines et/ou des cellules ganglionnaires du rat mérite une nouvelle investigation plus précise.

### **Substance P (SP)**

La Substance P est un neuropeptide de 11 acides aminés appartenant à la famille des tachykinines (revue in HELKE et coll., 1990). Chez le rat, la présence de SP a reposé initialement sur une détection par dosage radioimmunologique (BUCSICS et coll., 1981). Selon une étude immunohisto et -cytochimique de KURAMOTO et coll. (1985), la SP serait présente dans de rares cellules chromaffines adrénérgiques. Une colocalisation SP/NPY n'a jamais été rapportée.

### **La Somatostatine (SRIF)**

L'existence de somatostatine dans la surrénale de plusieurs espèces (cobaye, chat, bœuf) a été mise en évidence par des techniques biochimiques (SAITO et coll., 1984). Chez l'homme, d'après une étude immunohisto chimique, la somatostatine est présente dans de rares cellules chromaffines (revue in KONDO, 1985). Une étude ultrastructurale, réalisée chez le rat, a montré qu'une immunoréactivité pour la somatostatine peut être détectée dans les cellules chromaffines et des cellules corticales, plus particulièrement au niveau de la zone glomérulée (MOREL et coll., 1990). Dans la mesure où, par hybridation *in situ*, il n'a pas été possible de révéler la présence d'ARNm codant pour la

somatostatine dans les cellules surrenaliennes, ce neuropeptide pourrait ne pas être synthétisé dans ces structures (MOREL et coll., 1990).

### **Arginine vasopressine (AVP) et ocytocine (OT)**

La présence de ces deux hormones neurohypophysaires (AVP et OT) a été mise en évidence par des méthodes biochimiques dans la surrenale fœtale humaine (NICHOLSON et coll., 1984). La présence d'AVP a été signalée dans les cellules chromaffines de rats de souche Long Evans et également, mais en moindre quantité, chez le rat Brattleboro (NUSSEY et coll., 1984) par ailleurs atteint, à l'état homozygote, d'un sévère diabète insipide associé à un déficit d'AVP neurohypophysaire.

### **Corticolibérine (CRF) et corticostimuline (ACTH)**

Chez les mammifères, l'existence d'un système corticotrope intrasurrénalien a été suggérée mais non formellement démontrée chez toutes les espèces (CHARLTON, 1990 ; ANDREIS et coll., 1991, 1992 ; NERI et coll., 1991b). La caractérisation biochimique de la corticolibérine (CRF) surrenalienne a été réalisée chez le chien (BRUHN et coll., 1987), le rat (HASHIMOTO et coll., 1984) et les bovins (MINAMINO et coll., 1988). Chez le rat, *in vivo* comme *in vitro*, le CRF peut stimuler la libération de corticostéroïdes (ANDREIS et coll., 1991, 1992 ; NERI et coll., 1991b). Les auteurs suggèrent que cette stimulation de la fonction stéroïdogénique de la surrenale pourrait impliquer une libération d'ACTH endogène dont l'origine pourrait être les leucocytes surrenaliens et/ou les cellules médullaires puisque ces dernières, tout au moins chez certaines espèces, sont dotées de sites de liaison pour le CRF (DAVE et coll., 1985 ; UDELSMAN et coll., 1986 ; AGUILERA et coll., 1987). Une étude immunohistochimique révèle la présence d'ACTH au cours de l'ontogenèse surrenalienne chez l'homme (ITO et coll., 1981) mais, à notre connaissance, aucune donnée ne plaide en faveur de la présence formelle d'ACTH dans la médullosurrenale du rat. La présence, dans la surrenale, des différentes hormones du système corticotrope reste donc à établir pour cette espèce.

### **3°) L'innervation médullosurrénalienne**

Les cellules chromaffines sont richement innervées. Chez le rat adulte, on a pu dénombrer en moyenne 5 synapses sur chacun des deux

types de cellules chromaffines, avec semble-t-il un nombre de synapses plus important sur les cellules noradrénergiques (TOMLINSON et COUPLAND, 1990). Les moyennes rapportées par ces auteurs sont respectivement de 4,7 synapses par cellule adrénérique et 5,4 par cellule noradrénérique. Sur la base de ces observations morphologiques faites à l'échelle ultrastructurale, plusieurs types de fibres innerveraient ces cellules.

Les neurones ganglionnaires reçoivent également une innervation qui serait principalement de type axo-dendritique ; seules de rares synapses ont été décrites sur les corps cellulaires (TOMLINSON et COUPLAND, 1990).

**L'innervation préganglionnaire cholinergique** de la médullosurrénale est bien établie, mais la présence de messagers chimiques autres que l'acétylcholine a été révélée dans les fibres innervant cette partie de la surrénale. C'est ainsi que la médullosurrénale reçoit un contingent de **fibres enképhalinergiques** plus ou moins abondant selon les auteurs et les espèces étudiées. Chez le rat, les fibres révélées par un immunsérum anti-Met-ENK ne formeraient pas un plexus dense au niveau des cellules chromaffines comme cela a été observé chez le chat (SCHULZTBERG et coll., 1978). Toutefois, avec un immunsérum anti-Met-ENK-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>, KONDO et coll. (1984) et KONDO (1985) ont révélé la présence d'un riche réseau de fibres nerveuses au voisinage des cellules chromaffines. Des études ultrastructurales font état de contacts synaptiques entre fibres enképhalinergiques et cellules chromaffines ou neurones ganglionnaires (KONDO et coll., 1984 ; KONDO, 1985 ; PELTO-HUIKKO, 1989). L'origine extrinsèque de l'innervation médullaire enképhalinergique semble bien établie : ces fibres seraient des fibres cholinergiques préganglionnaires (KONDO, 1985 ; PELTO-HUIKKO, 1989).

Les cellules chromaffines reçoivent également une dense innervation par des fibres qui possèdent l'enzyme de **synthèse des monoxydes d'azote** (NO-synthase), révélée par immunohistochimie (BREDT et coll., 1990 ; AFEWORK et coll., 1992) et histochimie (AFEWORK et coll., 1992). Pour AFEWORK et coll. (1992), cette innervation serait plus dense sur les îlots de cellules noradrénergiques et les fibres pourraient provenir de neurones préganglionnaires, de ceux appartenant au ganglion noueux ou de neurones sensitifs des ganglions spinaux.



La médullosurrénale est également innervée par des **fibres contenant du CGRP** (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1987 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Ces fibres sont de nature sensitive (KONDO, 1985 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Elles innerveraient des cellules chromaffines (KURAMOTO et coll., 1987) et établiraient des contacts avec des neurones ganglionnaires VIPergiques (cependant ces observations publiées n'ont jamais été illustrées) (PELTO-HUIKKO, 1989). D'après l'étude de KURAMOTO et coll. (1987), une sous-population de fibres à CGRP contiendrait également de la SP.

La médullosurrénale reçoit également un petit contingent de **fibres NPYergiques** (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989).

Des fibres possédant les caractéristiques ultrastructurales de **fibres catécholaminergiques** n'ont pas été révélées par TOMLINSON et COUPLAND, (1990). Cependant, des fibres catécholaminergiques, détectées par immunohistochimie, innerveraient des cellules chromaffines ; ces fibres pourraient avoir une double origine (extrinsèque et intrinsèque) (OOMORI et coll., 1991).

Il existe peu d'observations faisant état de **fibres VIPergiques** dans la médullosurrénale. L'essentiel des données de la littérature concerne l'innervation de la zone corticale de la surrénale. Des fibres VIPergiques médullaires ont été signalées mais elles seraient peu abondantes (HÖKFELT et coll., 1981 ; HOLZWARTH, 1984 ; KONDO et coll., 1986). Une étude ultrastructurale a établi l'existence de synapses entre ces fibres et des cellules chromaffines (KONDO et coll., 1986). Les fibres VIPergiques médullosurrénaliennes ne présenteraient pas le même aspect que les fibres de même nature localisées dans le cortex surrénalien (HOLZWARTH, 1984 ; KONDO et coll., 1986). Une origine intrinsèque leur est généralement attribuée (HOLZWARTH, 1983, 1984 ; KONDO et coll., 1986).

De rares **fibres galaninergiques** ont été détectées dans la surrénale du rat (PELTO-HUIKKO, 1989 ; ZENTEL et coll., 1990) ; elles auraient une distribution comparable à celle des fibres à CGRP et à SP (PELTO-HUIKKO, 1989).

#### 4°) Ontogenèse de la médullosurrénale

Toutes les données ontogénétiques rapportées dans ce mémoire tiennent compte des variations qui existent dans la détermination des stades de la gestation. Dans notre étude, plusieurs femelles sont placées une nuit



au contact d'un mâle ; la présence de spermatozoïdes dans les frottis vaginaux le lendemain matin témoigne d'une copulation et d'une éjaculation ; elle indique par convention le 1<sup>er</sup> jour (E 0) de la gestation. Pour d'autres auteurs, ce jour est considéré comme le jour E 1. Chaque fois que cela a été possible (lorsque que les auteurs ont donné des précisions sur la méthode de datation de la gestation), nous avons harmonisé les stades du développement signalés dans la littérature en nous référant à notre propre méthode de datation afin de pouvoir établir des comparaisons fiables.

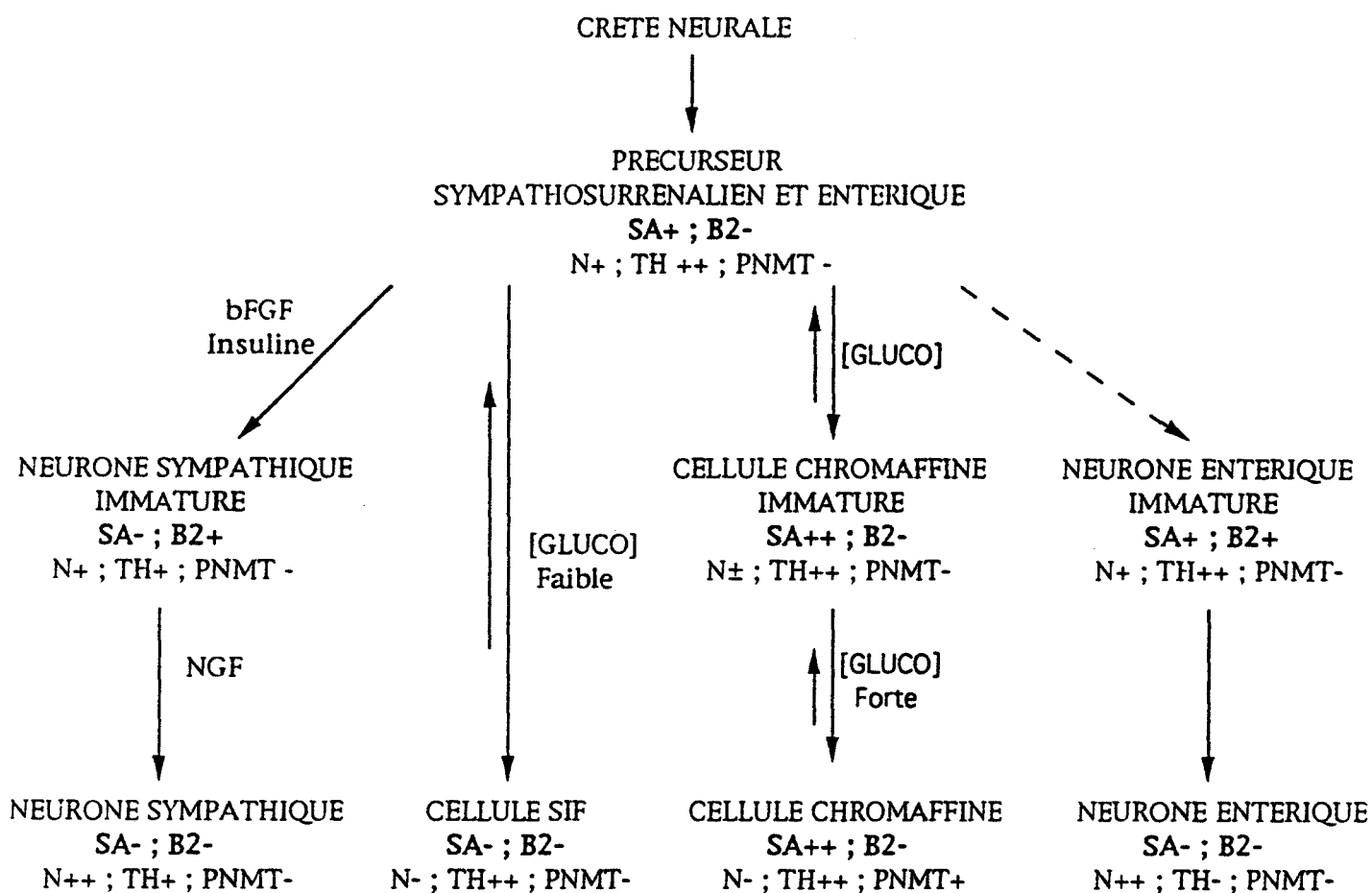
Les cellules de la médullosurrénale ont une origine ectodermique. Elles dérivent plus spécifiquement des cellules de la crête neurale (CN) qui, au cours leur migration, se différencient pour constituer la lignée sympathosurrénalienne (LSS) (revue in ANDERSON, 1991). La CN donne naissance à bien d'autres types cellulaires aussi variés que les neurones sensitifs, les neurones parasymphatiques, des cellules endocrines, les mélanocytes, les cellules de Schwann et, dans le crâne, la majeure partie du squelette et du derme (revues in LE DOUARIN et DUPIN, 1993 ; ANDERSON, 1991). Les facteurs responsables de cette diversité cellulaire ne sont pas parfaitement élucidés ; ils pourraient dépendre non seulement du type cellulaire considéré mais également des facteurs rencontrés au cours de la migration et des divisions cellulaires (LE DOUARIN et DUPIN, 1993).

#### a) Ontogenèse de la lignée sympathosurrénalienne

D'après ANDERSON (1991), les principaux dérivés catécholaminergiques issus de la CN constitueraient la lignée sympathosurrénalienne (LSS). Pour cet auteur, les principaux dérivés de cette lignée sont les cellules SIF (*Small intensely fluorescent cells*), les neurones du système nerveux sympathique et les cellules chromaffines. Ces cellules seraient issues d'un précurseur commun et certains de ces types cellulaires seraient interconvertibles *in vitro* (revues in PATTERSON, 1990 et ANDERSON, 1991, 1993a et b). Les travaux de DOUPE et coll. (1985a et b) ont montré qu'*in vitro*, sous l'effet du facteur de croissance nerveuse (NGF ou *nerve growth factor*), la conversion des cellules chromaffines adultes en sympathoblastes se ferait *via* un intermédiaire ayant les mêmes propriétés que les cellules SIF. L'étude de HALL et LANDIS (1991) suggère que la conversion des cellules SIF en neurones ganglionnaires,

observée *in vitro*, ne peut pas être responsable de la génération des neurones *in vivo*. Selon ces auteurs, le précurseur sympathosurrénalien ne semble pas partager toutes les caractéristiques phénotypiques des cellules SIF de l'adulte. Pourtant, SOINILA et coll. (1988) ont montré que les cellules précurseurs de la LSS étaient initialement sérotoninergiques, comme des cellules SIF de l'adulte (VERHOFSTAD et coll., 1981 ; HAPPÖLA, 1988). Les cellules précurseurs possèderaient initialement les bipotentialités de cellules chromaffines et de neurones ganglionnaires (revues in PATTERSON, 1990 ; ANDERSON, 1991). Les potentialités neuronales du précurseur ont été mises en évidence par ANDERSON et AXEL (1985, 1986) à l'aide d'un marqueur neuronal, le SCG 10. Ils ont étudié la période de colonisation surrénalienne *in vivo* et *in vitro* et établi que les cellules qui pénétraient dans le cortex perdaient leurs caractéristiques neuronales en se différenciant en cellules chromaffines (ANDERSON et AXEL, 1986). L'utilisation récente de nouveaux marqueurs pourrait permettre la caractérisation des cellules de la LSS *in vivo* ou *in vitro* (ANDERSON et coll., 1991 ; CARNAHAN et PATTERSON, 1991a et b ; CARNAHAN et coll., 1991). Certains de ces marqueurs sont des anticorps monoclonaux (SA 1 à 5) dirigés contre des antigènes de membranes de cellules médullosurréaliennes de nouveau-nés de 1 et 3 jours (CARNAHAN et PATTERSON, 1991a). Dans l'étude de ANDERSON et coll. (1991) réalisée *in vivo*, seul le SA1 et un autre anticorps monoclonal, nommé B2, ont été utilisés. Ce dernier marque transitoirement les neurones sympathiques différenciés (CARNAHAN et coll., 1991 ; ANDERSON, 1993a) mais également des cellules de la surrénale embryonnaire qui dégénèreraient par la suite (ANDERSON et AXEL, 1986 ; ANDERSON et coll., 1991). Le SA1 ne marque pas les neurones mais toutes les cellules sympathoprécurseurs, les cellules chromaffines et des cellules particulières par leur "localisation inattendue" ; ces cellules ont été décrites comme des "cellules chromaffines extrasurréaliennes de la région para-aortique" ou encore comme des cellules appartenant au "complexe ganglionnaire extrasurrénalien" (ANDERSON et coll., 1991). En fait, ces cellules SA1 (+) semblent correspondre aux *cellules paraganglionnaires*. Le terme "paraganglion" a été introduit par KOHN (1903) pour décrire de petits organes très vascularisés constitués de cellules étroitement empaquetées qui apparaissent transitoirement au cours du développement (revue in FRIED et coll., 1989). Aujourd'hui, on en distinguerait deux types : un associé au trajet du nerf vague ("*carotide*

*body-like paraganglia*") et un observé dans l'abdomen ("*adrenal medulla-like paraganglia*") (revue in FRIED et coll., 1989). Ces derniers sont également décrits en tant que paraganglions rétropéritonéaux dont le plus important constitue chez le rat l'organe de Zuckerkandl (revue in AHONEN et coll., 1987). Les études récentes utilisant les anticorps monoclonaux anti-SA et anti-B2 ont permis d'établir un schéma de différenciation des cellules de la LSS (Figure 1-4). Ce schéma tient compte des différents marqueurs utilisés pour caractériser les cellules de cette lignée et des facteurs censés influencer leur différenciation.



**Figure 1-4 :**

Représentation des marqueurs utilisés pour caractériser les cellules de la lignée sympathosurrénalienne et les cellules entériques d'après les études d'ANDERSON et coll. (1991), CARNAHAN et coll. (1991) et CARNAHAN et PATTERSON (1991a, b). L'existence d'un précurseur commun pour la LSS et les neurones entériques n'est pas encore parfaitement établie.

N : combinaison de marquages obtenus avec deux marqueurs neuronaux (anti-neurofilament et anti-SCG 10) ; [GLUCO] : concentration en glucocorticoïdes ; NGF : Facteur de croissance du nerf ; bFGF, Facteur de croissance des fibroblastes (forme basique).

D'après ce schéma, les neurones du système nerveux entérique (SNE) appartiendraient également à la LSS (CARNAHAN et coll., 1991). Le SNE est le plus complexe des systèmes constituant le système nerveux périphérique (SNP). Il contient plus de neurones que la moëlle épinière et, contrairement aux autres subdivisions du SNP, il est le siège d'activités réflexes indépendantes d'un contrôle central (revue in GERSHON et coll., 1993). Les cellules entériques sont, au moins en partie, des dérivés de la crête neurale céphalique et/ou sacrée (revue in GERSHON et coll., 1993). Ces cellules ont fait l'objet d'études relatives d'une part à l'apparition du phénotype catécholaminergique, transitoirement exprimé chez les murins (revue in GERSHON et coll., 1993) et d'autre part à l'apparition d'autres messagers chimiques tels que le neuropeptide Y (NPY) et la sérotonine (5-HT) (BAETGE et coll., 1990 ; CARNAHAN et coll., 1991). Chez le rat, contrairement au poulet (GARCIA-ARRARAS et MARTINEZ, 1990 ; GARCIA-ARRARAS et coll., 1992) ou à la grenouille-taureau (STOFER et HORN, 1990), il n'existe pas de données relatives à la présence ou à l'apparition de neuropeptides au cours de la différenciation précoce des neurones sympathiques. Dans ceux du poulet, une expression précoce de NPY et de VIP a été rapportée, ainsi qu'une expression transitoire de somatostatine (MAXWELL et coll., 1984 ; GARCIA-ARRARAS et coll., 1986 ; GARCIA-ARRARAS et MARTINEZ, 1990 ; GARCIA-ARRARAS et coll., 1992).

Grâce à un certain nombre d'immunsérums dirigés contre des neuropeptides ou messagers chimiques présents (ou non) dans les neurones sympathiques du rat adulte, nous avons recherché quels sont ceux dont l'apparition est la plus précoce au cours du développement embryonnaire. On peut signaler qu'il n'existe pas de marqueurs bien caractérisés pour suivre la différenciation des cellules de la LSS puisque l'on ne connaît pas les épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux anti-SA et anti-B2. Nous avons examiné si l'étude de la distribution de certains de ces neuropeptides au cours de l'ontogenèse pouvait permettre de caractériser les (ou des) cellules de la lignée sympathosurrénalienne *in vivo*.

#### **b ) Colonisation surrénalienne**

Les cellules médullosurrénaliennes constituent un excellent modèle pour l'étude de la différenciation des cellules de la LSS. Elles ont fait l'objet de très nombreuses études principalement *in vitro* mais également *in vivo*, et ceci aussi bien chez les mammifères que chez les oiseaux (revue in

PATTERSON, 1990). Ces cellules présentent un double intérêt puisque la colonisation du cortex fœtal par les cellules de la LSS induirait une différenciation (souvent décrite comme exclusive) en cellules chromaffines. Ces études ont conduit à l'établissement d'un schéma de différenciation relativement simple, incluant une différenciation en neurones sympathiques extrasurréaliens sous l'effet de facteurs non parfaitement caractérisés et une différenciation en cellules chromaffines sous l'effet des glucocorticoïdes surréaliens (Figure 1-5). En ce qui concerne la différenciation en neurones sympathiques, un rôle potentiel est généralement attribué aux facteurs de croissance tels que le FGF (*fibroblast growth factor*), l'IGF (*insulin-like growth factor*), le facteur neurotrophique ciliaire (IGF-I) et le NGF (*nerve growth factor*) (revues in PATTERSON, 1990 et ANDERSON, 1993a). Toutefois, ce dernier n'interviendrait que tardivement durant la différenciation des neurones sympathiques (revue in TISCHLER et coll., 1993 ; ANDERSON, 1993a). Lors de la période de colonisation du cortex fœtal, les précurseurs sympathosurréaliens perdraient leurs caractéristiques neuronales et se différencieraient en cellules chromaffines (ANDERSON et AXEL, 1986 ; ANDERSON, 1993a). La détection de neurones intrasurréaliens chez l'adulte (ANDERSON et AXEL, 1985 ; SCHALLING et coll., 1988b ; PELTOHUIKKO, 1989 ; DAGERLIND et coll., 1990 ; HENION et LANDIS, 1990 ; TOMLISON et COUPLAND, 1990 ; LEON et coll., 1992a) paraît paradoxale si l'on s'en tient au schéma classique de différenciation des cellules de la LSS. Ainsi, la présence de neurones intrasurréaliens n'est jamais clairement discutée ; elle est même souvent occultée par les auteurs qui s'intéressent aux mécanismes de la différenciation des cellules de la LSS (ANDERSON et AXEL, 1986 ; ANDERSON et coll., 1991 ; CARNAHAN et PATTERSON, 1991a et b, CARNAHAN et coll., 1991 ; ANDERSON, 1993a et b). ANDERSON et AXEL (1986) ont rapporté la présence de cellules marquées par le B2 (marqueur des sympathoblastes) dans la surrénale fœtale, ces cellules étant censées dégénérer dans la période périnatale. Dans une étude plus récente, ce ne sont plus que de "*rare cellules*" (amenées à dégénérer également) qui seraient "*occasionnellement*" immunoréactives pour ce même marqueur (ANDERSON et coll., 1991). Compte-tenu de la présence de neurones surréaliens chez l'adulte, l'intervention des glucocorticoïdes dans la différenciation des cellules de la LSS pourrait, comme le suggèrent TISCHLER et coll. (1991), s'avérer plus complexe que ce qui a été décrit. L'existence d'un précurseur unique qui coloniserait la surrénale (ANDERSON et AXEL, 1986 ;

ANDERSON et coll., 1991) n'est pas en accord avec certaines données de la littérature suggérant que les neurones intrasurréaliens observés chez l'adulte pourraient être des dérivés parasympathiques ayant migré dans la surrénale (SCHALLING et coll., 1988b ; HENION et LANDIS, 1990).

En ce qui concerne le moment de la colonisation du cortex fœtal par la (ou les) cellule(s) médullosurrénalienn(e)s précurseur(s), différentes dates ont été proposées. La plupart des auteurs admettent que cette colonisation survient entre le 14<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour de la gestation (VERHOFSTAD et coll., 1979 ; EL-MAGHRABY et LEVER, 1980 ; BOHN et coll., 1981 ; ANDERSON et AXEL, 1986 ; SOINILA et coll., 1988 ; HENION et LANDIS, 1990 ; ANDERSON et coll., 1991). Toutefois, des cellules pénétrant le cortex surrénalien ont été décrites plus tardivement, aux 18<sup>ème</sup> et 20<sup>ème</sup> jour de la gestation (MILLARD et UNSICKER, 1981 ; ROIVAINEN et coll., 1991).

D'après certaines études, la colonisation se ferait en une étape à partir de la chaîne paravertébrale (ANDERSON et AXEL, 1985, 1986 ; ANDERSON et coll., 1991 ; HENION et LANDIS, 1990) alors que d'autres études font état d'une colonisation en deux étapes dont une est marquée par la formation d'un blastème surrénalien au pôle aortique de la surrénale (VERHOFSTAD et coll., 1979, 1985 ; SOINILA et coll., 1988).

Compte-tenu des divergences des données de la littérature, il nous a semblé important de réexaminer les événements qui surviennent lors de la colonisation surrénalienne.

### **c) Apparition des messagers chimiques dans les cellules médullosurréaliennes.**

#### **c-1) Les amines biogènes**

De nombreuses études sont relatives à l'apparition des phénotypes catécholaminergiques (TEITELMAN et coll., 1979, 1982 ; VERHOFSTAD et coll., 1979 et 1985 ; ANDERSON et AXEL, 1986 ; SOINILA et coll., 1988 ; EHRLICH et coll., 1989 ; SEIDL et UNSICKER, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990 ; ANDERSON et coll., 1991 ; LEON et coll., 1992b). Dans les cellules chromaffines, la date d'apparition de la PNMT, l'enzyme permettant la caractérisation des cellules adrénérgiques, n'est pas univoque. Une détection immunohistologique de la PNMT a été possible autour de E 17 (VERHOFSTAD et coll., 1979 et 1985 ; BOHN et coll., 1981 ; SEIDL et UNSICKER, 1989), E 16 (TEITELMAN et coll., 1979, 1982 ; SOINILA et



coll., 1988 ; HENION et LANDIS, 1990) ou E 15 (EHRlich et coll., 1989). La détermination précise de l'apparition de cette enzyme est d'une importance considérable car on sait, depuis les travaux de WURTMAN et AXELROD (1966) chez le rat adulte et de MARGOLIS et coll. (1966) chez le fœtus, que l'expression et l'activité de la PNMT sont contrôlées par les glucocorticoïdes. Si une intervention des glucocorticoïdes fœtaux dans l'induction de cette enzyme est suggérée par certaines études (SEIDL et UNSICKER, 1989 ; VERHOFSTAD et coll., 1979 ; HENION et LANDIS, 1990), elle est mise en doute par d'autres (TEITELMAN et coll., 1979, 1982 ; BOHN et coll., 1981 ; EHRlich et coll., 1989). La divergence des données de la littérature relatives à la date d'apparition de la PNMT nécessite de nouvelles investigations.

La ségrégation des cellules chromaffines de l'adulte en cellules adrénérgiques (A) et noradrénérgiques (NA), n'est pas aussi clairement établie qu'on le pense généralement. L'apparition des cellules NA serait postnatale pour certains (VERHOFSTAD et coll., 1979 et 1985) et prénatale pour d'autres (MILLARD et UNSICKER 1981 ; SOINILA et coll., 1988 ; EHRlich et coll., 1989 ; LEON et coll., 1992b). Chez le rat, SOINILA et coll., (1988) ont étudié la distribution immunohistochimique de sérotonine au cours développement embryonnaire. La 5-HT est présente dans les cellules précurseurs et, très tôt (E 16), le marquage anti-5-HT pourrait permettre une discrimination entre cellules A et cellules NA. En effet, la sérotonine ne serait pas exprimée dans des cellules, associées en îlots, dépourvues de marquage anti-PNMT et faiblement marquées par un anti-TH. Des résultats récents plaident en faveur de cette hypothèse. En effet, LEON et coll. (1992b) ont étudié la distribution immunohistochimique de molécules d'adhésion (NCAM et L1) au cours de l'ontogenèse surrénalienne. D'après leurs résultats, les cellules NA proviendraient d'îlots de cellules marquées par leur anti-L1 (comme les cellules NA de l'adulte) mais faiblement immunoréactives pour un anti-TH (contrairement aux cellules NA de l'adulte). Ces auteurs envisagent que les cellules de ces îlots seraient à l'origine des cellules NA mais certaines d'entre elles pourraient également générer les neurones observés chez adulte.

#### c-2) Les neuropeptides médullosurréaliens

Une seule étude immunohistochimique concerne la détection de neuropeptides, parallèlement à celle de la TH et de la PNMT, dans les cellules médullosurréaliennes de rat au cours de l'ontogenèse. HENION

et LANDIS (1990) ont étudié la distribution des marquages anti-NPY et anti-Leu-ENK entre le 15<sup>ème</sup> jour de gestation (E 15) et le stade adulte. Leurs observations suggèrent que le NPY serait présent dès la phase de colonisation, dans environ 50% des cellules chromaffines mais également dans des cellules du complexe ganglionnaire extrasurrénalien (CGES). Entre E 15 et E 20, le pourcentage de cellules chromaffines NPYergiques s'accroît et atteint 80%. A tous les stades de la gestation, un intense marquage NPYergique est observé dans des cellules associées en îlots et, par ailleurs, peu immunoréactives avec un immunosérum anti-TH. Par contre les cellules extra-insulaires fortement TH(+) présentent d'importantes variations quant à l'intensité du marquage NPYergique ; elles sont généralement peu, voire pas, marquées par un immunosérum anti-NPY. Après la naissance, ces auteurs signalent une forte diminution du pourcentage de cellules NPY(+) qui n'est plus que de l'ordre de 40% chez l'adulte. Ces mêmes auteurs font état d'une disparition des îlots de cellules NPYergiques qui ne sont plus détectés au 7<sup>ème</sup> jour postpartum. Selon HENION et LANDIS (1990), les cellules enképhalinergiques apparaissent après les cellules NPYergiques ; de rares cellules sont présentes à E 16 et, jusqu'à la naissance, ce marquage est visible dans les cellules fortement TH(+). Le pourcentage de cellules Leu-ENK(+) augmente à partir de E 16 pour atteindre 40% à E 20 ; il diminue après la naissance pour rejoindre le niveau observé chez l'adulte (environ 10%). A notre connaissance, aucun autre neuropeptide détecté dans la surrénale de rat adulte n'a été décrit dans la surrénale au cours de l'ontogenèse chez le rat.

### c-3) Ontogenèse de l'innervation médullo-surrénalienne.

Un contrôle nerveux des cellules chromaffines est, pour de nombreux auteurs, assez peu probable avant la naissance (revues in PADBURY, 1989 ; SLOTKIN et SEIDLER, 1989). L'innervation surrénalienne ne serait pas "mature" à la naissance bien que les cellules chromaffines soient capables de répondre par la libération de catécholamines à des stimuli tels que l'hypoxie probablement en raison d'une sensibilité directe (revues in PADBURY, 1989 ; SLOTKIN et SEIDLER, 1989). Néanmoins, des études ultrastructurales ont mis en évidence l'existence de fibres nerveuses dès la phase de colonisation de la surrénale et l'établissement de contacts avec les cellules chromaffines dès la naissance (EL-MAGHRABY et LEVER, 1980 ; MILLARD et UNSICKER, 1981 ; TOMLINSON



et COUPLAND, 1990). La nature du (ou des) messager(s) chimique(s) associé(s) à ces fibres n'a pourtant pas été déterminée. Dès E 17, ROIVAINEN et coll. (1991) ont mis en évidence des fibres nerveuses à l'aide d'un immunosérum anti-PKC  $\beta$  (sous unité  $\beta$  de la Protéine Kinase C). Les fondements physiologiques d'un éventuel contrôle nerveux de la médullosurrénale à la naissance restent à établir. Aucune innervation de nature peptidergique, catécholaminergique ou cholinergique des cellules chromaffines n'a été rapportée chez le fœtus ; les premières fibres cholinergiques ou enképhalinergiques décrites par HENION et LANDIS (1990) l'ont été chez des nouveau-nés, de deux ou cinq jours respectivement.

## B - LA CORTICOSURRENALE

### 1°) Cellules stéroïdogéniques et hormones stéroïdiennes

Chez les mammifères, le cortex surrénalien est organisé en trois zones distinctes comprenant, de la périphérie vers le centre, les zones glomérulée, fasciculée et réticulée (Figure 1-1). Ces zones se distinguent non seulement par leur architecture cytologique mais également par la nature des hormones stéroïdiennes qu'elles élaborent et sécrètent. Celles-ci, véhiculées par le sang, vont agir sur un très grand nombre de tissus cibles où elles régulent, en particulier, l'expression de nombreux gènes (revue in WATERMAN et SIMPSON, 1990). Selon la nature de l'équipement enzymatique des cellules des différentes zones, le métabolisme du cholestérol conduit *in fine* à une synthèse spécifique d'aldostérone, principal minéralocorticoïde, dans la zone glomérulée et à la synthèse de glucocorticostéroïdes et d'androgènes respectivement par la fasciculée et la réticulée (revue in WATERMAN et SIMPSON, 1990).

Au cours de notre étude ontogénétique, nous avons utilisé une réaction histochimique mettant en évidence une activité NADPH-diaphorase. Chez le fœtus, cette réaction marque spécifiquement les cellules du cortex surrénalien, aussi a-t-elle été utilisée pour caractériser ces cellules chez le fœtus et chez l'adulte. Dans le même temps, AFEWORK et coll. (1992) ont publié que cette réaction marque le tissu stéroïdogénique de l'adulte. Ils ont envisagé qu'elle pouvait, soit être en relation avec l'utilisation du NADPH dans la stéroïdogénèse (le NADPH est utilisé comme cofacteur par bon nombre d'enzymes intervenant dans ce processus), soit être liée à la présence d'une forme particulière de l'enzyme intervenant dans la synthèse des monoxydes

d'azote (isoenzyme de la NO-synthase). En effet, avec les immunsérums qui ont été utilisés, la présence de NO-synthase n'a jamais été rapportée dans les cellules du cortex surrénalien alors que, dans le système nerveux, le produit de la réaction et le marquage anti-NO-synthase sont colocalisés dans de nombreux neurones (revue in BREDT et coll., 1990 ; AFEWORK et coll., 1992).

#### a) Zone glomérulée (ZG)

Cette zone, la plus externe, est située sous la capsule fibreuse (Figure 1-1) ; elle représente tout au plus 15 à 20 % du volume du cortex. Les cellules qui la constituent jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'équilibre hydrominéral via la biosynthèse d'aldostérone (revues in MULLER, 1991 ; HANUKOGLU, 1992).

La synthèse et la sécrétion d'aldostérone sont soumises à un contrôle multifactoriel qui apparaît chaque jour plus complexe vu le grand nombre de facteurs impliqués. Le système rénine-angiotensine est le principal régulateur de la production d'aldostérone (revue in QUINN, 1988). La rénine est essentiellement, mais non exclusivement synthétisée dans le rein ; elle transforme l'angiotensinogène d'origine hépatique en angiotensine I (AI), substrat de l'enzyme de conversion. Cette enzyme qui est présente dans la plupart des cellules endothéliales, donne par clivage protéolytique de l'AI un octapeptide, l'angiotensine II (AII) (revue in MULROW, 1992). Cette dernière est un puissant vasoconstricteur et par ailleurs un non moins puissant sécrétagogue pour la zone glomérulée qui produit l'aldostérone (revue in QUINN, 1988). L'existence d'un système à rénine-angiotensine intrasurrénalien a été postulée ; elle repose d'une part sur la présence de matériel rénine-like dans les cellules de la ZG et d'autre part sur l'existence d'ARNm de la rénine aussi bien dans la surrénale de souris que dans celle de rat (revues in GUPTA et coll., 1992 ; MULROW, 1992).

Dans un article de synthèse consacré à la régulation de la sécrétion d'aldostérone, QUINN (1988) présente les principaux facteurs qui stimulent (+) ou inhibent (-) la sécrétion de ce minéralocorticoïde. Nous les présentons dans le tableau ci-dessous, en les complétant par des données plus récentes, mais non exhaustives, d'études *in vitro* et/ou *in vivo*. Pour certains de ces facteurs, la présence (P) de récepteurs a été prouvée mais pour d'autres l'incertitude (?) demeure. Très récemment, GALLO-PAYET (1993) a également fait une mise au point sur le contrôle multifactoriel de la production d'aldostérone.

Facteurs régulateurs	Récepteurs membranaires	Effets +/-
ACTH	P	+
$\alpha$ MSH	P	+
A II	P	+
AVP	P	+
Serotonine	P	+
Dopamine	P	-
ANF	P	-
Somatostatine	P	-
Potassium		+
VIP1-2-3-5-9	p1	+ ( <i>in vivo</i> ) +/- ( <i>in vitro</i> )
Endothéline 1 4-9	?	+ ( <i>in vivo</i> )
Ocytocine 9	?	+ ( <i>in vitro</i> )
NPY 6-7-8-9	p13 (chez le bœuf)	+/- ( <i>in vivo</i> ) - ( <i>in vitro</i> )
PYY10	?	+ ( <i>in vivo</i> ) - ( <i>in vitro</i> )
Dynorphine <sup>1</sup> 1	?	- ( <i>in vivo</i> )
Substance P 1 2	?	+ ( <i>in vivo</i> )
CGRP <sup>14</sup>	?	+ ( <i>in vivo</i> )
Neurotensine <sup>9</sup>	?	+ ( <i>in vivo</i> ) - ( <i>in vitro</i> )

**Facteurs agissant sur la sécrétion d'aldostérone (d'après QUINN, 1988).**

ACTH : hormone adrénocorticotrope corticostimulante ;  $\alpha$ MSH :  $\alpha$  *Melanocyte Stimulating hormone* ou *hormone mélanotrope* ; AVP : arginine vasopressine, ANF : facteur natriurétique atrial.

**Sources bibliographiques :**

(1) CUNNINGAM et HOLZWARTE (1988, 1989) ; (2) HINSON et coll. (1992) ; (3) ENYEDI et coll. (1983) ; (4) MAZZOCCHI et coll. (1990c) ; (5) revue in HINSON JP, (1990) ; (6) MAZZOCCHI and NUSSDORFER (1987) ; (7) REBUFFAT et coll. (1988) ; (8) LESNIEWSKA et coll. (1990) ; (9) revue in MALENDOWICZ (1993) ; (10) NERI et coll. 1991a ; (11) MAZZOCCHI et coll. (1990 a et b) ; (12) NUSSDORFER et coll. (1988) ; (13) TORDA et coll. (1988) ; (14) HINSON et VINSON (1990).

Ce tableau montre d'une part que de nombreux facteurs, peptidiques pour la plupart, observés dans les surrénales de mammifères sont impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone, et d'autre part qu'il existe pour bon nombre d'entre eux des contradictions quant à leurs effets biologiques selon que les investigations ont été faites *in vivo* ou *in vitro*. Nous aurons l'occasion de discuter ce dernier point dans le troisième chapitre du mémoire.

### b) Zones fasciculée et réticulée

Les cellules des zones fasciculée et réticulée constituent l'essentiel du cortex surrénalien. La première, située sous la zone glomérulée, doit son nom à l'organisation des cellules en travées radiales qui s'étendent jusqu'à la zone réticulée jouxtant la médullosurrénale. La zone réticulée a été assez peu étudiée ; les cellules qui la constituent ont la capacité de synthétiser des corticostéroïdes, des androgènes et un peu d'œstrogènes (revue in WATERMAN et SIMPSON, 1990). Cette zone est particulièrement impliquée dans certaines pathologies, comme par exemple les syndromes surrénaux virilisants dont la gravité dépend à la fois de l'âge de l'individu et de son sexe.

Les cellules de la zone fasciculée ont fait l'objet d'un plus grand nombre d'études. Elles synthétisent des corticoïdes, dont le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez le Rat. Ces hormones, connues aussi sous l'appellation de glucocorticoïdes, particulièrement actives sur le métabolisme énergétique, exercent des effets immunodépresseurs et antiphlogistiques.

Des expériences anciennes ont bien démontré que le fonctionnement de la zone fasciculée est fondamentalement sous contrôle antéhypophysaire via la corticostimuline ou ACTH (revue in WATERMAN et SIMPSON, 1990). L'ACTH hypophysaire dérive de la Proopiomélanocortine (POMC) dont le clivage protéolytique peut également libérer d'autres peptides comme l' $\alpha$ MSH, active sur la surrénale (revue in QUINN, 1988). La POMC est synthétisée principalement, mais non exclusivement, dans les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure, sous la dépendance de facteurs hypothalamiques parmi lesquels figure en premier lieu la corticolibérine (CRF). Comme nous l'avons déjà signalé, l'existence d'un système corticotrope intrasurrénalien est vraisemblable, tout au moins chez certaines espèces de mammifères (revue in MULROW, 1992). Son rôle dans le contrôle de l'activité surrénalienne par l'ACTH reste largement à



démontrer. On peut toutefois affirmer que ce système corticotrope intrasurrénalien doit jouer un rôle mineur par rapport au système corticotrope hypophysaire, puisque l'hypophysectomie s'accompagne, chez toutes les espèces où elle a été pratiquée, d'une atrophie et d'une mise au repos de la surrénale.

## 2°) L'innervation corticale

L'existence et l'implication d'une innervation corticale dans la physiologie du cortex surrénalien ont été longtemps ignorées (CHARLTON, 1990). Des études morphologiques font état de fibres catécholaminergiques, peptidergiques et cholinergiques. Chez le rat, alors que l'innervation préganglionnaire cholinergique de la médullosurrénale, via le nerf splanchnique, est unanimement reconnue, bien des doutes subsistent quant à la nature et à l'origine des fibres qui innervent la corticosurrénale.

### a) Innervation catécholaminergique

L'existence d'une innervation corticale de nature catécholaminergique repose initialement sur la mise en œuvre de techniques d'histofluorescence (KLEITMAN et HOLZWARTH, 1985a) puis sur des études immunohistochimiques (OOMORI et coll., 1989, 1991). Les fibres catécholaminergiques forment un plexus dense dans la zone capsulo-glomérulaire. Elles sont associées aux vaisseaux sanguins capsulaires ou sous-capsulaires et aux cellules corticales (KLEITMAN et HOLZWARTH, 1985a ; OOMORI et coll., 1989, 1991). Selon les premiers travaux du groupe d'OOMORI (1989), les fibres catécholaminergiques du cortex auraient une origine extrinsèque ; néanmoins, des neurones catécholaminergiques présents au sein de la médullosurrénale pourraient participer à l'innervation corticale (OOMORI et coll., 1991). Ces fibres sont considérées comme des fibres sympathiques postganglionnaires dont l'origine extrasurrénalienne est supposée mais non prouvée (VARNDELL et coll., 1984 ; KLEITMAN et HOLZWARTH, 1985a ; OOMORI et coll., 1989). La coexistence de catécholamines avec d'autres neuromodulateurs ou neurotransmetteurs n'a pas été établie pour ces fibres nerveuses ; elle a seulement été suggérée pour le NPY (VARNDELL et coll., 1984).

### b) Innervation peptidergique

Chez le rat, la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale est dotée d'une dense innervation à NPY (VARNDELL et coll., 1984 ; KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989) et à VIP (HÖKFELT et coll., 1981 ; KONDO 1985 ; KONDO et coll., 1986 ; HOLZWARTH, 1983, 1984 et HOLZWARTH et coll., 1987). La comparaison de ces études histo et/ou cytologiques montre une certaine similitude quant à la distribution des fibres peptidergiques à NPY et à VIP, mais leur origine pourrait être différente.

Une origine intrinsèque, donc intrasurrénalienne, des fibres VIPergiques est envisagée par différents auteurs (HÖKFELT et coll., 1981 ; HOLZWARTH, 1983, 1984). Les travaux de HOLZWARTH (1984) ne permettent pas de trancher de manière indubitable, aussi cet auteur envisage-t-il la possibilité d'une double origine (extrinsèque et intrinsèque). De leur côté, KONDO (1985) et KONDO et coll. (1986) attribuent aux fibres corticales VIPergiques une origine extrinsèque car elles n'auraient pas les mêmes caractéristiques morphologiques que les fibres médullosurréaliennes ; une telle hétérogénéité morphologique des fibres VIPergiques a également été signalée par HOLZWARTH (1983, 1984).

Les fibres NPYergiques présentes dans la zone capsulo-glomérulaire ont une distribution comparable à celle des fibres catécholaminergiques (VARNDELL et coll., 1984). Elles sont généralement considérées comme d'origine extrinsèque (VARNDELL et coll., 1984 ; KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1986). Néanmoins, pour PELTO-HUIKKO (1989), les neurones intrasurréaliens NPYergiques pourraient également contribuer à cette innervation corticale comme cela a été préalablement envisagé pour les neurones VIPergiques (HÖKFELT et coll., 1981 ; HOLZWARTH, 1984) et catécholaminergiques (OOMORI et coll., 1991).

La zone capsulo-glomérulaire possède également des fibres à CGRP (KURAMOTO et coll., 1987), à SP (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1985) et à GAL (PELTO-HUIKKO, 1989 ; ZENTEL et coll., 1990). Des fibres neurotensinergiques ont été signalées dans la surrénale du hamster mais non dans celle du rat (PELTO-HUIKKO, 1989).

Bien que l'innervation corticale soit majoritairement localisée dans la zone capsulo-glomérulaire, son implication dans le contrôle nerveux de la stéroïdogénèse des zones sous-jacentes a été envisagée (CHARLTON, 1990). En effet, contrairement à la zone capsulo-



glomérulaire, les zones fasciculée et réticulée paraissent peu ou pas innervées ; néanmoins, de rares fibres radiales, de même nature que celles innervant la zone capsulo-glomérulaire, ont été décrites au sein de ces zones.

### c) Innervation cholinergique

L'utilisation de techniques histochimiques pour la mise en évidence des acétylcholinestérases (AChE) a permis de montrer la présence de fibres AChE(+) dans le cortex surrénalien de l'homme (CHARLTON et coll., 1991) et du rat (souche *Rattus rattus rufescens* ou rat noir indien) (PURWAR, 1978). DAGERLIND et coll. (1990) ont confirmé, à l'aide de techniques immunohistochimiques, que la zone capsulo-glomérulaire du rat reçoit des fibres marquées par un anti-AChE.

### 3) Ontogenèse du cortex surrénalien

Le cortex surrénalien dérive du mésoderme ; l'ébauche corticale se différencie *in utero* à partir de l'épithélium cœlomique (revue in TISCHLER et DeLELLIS, 1988). Chez les mammifères, à un stade précoce de l'ontogenèse, ce tissu s'organise et se différencie pour acquérir les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles typiques des trois zones de la surrénale adulte. Peu de données concernent le processus de différenciation de ces zones corticales. Deux grandes théories ont été proposées (revue in Mc NICOL et DUFFY, 1987). La première, ou "*théorie centripète*" a été avancée par GOTTSCHAU (1883) ; elle fait appel à une prolifération dans le cortex périphérique puis à une migration centripète des cellules dans le cortex sous-jacent et leur mort éventuelle dans la zone réticulée (revue in Mc NICOL et DUFFY, 1987). Un certain nombre d'observations plaident en faveur de cette hypothèse ; en effet, chez le fœtus et l'adulte, la prolifération cellulaire est très intense à la périphérie du cortex et l'apoptose prédomine au contraire dans la zone réticulée (revue in Mc NICOL et DUFFY, 1987). La seconde, ou "*théorie zonale*" proposée par RACE et GREEN (1955), suggère que les cellules corticales se différencient et meurent dans la zone qui leur a donné naissance (revue in Mc NICOL et DUFFY, 1987).

Compte-tenu du rôle joué par les glucocorticoïdes dans la différenciation des cellules chromaffines et dans l'induction ou tout au moins dans la régulation de l'expression et de l'activité de la PNMT, de nombreuses études ont porté sur l'apparition et le développement d'une

activité stéroïdogénique dans le cortex fœtal. Les résultats de ces études, fondées sur le dosage biochimique des glucocorticoïdes, ne sont pas toujours univoques. Selon MILKOVIC et coll. (1973) l'activité stéroïdogénique apparaîtrait entre les 17<sup>ème</sup> et 18<sup>ème</sup> jours de gestation chez le rat. Selon KAMOUN (1970) dès le 17<sup>ème</sup> jour de gestation a lieu une synthèse de corticostérone dans la surrénale foetale. De nombreux auteurs signalent par ailleurs une forte augmentation des taux de glucocorticoïdes dans le plasma et la surrénale autour des 18<sup>ème</sup> et 19<sup>ème</sup> jours de gestation (HOLT et OLIVER, 1968 ; KAMOUN, 1970 ; COHEN, 1976 ; DUPOUY et coll., 1975 ; BOUDOURESQUE et coll., 1988), en relation avec une activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (revue in BOUDOURESQUE et coll., 1988). Des ARNm de la  $3\beta$  hydroxystéroïde/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ isomérase ( $3\beta$ -HSD), une enzyme intervenant dans les premières étapes de la stéroïdogénèse, sont décelables dès E 15 et l'immunoréactivité correspondante, un jour plus tard (DUPONT et coll., 1991). De leur côté, ANDERSON et coll. (1991) rapportent avoir dosé des microquantités de glucocorticoïdes dans la surrénale dès E 14,5 (stade de la colonisation). Ces résultats suggèrent donc la possibilité d'une synthèse très précoce de glucocorticoïdes par la surrénale foetale ou son ébauche.

En conclusion, l'avènement des techniques immunohistologiques a permis de mettre en évidence l'existence de nombreuses substances peptidergiques souvent colocalisées avec les catécholamines, dans les cellules chromaffines et/ou associées à une innervation surrénalienne bien plus complexe et hétérogène qu'on ne pouvait l'imaginer voici 2 ou 3 décennies.

Les données relatives à la nature des peptides et amines biogènes présents dans les fibres nerveuses et/ou les cellules médullosurrénaliennes sont très abondantes mais elles ne sont pas toujours univoques. Au cours du développement embryonnaire, l'étude de la distribution de ces messagers chimiques n'a pas été réalisée pour les dérivés sympathosurréaliens majeurs (cellules chromaffines et neurones sympathiques) et peu d'études concernent la différenciation de ces cellules *in vivo*.

Les objectifs de nos recherches, exposés dans ce chapitre, ont été :  
1°) de comparer la distribution du NPY et d'autres messagers biologiques dans les cellules et les fibres nerveuses de la surrénale du rat adulte.

2°) d'étudier, au cours de l'ontogenèse précoce, l'apparition de messagers chimiques exprimés chez l'adulte dans les dérivés sympathosurrénaux typiques, et plus particulièrement ceux présents dans les neurones sympathiques et les cellules chromaffines.

3°) de rechercher une éventuelle corrélation entre la détection histochimique d'une activité NADPH-diaphorase et l'activité stéroïdogénique du cortex surrénalien.

4°) de compléter et/ou d'étendre un certain nombre de résultats concernant l'ontogenèse de la glande surrénale au cours du développement embryonnaire.

## II - MATERIEL ET METHODES

### A - Techniques d'immunohistochimie

#### 1°) Les animaux

Nos études portent sur des rats de souche Wistar. Les animaux ont été soumis à un rythme nyctéméral comportant 12 heures d'éclairement (de 7 h à 19h) / 12 heures d'obscurité ; la pièce d'élevage est maintenue à une température de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Ils ont eu libre accès à la nourriture et à l'eau.

#### a) Les adultes

Les surrénales, traitées suivant les protocoles décrits ci-dessous, ont été prélevées sur des rats mâles et femelles préalablement anesthésiés par un mélange de Rompun/Xylazine (0,2ml/kg, Bayer) et de Kétamine (Kétalar 50, 0,5ml/kg, Parke Davis), et perfusés.

#### b) Les fœtus

Afin d'être fécondées, quelques femelles sont placées une nuit dans une cage avec un mâle. Le matin suivant, la présence de spermatozoïdes dans le frottis vaginal atteste de l'accouplement et d'une probable fécondation ; par convention, c'est le jour 0 (E 0) du développement embryonnaire. La gestation dure 21 jours chez le rat et la parturition survient généralement entre le 21<sup>e</sup> et 22<sup>e</sup> jour. Des fœtus ont été prélevés entre E 11,5 et E 21 le matin entre 11 heures et 13 heures après césarienne de la mère. Entre E 11,5 et E 16,5, les fœtus décapités sont immergés "*in toto*" dans le fixateur. Aux stades ultérieurs, seules les surrénales, et plus rarement la région thoraco-abdominale (contenant les surrénales), sont prélevées et immergées dans le fixateur. Les portées dont le nombre de foetus est inférieur à 7, donc plus gros que la normale, sont éliminées.

#### c) Les nouveau-nés

Le jour de la naissance est par convention le jour 0. Des surrénales de nouveau-nés (NN) ont été également étudiées. Leurs surrénales ont été traitées soit comme celles des fœtus (fixation par immersion), soit comme celles des adultes (perfusion à l'aide d'une seringue puis post-fixation) pour faciliter toute comparaison entre ces stades néonataux et les stades embryonnaires ou adultes. Des surrénales de NN de 0, 1 et 2 jours (n = 6, 8 et 4 respectivement) ou de NN de 8 et 15 jours (n = 2 et 2) ont été étudiées.

Remarque : Dans le cadre d'un travail en collaboration avec le Laboratoire d'Anatomo-pathologie de Lille dirigé par Madame le professeur Lecomte-Houcke, nous avons pu obtenir et étudier des prélèvements humains de surrénales normales ou pathologiques ainsi qu'un fragment contenant une surrénale et des ganglions périssurrénaux chez un fœtus avorté proche du terme (malformation cardiaque). Ces prélèvements ont été fixés par immersion dans le fixateur décrit ci-dessous.

## 2°) Traitements des organes et tissus

### a ) Le fixateur

Le fixateur utilisé est le PAF (*picric acid paraformaldehyde*) pour les études d'immunohistochimie, d'hybridation *in situ* et d'histoenzymologie.

Le PAF est préparé par dissolution de 20 g de paraformaldéhyde dans 150 ml d'acide picrique saturé ; cette solution est chauffée jusqu'à 60°C puis rendue limpide par apport d'un volume approprié de soude 1 N. Le volume du mélange est complété à un litre par du tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydre : 10,7 g et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 3,9 g pour un litre de tampon).

### b) Perfusion / Immersion

Les animaux anesthésiés (NN ou adultes) ont subi une perfusion intracardiaque de 20 ml (NN) ou 150 ml (adultes) de sérum physiologique hépariné afin de chasser le sang des vaisseaux, suivie de la perfusion de 50 ml ou 500 ml de PAF (respectivement). Après dissection, les surrénales ou, dans de plus rares occasions, la région du tronc ont été post-fixées pendant 6 heures avec le même fixateur.

Pour notre étude histochimique destinée à mettre en évidence une activité NADPH-diaphorase, nous avons utilisé des surrénales adultes qui n'ont pas subi de post-fixation. Concernant les fœtus et les nouveau-nés sacrifiés par décapitation, les tissus ou les surrénales ont été rapidement prélevés puis immergés 12 heures dans le PAF.

### c) Inclusion

Après fixation, les tissus sont rincés pendant 12 heures dans 3 bains de tampon de Coons (1) additionné de saccharose (20%). Ces rinçages éliminent le fixateur et empêchent la formation de cristaux de glace susceptibles de léser les tissus.

Les tissus imprégnés de tampon de Coons/saccharose sont inclus dans du Tissue-Tek (Miles Laboratories, Nappeville, Illinois) contenu dans un godet réalisé par pliage d'une feuille d'aluminium. Le godet est plongé dans du méthyl-2 butane ou de l'isopentane, refroidis par de l'azote liquide. Les blocs ainsi congelés sont ensuite stockés à - 80°C avant d'être coupés au cryostat.

*(1) Le tampon de Coons est préparé par dilution de moitié au moment de l'emploi d'une solution mère comprenant : 4,12 g de véronal sodique, 17 g de NaCl, 3,4 ml de HCl 1 N et 0,46 g d'azide de sodium, qsp 1 litre d'eau distillée.*

### d) Coupes

Les coupes sont réalisées au cryostat (2800 Frigocut, Reichert-Jung) ; l'épaisseur des coupes varie de 6 à 12 µm selon la méthodologie choisie. Les coupes sont récoltées sur des lames de verre recouvertes d'un film de gélatine. La gélatinisation s'effectue par immersion des lames parfaitement propres (nettoyage et dégraissage par un détergent puissant (RBS), rinçage abondant à l'eau courante puis à l'eau distillée) dans une solution préalablement filtrée de gélatine (0,5%) et d'Alun de chrome (0,05%) à 70°C (pour un litre d'eau distillée, 0,5 g d'alun de chrome et 5 g de gélatine en poudre). Ces lames gélatinées sont séchées à l'étuve et conservées à - 20°C.

Les coupes récoltées sur lames, sont utilisées immédiatement pour les différentes études (immunohistochimie, hybridation *in situ* ou histoenzymologie) ou congelées à - 80°C avant leur utilisation.

### 3°) Les immunsérums

La majorité des immunsérums (IS) utilisés a été généreusement fournie par le Professeur G. TRAMU. Ces IS ont été obtenus chez le lapin après injection d'antigènes (Ag) couplés à un haptène [sérum albumine humaine (HSA) ou bovine (BSA) et Thyroglobuline (TG)]. D'autres immunsérums nous ont été gracieusement fournis par le Dr. J.M. POLAK (Londres) (sérum anti-C-PON), le Dr. P. CIOFI (Lille 2 - Unité INSERM



156) (sérum anti-NPY obtenu chez le cobaye (cNPY)), le Pr. J.W. HAYCOCK (USA) (immunoglobulines (IgG) de mouton anti-tyrosine hydroxylase (TH) purifiées sur colonne d'affinité), le Dr. P CZERNICHOW (Paris) (sérums anti-AVP et OT) et le Dr. M. DUBOIS (INRA, Nouzilly) (sérum anti-PNMT). Le tableau suivant présente les caractéristiques principales des différents IS utilisés dans certaines de nos études.

Antigène	Haptène	Espèce immunisée	Dilution	Source
ACTH <sub>18-39</sub>	HSA	Lapin	1/500	Pr. G. TRAMU
ACTH <sub>1-24</sub>	HSA	Lapin	1/500	Pr. G. TRAMU
αMSH	HSA	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
AVP	BSA	Lapin	1/400	Dr P. CZERNICHOW
CCK <sub>8</sub>	TG	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
CCK <sub>8</sub> sulfatée (CCK <sub>8</sub> -S)	HSA	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
CGRP	HSA	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
C-PON <sub>1-30</sub>	BSA	Lapin	1/1000	Dr J. M. POLAK
CRF <sub>1-41</sub>	HSA	Lapin	1/500	Pr. G. TRAMU
Dynorphine A	HSA	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
Dynorphine B	HSA	Lapin	1/400	Dr P. CIOFI
Galanine	HSA	Lapin	1/500	Pr. G. TRAMU
Met-ENK-Arg <sup>6</sup> -Gly <sup>7</sup> -Leu <sup>8</sup> (MERGL)	HSA	Lapin	1/600	Pr. G. TRAMU
Neurophysine I	Sans	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
Neurophysine II	Sans	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
Neurotensine	TG	Lapin	1/500	Pr. G. TRAMU
NPY (12)	HSA	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
NPY (cNPY)	HSA	Cobaye	1/400	Dr P. CIOFI
Ocytocine	TG	Lapin	1/400	Dr P. CZERNICHOW
PNMT	sans	Lapin	1/550	Dr M. DUBOIS
préproVIP/PHM <sub>111-122</sub> (ppVIP)	HSA	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
Sérotonine (5-HT)	BSA	Lapin	1/500	Pr. G. TRAMU
Somatostatine <sub>1-12</sub> (SRIF)	HSA	Lapin	1/600	Pr. G. TRAMU
Substance P	TG	Lapin	1/400	Pr. G. TRAMU
Tyrosine hydroxylase (TH)	sans	Mouton	1/1000	Pr. J.W. HAYCOCK
VIP	TG	Lapin	1/500	Pr. G. TRAMU

#### 4°) Réactions immunohistochimiques

Nous avons utilisé la méthode indirecte ; la fixation de l'anticorps spécifique est repérée à l'aide de fragments d'immunoglobulines marqués, dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce qui a fourni l'immunsérum spécifique.

Cette méthode est réalisée en deux étapes (immunofluorescence) voire trois étapes (immunohistochimie)

- 1 - Application du sérum spécifique
- 2 - Application du sérum marqué par un fluorochrome ou une enzyme
- 3 - Révélation de l'activité enzymatique (immunohistochimie)

##### a) Application du sérum spécifique

Les lames ramenées à température ambiante sont hydratées 1 heure dans du tampon de Coons. Les coupes sont recouvertes d'immunsérum spécifique dirigé contre l'antigène recherché, à une dilution appropriée dans du tampon de Coons contenant 0,25% de Triton X100 (Sigma). L'incubation est réalisée une nuit à température ambiante sous une atmosphère saturée en vapeur d'eau pour éviter l'évaporation.

##### b) Application du sérum marqué

Après l'incubation spécifique, les lames sont rincées dans le tampon de Coons puis, dans le cas de réactions immunohistoenzymatiques, dans du tampon de Coons sans azide.

La révélation des IgG spécifiques retenues sur la coupe traitée est effectuée par immunoenzymologie ou immunofluorescence.

Dans le premier cas, les IgG du sérum révélateur, dirigées contre les IgG spécifiques de l'antigène recherché, sont couplées à un marqueur enzymatique (peroxydase), dans le second cas à un marqueur fluorescent.

##### b-1 Marqueur enzymatique.

La révélation des anticorps spécifiques de lapin est réalisée à l'aide de fragments Fab, anti-IgG de lapin, marqués à la peroxydase (Biosys, Pasteur). La solution commerciale est diluée au 1/200<sup>ème</sup> dans du tampon de Coons sans azide.

Après une heure d'incubation à température ambiante, les lames sont rincées dans du tampon de Coons sans azide puis dans de l'eau distillée, avant d'être plongées dans la solution révélatrice préalablement filtrée. Différents chromogènes peuvent être utilisés lors de la réaction enzymatique. Ces substrats, dissouts dans 100 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 7,6 (cf tableau ci-dessous), sont oxydés en présence de peroxydase et d'eau oxygénée et donnent un précipité de couleur caractéristique.

Nous avons utilisé comme chromogènes la 3,3'-diaminobenzidine tétra HCl (DAB) (Sigma) et le 4-Chloro-1-naphtol (4Cl-N) (Sigma).

	Poids	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1)	Précipité	Remarques
DAB	50mg	50µl	Brun	Cancérogène
4Cl-N	40mg	50µl	Bleu violet	Dilution préalable des 40 mg dans 400 µl de N,N diméthylformamide.

(1) solution commerciale à 30%

La réaction enzymatique est suivie au microscope puis stoppée dans un bain d'eau distillée. Les coupes sont ensuite recouvertes d'une lamelle de verre dans un milieu glyciné (9 vol. de glycérine / 1 vol. de tampon de Coons).

#### b-2 Marqueurs fluorescents

Les IgG secondaires sont couplées à différents fluorochromes, chacun étant caractérisé par son spectre d'absorption et d'émission. Nous avons utilisé comme fluorochromes l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), l'isothiocyanate de tétraméthyl rhodamine (RITC) et, plus rarement, le 7 amino-4-méthylcoumarin-3-acétate (AMCA). Les caractéristiques de ces marqueurs fluorescents sont indiquées ci-dessous :

	Absorption λ max	Emission λ max
FITC	495 (bleu)	528 (vert)
RITC	520, 554 (vert)	582 (rouge)
AMCA	347(UV)	456 (bleu)

Les anticorps marqués par les fluorochromes ont été utilisés, dilués au 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon de Coons contenant du Triton X100 (0,25%) ; l'incubation a duré une heure à température ambiante.

Les différents anticorps marqués employés (cf tableau ci-dessous) sont commercialisés par les laboratoires Jackson Immunoresearch Inc (West Grove, USA) et distribués en France par Interchim.

Espèce productrice	Espèce reconnue	Marqueur
Chèvre	Lapin	FITC
Chèvre	Lapin	RITC
Chèvre	Cobaye	FITC
Chèvre	Cobaye	RITC
Ane	Lapin	FITC
Ane	Lapin	RITC
Ane	Mouton	FITC
Ane	Mouton	RITC

A la fin de l'incubation, les lames sont rincées plusieurs fois dans du tampon de Coons. Les coupes sont montées dans un mélange constitué de 1 volume de tampon de Coons contenant 0,1% de paraphénylène-diamine et 3 volumes de glycérine.

Les lames sont ensuite examinées en épifluorescence. En fonction du fluorochrome utilisé, les filtres sont adaptés aux longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Ces filtres laissent passer une gamme (<->) de longueurs d'ondes spécifiques (cf tableau ci-dessous).

	Filtre d'excitation	Filtre d'émission
FITC	450<->490	515<->565
RITC	534<->558	575<->640
AMCA	<-365	420<->470

### 5°) Spécificité de la réaction immunohistologique

Pour vérifier la spécificité des réactions immunohistologiques, un certain nombre de tests ont été réalisés.

### a) Spécificité des immunsérums

La spécificité d'un immunsérum (IS) peut être appréciée, *in vitro* par dosage radioimmunologique (cf dosage radioimmunologique du NPY) ou encore par dépôt d'antigène (Ag) sur membrane de nitrocellulose ou *in situ*, grâce à l'extinction du signal sur coupe. Celle-ci est réalisée en préincubant l'IS testé à la dilution appropriée avec des concentrations croissantes d'Ag homologues ou hétérologues. Le signal sur coupe disparaît quand l'IS spécifique a été incubé avec l'Ag homologue mais persiste après incubation avec des Ag hétérologues.

Nous avons caractérisé par cette méthode deux immunsérums : l'anti-somatostatine (SRIF) (MAUBERT et coll., 1992a) et l'anti-VIP (MAUBERT et coll., 1990), et contrôlé deux autres immunsérums dirigés contre le NPY et le C-PON (*C-flanking Peptide Of Neuropeptide Y*).

#### \* Caractérisation du sérum anti-VIP (1/500<sup>ème</sup>)

L'extinction du signal sur coupe est obtenue pour des concentrations en antigène homologue (VIP) comprises entre  $0,37 \cdot 10^{-3}$  et  $0,19 \cdot 10^{-3}$  moles /litre de sérum pur.

\* Caractérisations des sérums anti-C-PON et anti-NPY (12). L'extinction n'est pas obtenue pour des concentrations respectives de PHI (Peptide Histidine Isoleucine) et de VIP de 25mM et 12mM pour l'anti-C-PON et 12,5 et 6 mM pour l'anti-NPY(12).

#### \* Caractérisation du sérum anti-SRIF (1/600<sup>ème</sup>)

L'extinction du signal est obtenue pour des concentrations en antigènes homologues ; somatostatine<sub>1-12</sub> (concentrations comprises entre  $5 \cdot 10^{-4}$  et  $1 \cdot 10^{-3}$  moles /litre de sérum pur), somatostatine<sub>1-14</sub> ( $4 \cdot 10^{-3}$  à  $8 \cdot 10^{-3}$  moles/l) et somatostatine<sub>1-28</sub>  $16 \cdot 10^{-3}$  à  $32 \cdot 10^{-3}$  moles/l). Cet immunsérum reconnaît donc, avec des affinités différentes, les trois formes de somatostatine issues du clivage de la préprosomatostatine.

### b) Spécificité des composés marqués

Les coupes sont incubées avec les immunoglobulines marquées utilisées pour la reconnaissance des anticorps spécifiques des antigènes recherchés sans incubation préalable avec ces derniers. Aucun marquage ne doit être observé.

c) Vérification de l'absence de peroxydase et de fluorescence endogènes.

Les coupes réhydratées dans le tampon de Coons, révélées dans le but de détecter la présence de peroxydase ou observées en fluorescence, ne doivent pas présenter de signal.

## 6°) Techniques immunohistologiques de mise en évidence de plusieurs antigènes tissulaires sur une même coupe.

### a) Technique d'éluion

Cette technique, mise au point par TRAMU et coll. (1978), permet la localisation simultanée ou successive de deux antigènes distincts sur une même coupe.

Après révélation de l'anticorps spécifique du premier antigène recherché par immunohistofluorescence ou immunohistoenzymologie et microphotographie des coupes, les anticorps (spécifiques et secondaires) sont élués à l'aide d'une solution oxydante dont la concentration en réactifs est adaptée en fonction de l'affinité des complexes formés.

Dans le cas de réactions immunohistoenzymatiques, la révélation de l'activité peroxydasique est réalisée avec le 4-Chloro-1-Naphtol dont le produit de réaction est éliminé, avant l'éluion, en plongeant les coupes préalablement deshydratées, dans un bain d'acétone. Après réhydratation, les coupes décolorées sont plongées dans la solution oxydante.

Cette solution est constituée d'un mélange de :

KMnO <sub>4</sub> à 2,5%	1 volume
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 5%	1 volume
Eau distillée	100 à 500 volumes (à adapter)

Les lames sont plongées dans cette solution pendant 90 secondes. A titre d'exemple, pour l'éluion des anticorps anti-VIP, le mélange ci-dessous comportait au plus 500 volumes d'eau.

Les lames sont rapidement plongées dans une solution de métabisulfite de sodium à 0,5% pour éliminer la légère teinte brune induite par ce traitement. Les coupes sont rincées à l'eau, puis dans différents bains de tampon de Coons avant de subir la deuxième réaction. Le contrôle de l'éluion est toujours réalisé en effectuant une réaction immunohistologique complète, le sérum spécifique est alors remplacé par du sérum normal de lapin non immunisé. Lors de l'examen microscopique des coupes, aucun signal ne doit être détecté.



### **b) Technique de double marquage en immunofluorescence.**

L'intérêt de cette technique est de permettre une visualisation simultanée de deux, voire trois antigènes distincts, colocalisés ou non dans une même structure histologique.

Il est préférable d'utiliser des immunsérums spécifiques provenant d'espèces phylogénétiquement éloignées afin de réduire les risques de réactions croisées.

Un cocktail réunissant différents immunsérums spécifiques, utilisés aux dilutions habituelles, est incubé dans les conditions précédemment décrites pour un simple marquage. La révélation des complexes antigènes/anticorps spécifiques est réalisée en utilisant un cocktail approprié d'immunoglobulines marquées, à la dilution de 1/250<sup>ème</sup> pendant une heure. Compte tenu des immunsérums spécifiques dont nous disposons, nous n'avons pas été en mesure de trouver un cocktail de conjugués marqués permettant de réaliser des triples marquages qui répondent aux critères de spécificité suivants :

- Les anticorps primaires utilisés sont jugés spécifiques selon les critères préalablement décrits.
- la distribution des immunoréactivités correspondant à un antigène donné doit être identique en simple et double marquage.
- les cocktails d'anticorps secondaires ne doivent pas marquer les tissus lorsqu'ils sont utilisés sur des coupes non préalablement incubées avec les Ac primaires.
- chaque anticorps primaire ne doit pas donner de marquage après révélation par un (ou les) anticorps secondaire(s) hétérologue(s).
- chaque Ac primaire révélé par le cocktail de conjugués marqués ne doit donner qu'un type de fluorescence correspondant à celle de son conjugué spécifique.
- les cocktails d'anticorps primaires, utilisés sur des coupes contenant des structures où les antigènes ne sont pas colocalisés, doivent, après révélation par les cocktails d'anticorps secondaires, marquer des structures différentes.

### **7°) Réaction histochimique de deshydrogénation (activité NADPH-diaphorase).**

Une réaction histochimique permet, entre autre, la détection histologique du système enzymatique de synthèse des oxydes nitiques (NO) ou monoxydes d'azote (revue in SNYDER, 1992). Cette réaction est

compatible avec le type de fixation que nous avons utilisé en immunohistologie. Les coupes destinées aux études immunohistologiques ont donc pu être utilisées.

Les coupes sont préincubées 1 heure dans une solution de Tris-HCl 0,1 M, pH 8 contenant du Triton X100 (0,1%). Elles sont ensuite incubées de 10 minutes à 1 heure, à température ambiante, dans du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8 contenant :

- 0,3% de Triton X100
- 2,2 mM de NADPH (Sigma)
- 0,6 mM de "*nitroblue tétrazolium*" (NBT) (Sigma)

Au cours de la réaction enzymatique, l'oxydation du NADPH s'accompagne d'une réduction du NBT. Cette dernière se traduit par l'apparition d'une coloration bleue caractéristique. La réaction est réalisée à l'obscurité mais elle peut être suivie au microscope optique ; quand elle est satisfaisante, elle est stoppée par immersion des lames dans différents bains de tampon de Coons. Les lames ainsi traitées peuvent subir une réaction immunohistologique classique, ce qui permet de coupler cette détection de réaction de deshydrogénation à celle de divers antigènes tissulaires.

## B - TECHNIQUES D'HYBRIDATION *IN SITU*

Toutes les manipulations effectuées dans le but d'étudier les ARN messagers (ARNm) ont été réalisées avec des gants stériles et du matériel traité contre les RNAses. L'eau bidistillée utilisée pour la préparation des solutions a été autoclavée 2 heures à 120°C et la verrerie a séjourné plus d'une heure à 200°C.

### 1°) Détection des ARN messagers codant pour le NPY

Nous avons utilisé une sonde oligonucléotidique homologue de 30 nucléotides, dont la séquence est complémentaire de la partie 837-866 de l'ARNm codant pour le NPY (NEN, Dupont de Nemours).

5' CTC-GCC-CGG-ATT-GTC-CGG-CTT-GGA-GGG-GTA 3'

### 2°) Marquage de la sonde

Le marquage de la sonde a été réalisé par la méthode de "*tailing*" qui consiste à ajouter des nucléotides marqués à son extrémité 3'OH libre

grâce à la *Terminal deoxynucleotidyl transférase*. Cette enzyme incorpore à cette extrémité des nucléotides triphosphates.

#### a) Protocole de marquage de la sonde

La sonde est mise en solution dans l'eau à la concentration de 10 ng/ $\mu$ l et stockée à - 20°C.

Le marquage est réalisé à 37°C pendant 2 heures ; le milieu de marquage comprend :

- 5  $\mu$ l de sonde dénaturée (3 min à 70°C).
- 2  $\mu$ l de tampon 10X (1)
- 4  $\mu$ l de  $^{35}$ SdATP (activité spécifique 1200 Ci/mmmole)(NEN)
- 7 Unités de *Terminal deoxynucléotidyl transférase* (NEN)
- 2  $\mu$ l d'eau bidistillée.

La réaction enzymatique est stoppée par apport de 1  $\mu$ l de solution d'EDTA 0,5 M pH 7,4 ; on ajoute ensuite 5  $\mu$ l d'une solution d'ARN de transfert (Sigma) à 1mg/ml d'eau (entraîneur).

(1) : Tampon de marquage 10X (concentré 10 fois)

<i>Cacodylate de sodium</i>	2,14 g
<i>MnCl<sub>2</sub></i>	19,7 mg
<i>MgCl</i>	9,5 mg
<i>Dithiothréitol (DTT)</i>	15,4 mg
<i>Eau bidistillée stérile</i>	100 ml

#### b) Purification de la sonde marquée

La sonde est séparée des nucléotides libres par chromatographie d'exclusion sur colonne (BioRad) remplie de gel Séphadex G 50 medium (Pharmacia). La purification sur colonne permet de bien s'assurer du marquage de la sonde.

Pour une colonne de 5 ml, le gel est préparé en mélangeant dans un bécher

- 0,6 g de Séphadex G 50 medium
- 100ml de tampon Tris-EDTA, pH 8 (1,2 g de Tris ; 0,292 g d'EDTA pour 900ml d'eau stérile, le pH étant ajusté à 8 avec de l'HCl puis le volume complété à 1 litre avec de l'eau).

Cette suspension de Séphadex est laissée une nuit à 4°C pour hydrater les billes. Le jour du marquage, elle est utilisée pour remplir la colonne. On prend soin de ne jamais laisser le gel se dessécher pendant cette manipulation et les suivantes. On dépose la solution contenant la sonde au niveau du gel et on établit un flux continu de tampon Tris-EDTA, pH

8. On collecte 20 fractions de 10 gouttes chacune et l'on dépose ensuite 2  $\mu$ l de chacune de ces fractions sur du papier filtre afin de compter la radioactivité (compteur LKB à scintillation liquide). Les premières fractions très radioactives, qui correspondent à la sonde marquée, sont réunies. La sonde est ensuite précipitée une nuit à - 20°C ou plusieurs heures à - 80°C par addition d'acétate de sodium 3 M, pH 4,8 et d'éthanol absolu préalablement réfrigéré à - 20°C dans les proportions volumiques suivantes 1 : 0,1 : 2 à 3.

### 3°) Hybridation sur coupes histologiques

#### a) Fixation et congélation des coupes

Les surrénales sont traitées comme pour l'immunohistologie jusqu'à l'obtention des coupes à congélation, à cette différence près qu'on utilise des tampons appropriés et du matériel traité contre les RNases.

#### b) Préhybridation

Les tampons utilisés pour la préhybridation, l'hybridation et les lavages sont préparés par dilution de solutions mères concentrées. La composition des solutions mères concentrées (X), est la suivante.

**SSC 20X** : (cette solution peut être autoclavée et stockée à 4°C)

- NaCl (Sigma)	175,25 g
- Citrate trisodique (Sigma)	88,25 g
- H <sub>2</sub> O	1 litre

**Denhardt 100X** : (stockage à - 20°C)

- Sérum albumine bovine (Sigma)	2 g
- Polyvinylpyrrolidone (Sigma)	2 g
- Ficoll (Sigma)	2 g
- H <sub>2</sub> O	100 ml

**Sarcosyl 20X** : (stockage à - 20°C)

- N-laurylsarcosine (Sigma)	2 g
- H <sub>2</sub> O	100 ml

**Dithiothréitol (DTT) 1 M** : (stockage à - 20°C)

- DTT (Sigma)	0,77 g
- H <sub>2</sub> O	5 ml

Les lames sont préincubées, 10 puis 45 minutes, à température ambiante dans une solution constituée de 100 ml de SSC 4X et 1 ml de Denhardt 100X. Elles sont ensuite plongées 10 minutes dans du tampon pH 8 constitué de SSC 4X additionné de triéthanolamine (1,3 ml / 100 ml) et d'anhydride acétique (250  $\mu$ l / 100 ml). Les lames sont ensuite deshydratées rapidement dans trois bains d'éthanol absolu avant d'être séchées à l'air, à l'abri de la poussière.

Pendant la préhybridation, la sonde précipitée est centrifugée (20 minutes à 10000 tours/min.) puis, après élimination du surnageant, elle est diluée dans le tampon d'hybridation de manière à obtenir une concentration finale de 0,25 ng / 20  $\mu$ l.

### c) Hybridation

Le tampon d'hybridation est préparé extemporanément ; sa constitution est la suivante :

- SSC 8X	100 ml
- Formamide déionisé	100 ml
- Sarcosyl 20X	10 ml
- Denhardt 100X	2 ml
- DTT 1 M	2,5 ml
- Tampon Phosphate 1,2 M, pH 7,2	20 ml
(5,34 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ et 1,87 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ dans 35 ml d' $\text{H}_2\text{O}$ )	

Les coupes sont recouvertes d'un volume approprié de tampon d'hybridation contenant la sonde marquée et incubées 16 heures à 40°C en chambre humide.

### d) Lavages

Une augmentation de la température associée à une diminution de la force ionique par rapport aux conditions d'hybridation, permettent d'éliminer, sinon de réduire, le bruit de fond.

Les lames sont rincées successivement, sous agitation douce, dans les bains suivant :

- SSC 4X et 50 mM DTT : 10 min à température ambiante (T°A)
- SSC 4X : 20 min à T°A
- SSC 1X : 10 min à T°A
- SSC 1X : 40 min à T°A
- SSC 1X : 10 min à 37°C

- SSC 1X : 40 min à 37°C

Après une déshydratation dans 3 bains d'éthanol absolu, les lames sont séchées à l'air.

**e) Radioautographie en microscopie photonique**

Après séchage, les lames sont plongées dans une émulsion liquide photographique (Kodak) à 40°C, en lumière inactinique. Les lames sont ensuite séchées toute la nuit, à l'obscurité, puis stockées, en présence d'un gel dessiccateur (actigel), dans des boîtes adaptées à l'autoradiographie, à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'émulsion est révélée pendant 2 minutes 30 dans une solution de D19 (Kodak) après une durée appropriée d'exposition (7 à 15 jours) puis fixée dans une solution de thiosulfate de sodium à 30% dans l'eau. Après trois rinçages de 10 minutes dans l'eau courante, les coupes sont colorées au bleu azur en solution à 5/1000 (poids/volume). Elles sont ensuite déshydratées et recouvertes d'une lamelle avec du milieu de montage (Eukitt) pour permettre l'examen des coupes en microscopie photonique.



### III- RESULTATS

#### A - Localisation de neuropeptides et d'amines biogènes dans la glande surrénale de l'adulte.

Les observations rapportées ici concernant la distribution du NPY et de ses ARNm sont relatives à des surrénales de rats mâles et femelles. Celles concernant la localisation d'autres neuropeptides ont été faites essentiellement sur des surrénales gauches de mâles adultes. Nous avons focalisé notre attention sur le marquage de structures clairement identifiées comme cellules chromaffines, neurones ganglionnaires et fibres nerveuses surrénaliennes.

##### 1°) Les cellules chromaffines

Les cellules chromaffines sont les cellules les plus abondantes de la médullosurrénale (Figure 1-1) ; elles sont caractérisées, en microscopie photonique, par leur forme polygonale et leur diamètre compris entre 7 et 15  $\mu\text{m}$ . Elles sont associées en îlots plus ou moins bien délimités, généralement réunis au sein d'une structure centrale, la médullosurrénale (Figure 1-2). Toutefois, quelques amas de cellules chromaffines peuvent former des digitations qui s'immiscent entre les cellules stéroïdogéniques du cortex surrénalien. Dans la surrénale de rats mâles et femelles, le NPY est exprimé dans la majorité des cellules chromaffines identifiables par un fort marquage par les immunoglobulines (IgG) anti-TH (Figure 1-1 A et B). Ces cellules chromaffines contiennent également des ARNm de ce neuropeptide (Figure 1-2 B). L'intensité du marquage anti-NPY varie au sein d'un même îlot selon les cellules (Figure 1-3 B) et d'un îlot à l'autre (Figure 1-1 B). De plus, le nombre de cellules NPYergiques varie d'une surrénale à l'autre ; néanmoins, ces cellules sont toujours très abondantes et majoritaires. Les immunosérums permettant la mise en évidence des structures NPYergiques ne donnent pas des marquages équivalents dans les cellules chromaffines. L'immunosérum de cobaye anti-NPY (cNPY), utilisé pour la technique de double marquage, ne révèle pas les cellules faiblement marquées par les immunosérums anti-NPY (12) ou anti-C-PON. De plus, l'examen de coupes adjacentes nous a permis d'établir que l'anti-C-PON donne un marquage de plus forte intensité que le 12 dans ces cellules.

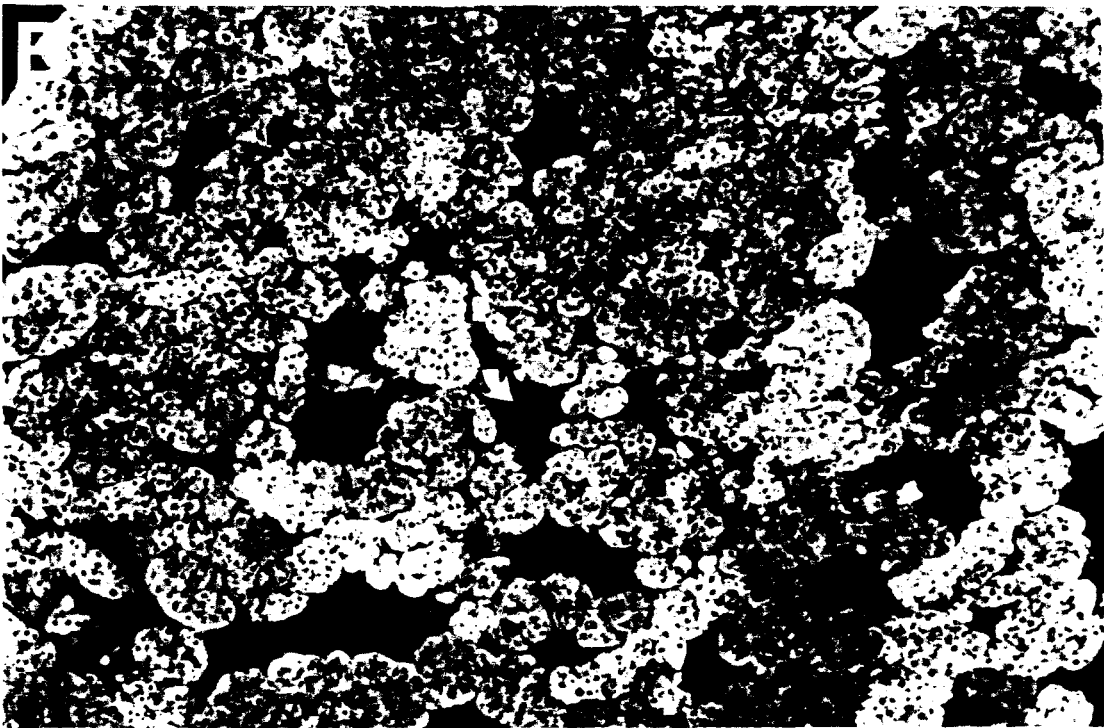
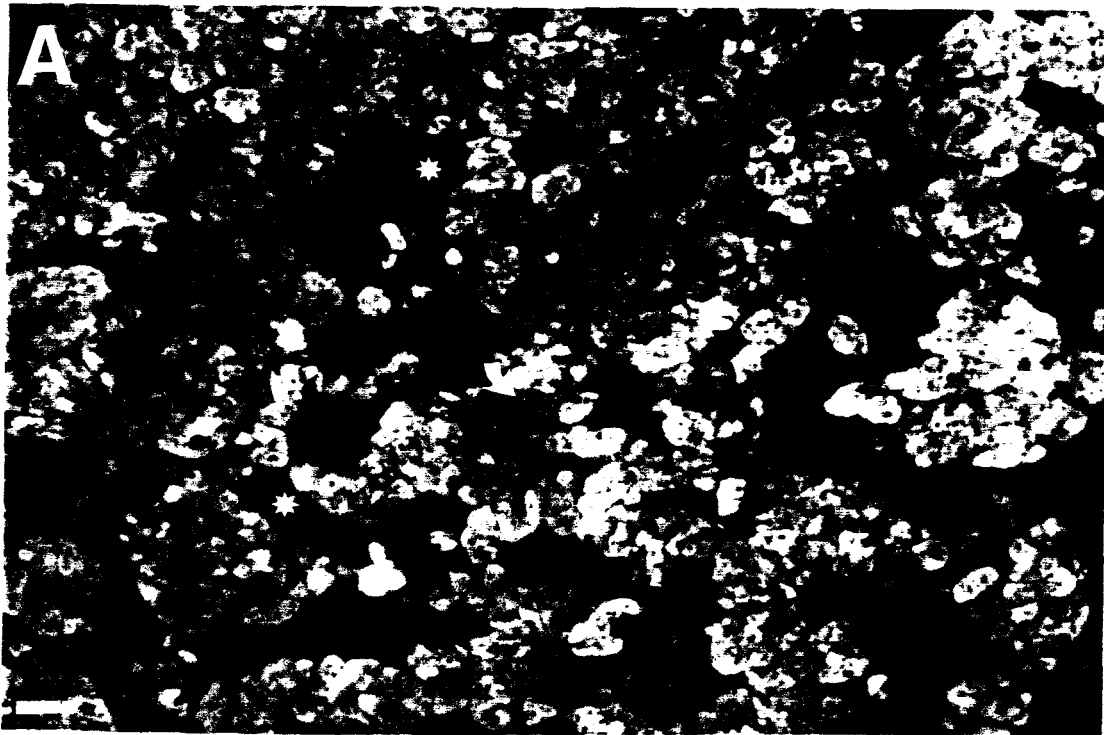


Figure 1-1

Double marquage NPY/TH (A/B) en immunofluorescence dans la médullosurrénale de rat adulte. La totalité des cellules chromaffines est marquée par l'anti-TH (fluorescence orange : RITC) et la majorité de ces cellules est NPY positive [NPY(+)] (fluorescence verte : FITC). Les deux marquages varient d'un îlot de cellules chromaffines à l'autre : les îlots intensément marqués par l'anti-TH sont généralement dépourvus de marquage anti-NPY (étoiles). Un groupe de neurones NPY positif (+) et TH (+) est visible au centre du champ (flèche courbe) ; dans ces neurones, l'intensité du marquage anti-TH est beaucoup plus faible que dans les cellules chromaffines. Barre en A : 50  $\mu$ m

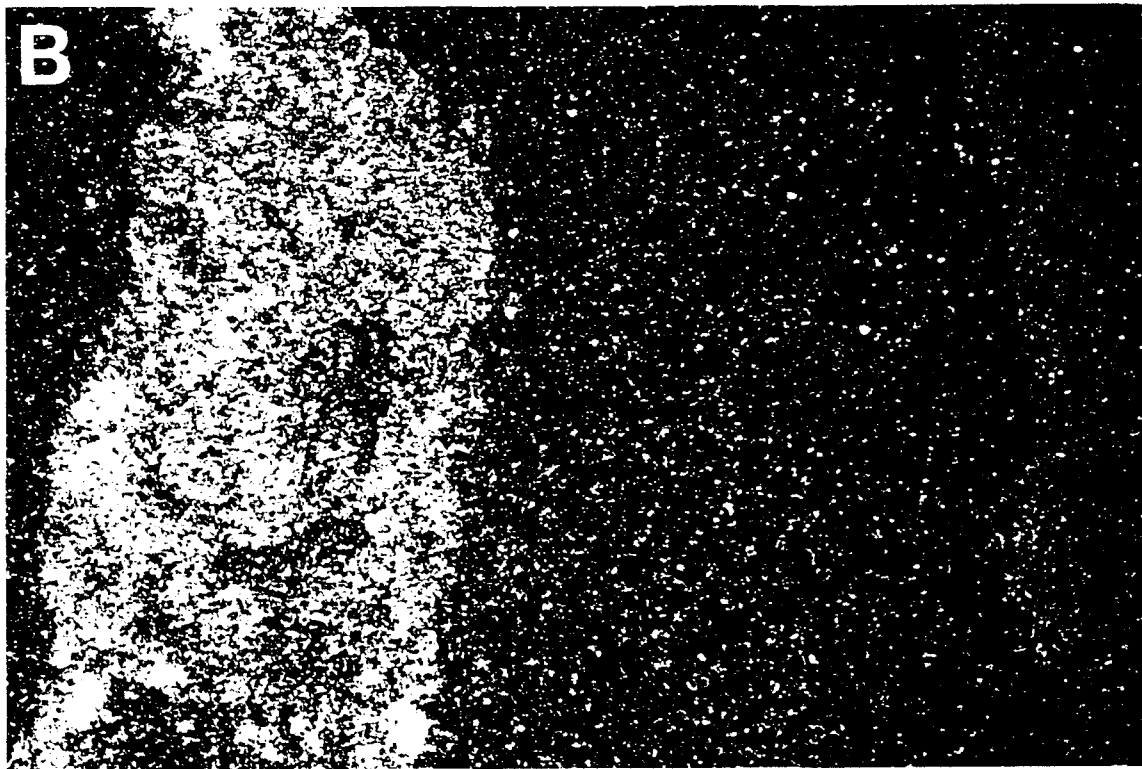
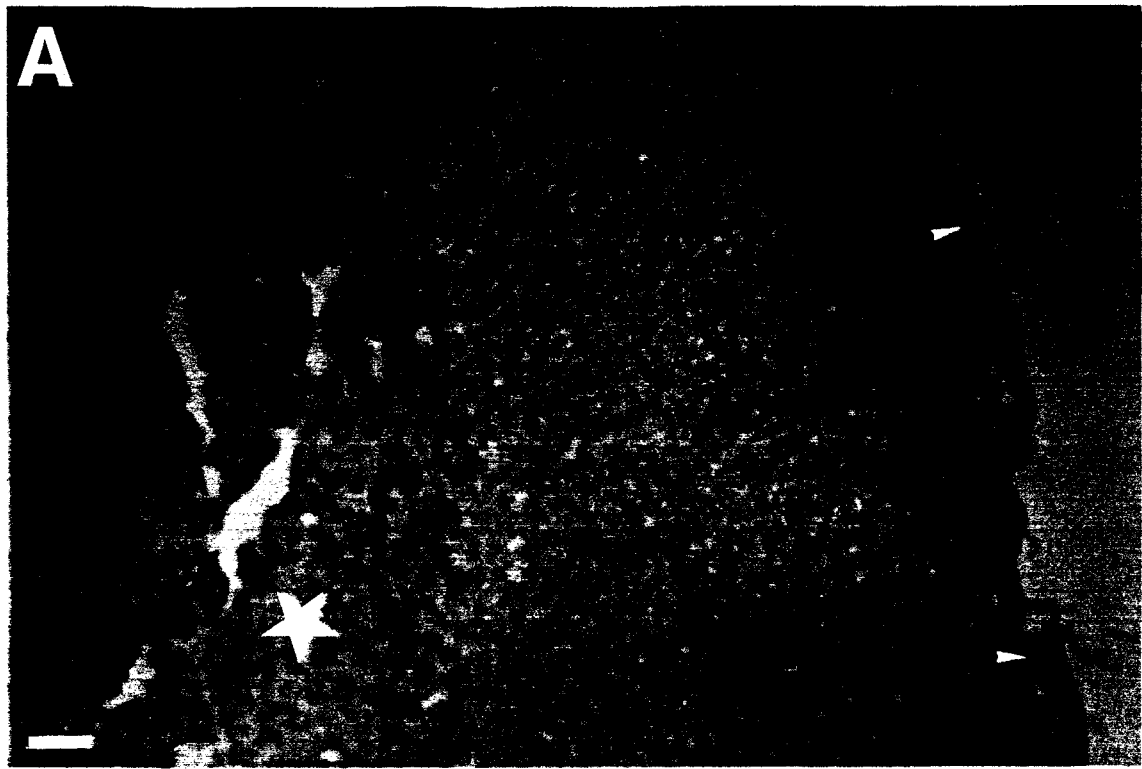


Figure 1-2

Détection du NPY (A) et de ses ARN messagers (B) sur des coupes d'une surrénale de femelle adulte. Le peptide est révélé en immunohistoenzymologie (A) (révélation à la DAB) ; les ARN messagers sont détectés par hybridation *in situ* grâce à un oligonucléotide marqué par le  $^{35}\text{S}$  (B). A ce grossissement, le marquage immunohistoenzymatique n'apparaît pas intense dans toutes les cellules médullosurrénaliennes (étoile en A). Néanmoins, l'immunomarquage et le signal d'hybridation *in situ* sont spécifiquement associés au tissu chromaffine (étoile en A). Des fibres nerveuses marquées par l'anti-NPY sont observables dans la zone capsulo-glomérulaire (pointes de flèches en A). Barre en A : 75 $\mu\text{m}$



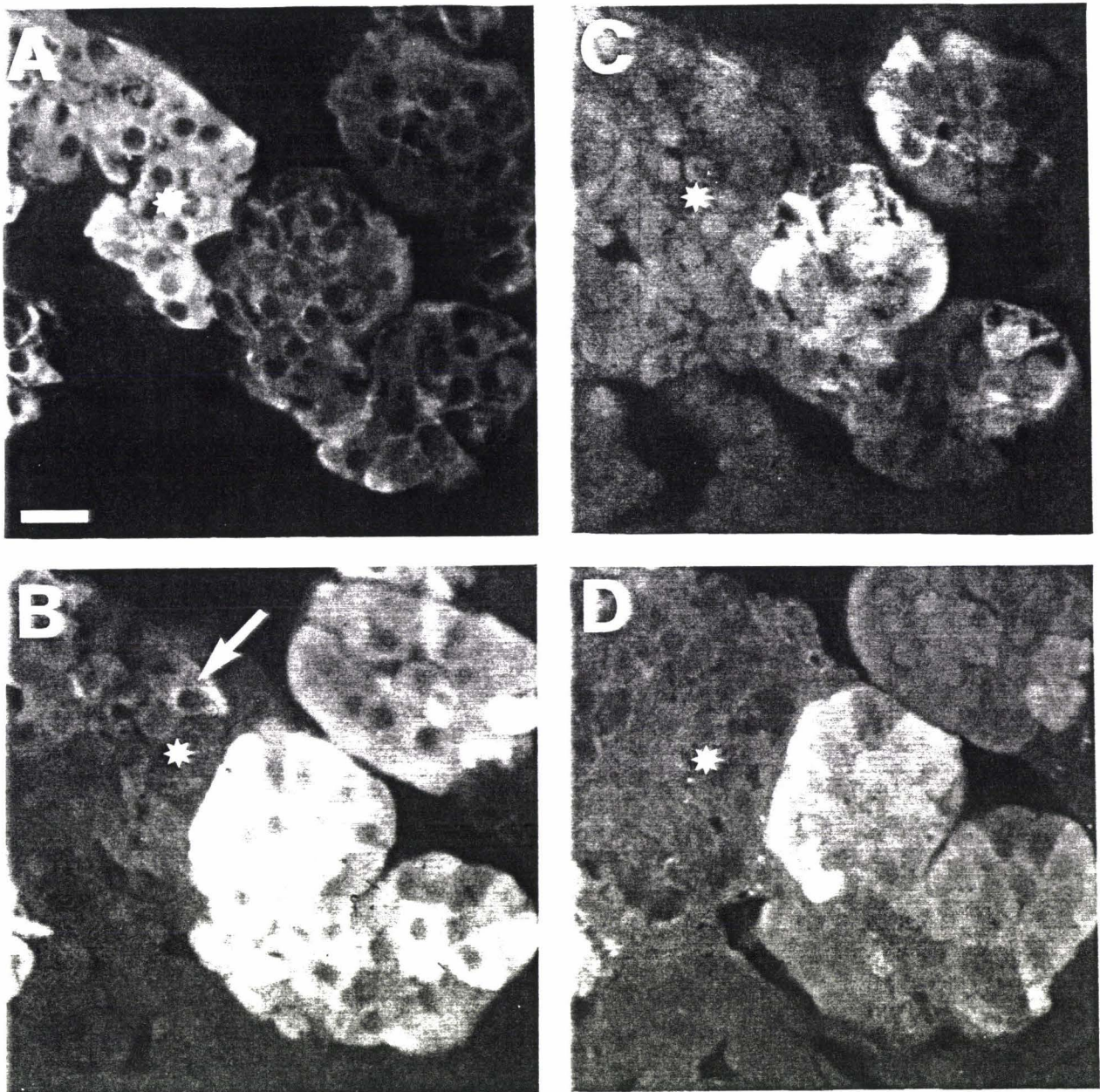


Figure 1-3

Cellules chromaffines. Double marquage TH/5-HT (A/C) et marquages anti-C-PON (B) ou anti-PNMT (D) sur des coupes adjacentes.

Le marquage anti-C-PON (B) est principalement détecté dans les îlots de cellules adrénérgiques caractérisées par un marquage anti-PNMT (D) ou anti-5-HT (C). L'îlot de cellules fortement TH immunoréactif (étoile), dépourvu de marquage anti-PNMT et anti-5HT, est un îlot noradrénérgique. Un faible marquage anti-C-PON est visible dans une cellule de cet îlot (flèche en B). L'intensité du marquage anti-TH est généralement faible dans les îlots de cellules adrénérgiques mais toujours forte dans les îlots noradrénérgiques (étoile). Quel que soit l'immunsérum utilisé, les marquages cellulaires anti-C-PON, anti-5-HT et anti-PNMT sont toujours très hétérogènes dans les cellules des îlots adrénérgiques.

Barre en A : 10  $\mu$ m.

**a) Les amines biogènes (noradrénaline, adrénaline et sérotonine) des cellules chromaffines.**

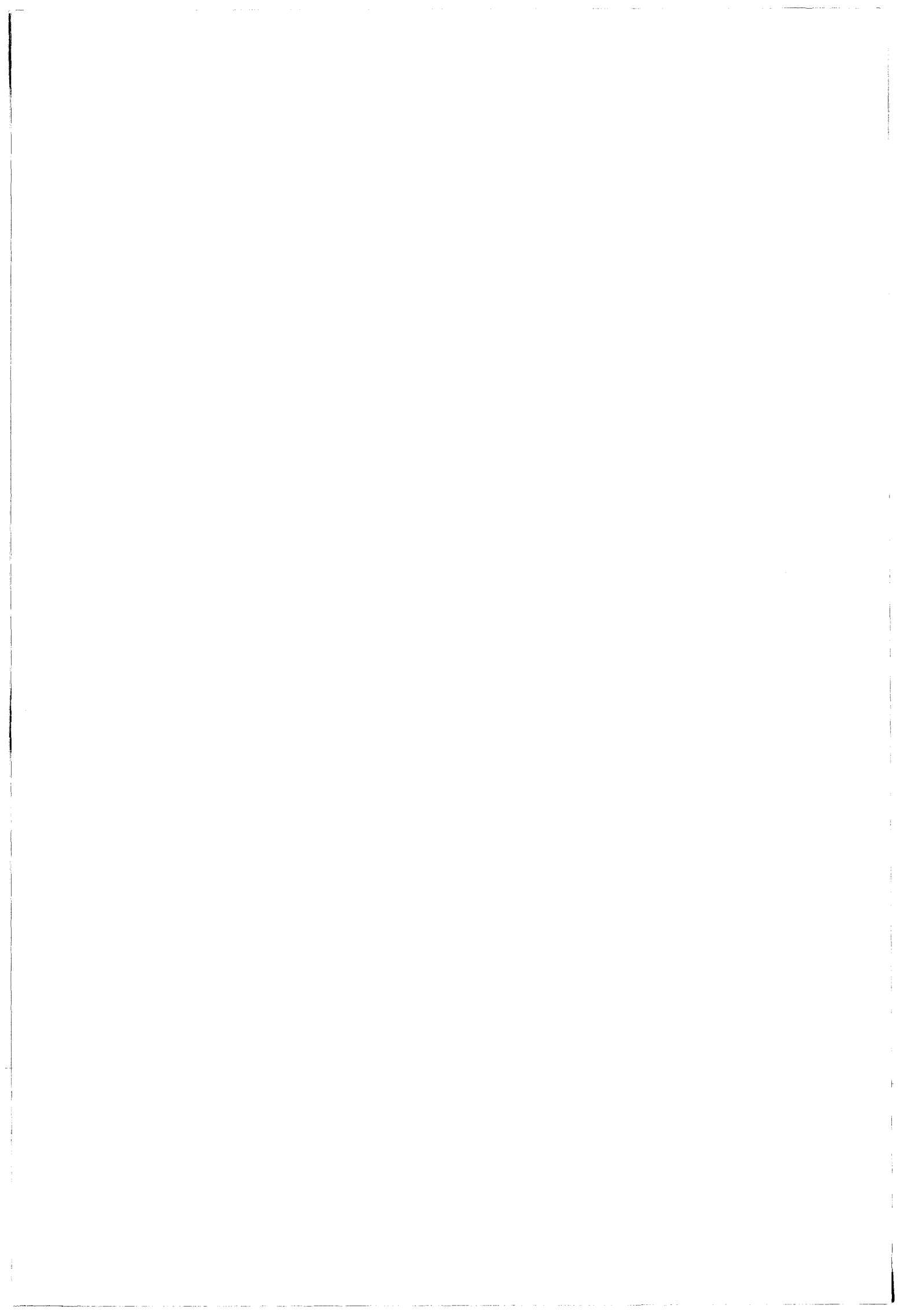
Les cellules chromaffines marquées par les IgG anti-TH forment des îlots sinueux, constitués de cellules que l'on peut qualifier d'adrénergiques ou noradrénergiques selon qu'elles présentent ou non un marquage, parfois très faible, avec un immunsérum anti-PNMT (Figure 1-3 A, D et 1-4 E). Ces îlots n'ont pas de distribution particulière ; ils existent aussi bien au centre qu'à la périphérie de la médullosurrénale. L'examen de coupes adjacentes traitées par les immunsérums anti-NPY ou anti-C-PON et anti-PNMT (Figure 1-3 B et D), ou la technique de double marquage (NPY/PNMT), nous a permis d'établir que le *NPY est principalement associé aux cellules adrénergiques, marquées par l'anti-PNMT [PNMT(+)]* (Figure 1-3 B et D). De plus, seules les cellules des îlots adrénergiques présentent un marquage avec l'anti-5-HT (Figure 1-3 C et D). Les doubles marquages NPY/5-HT ont permis d'établir la colocalisation de ces immunoréactivités dans des cellules chromaffines adrénergiques. Dans ces cellules, le marquage anti-TH est généralement de plus faible intensité que celui détecté dans les îlots de cellules noradrénergiques (Figure 1-3 A). Les cellules noradrénergiques sont toujours fortement marquées par les IgG anti-TH mais elles ne le sont généralement pas par les immunsérums anti-NPY et jamais par les anti-PNMT et anti-5-HT (Figure 1-3).

*En conclusion, le NPY est préférentiellement détecté dans les cellules adrénergiques qui, par ailleurs, sont pour la plupart sérotoninergiques et présentent en général un faible marquage anti-TH (contrairement aux cellules noradrénergiques).*

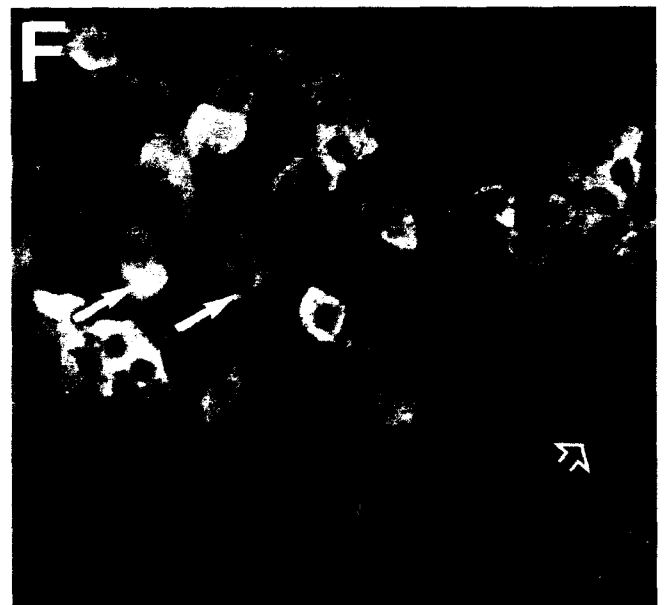
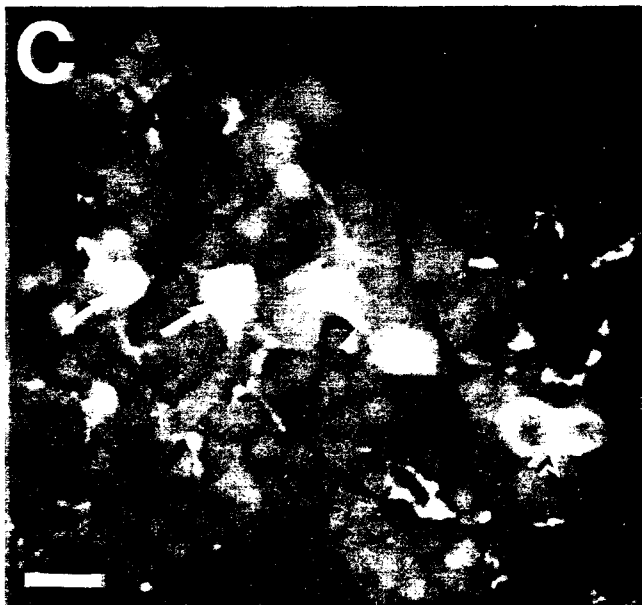
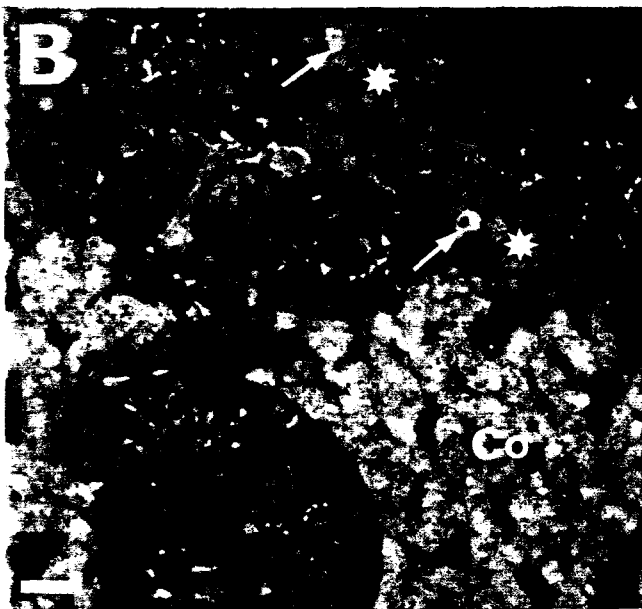
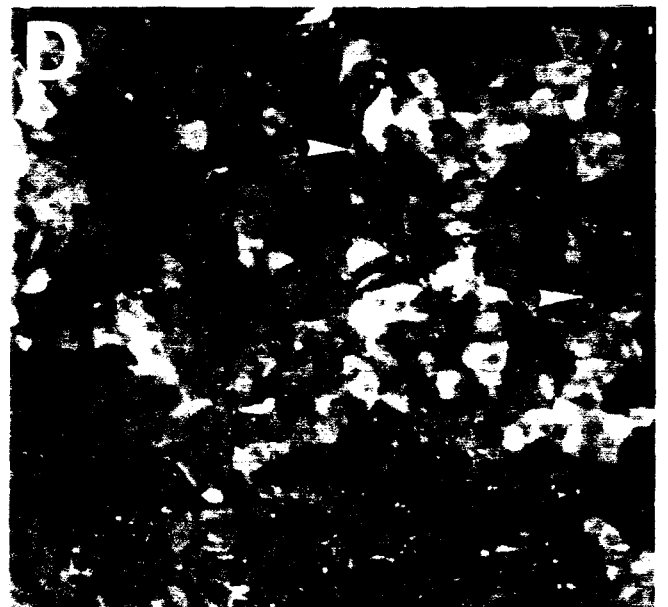
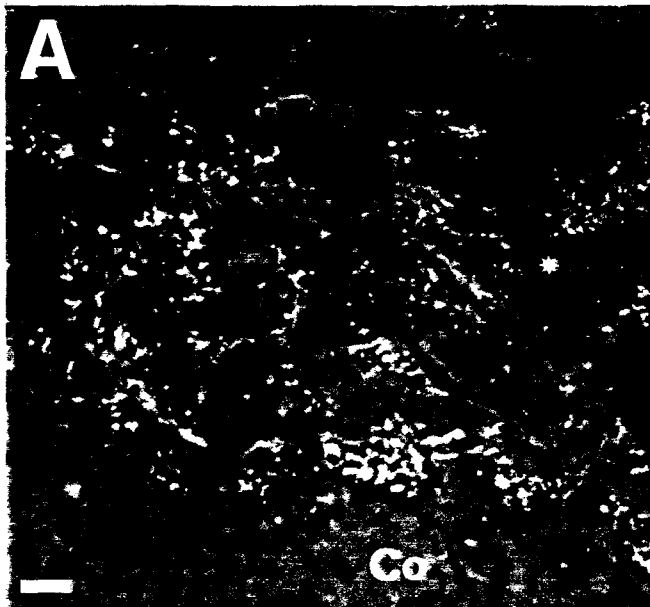
**b) Les neuropeptides des cellules chromaffines.**

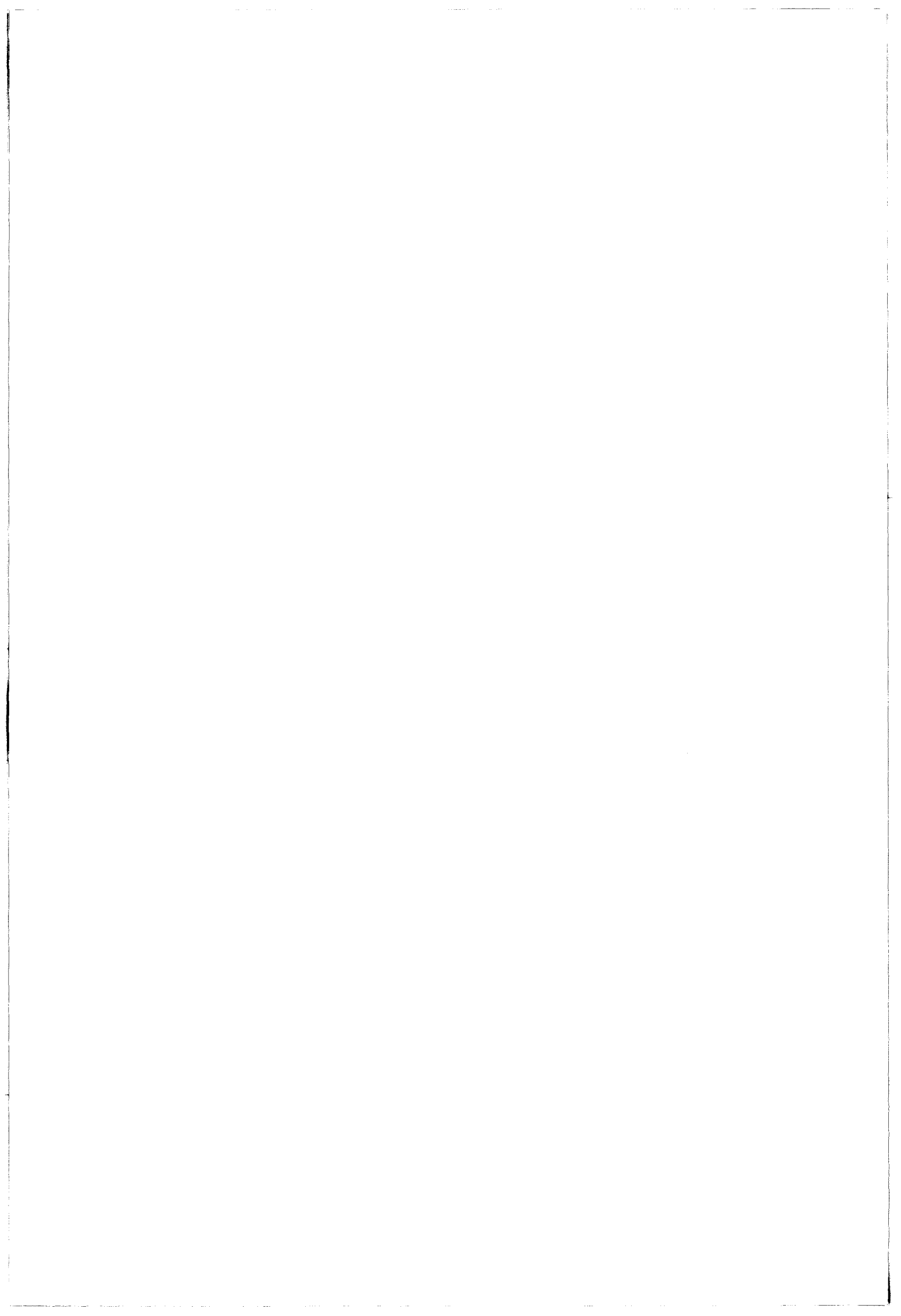
**b-1) NPY et Met-enképhaline-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>.**

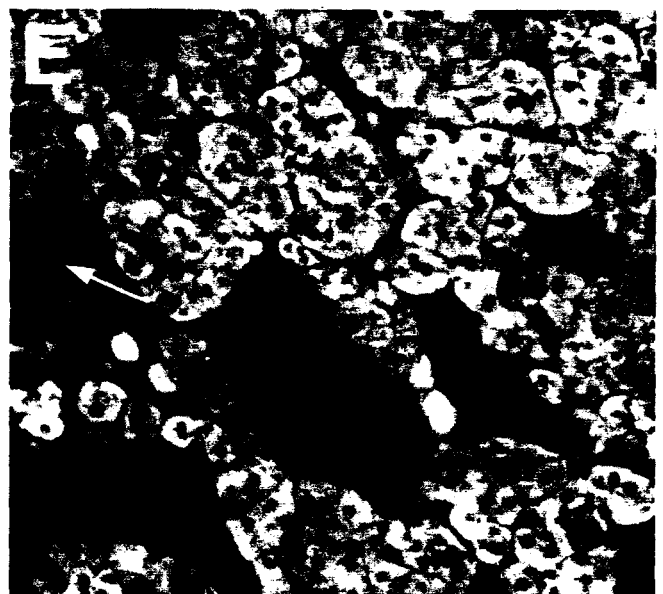
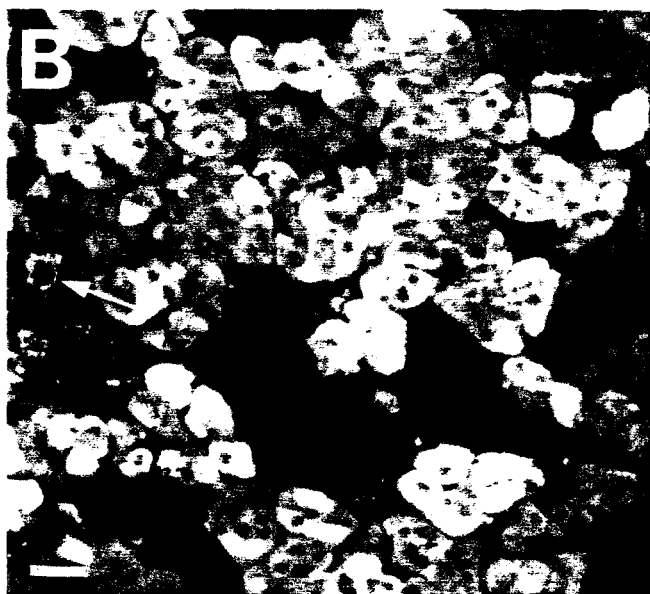
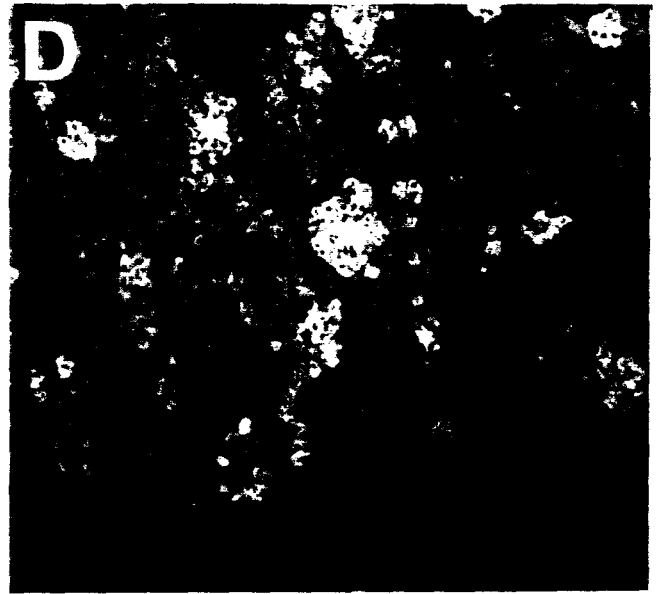
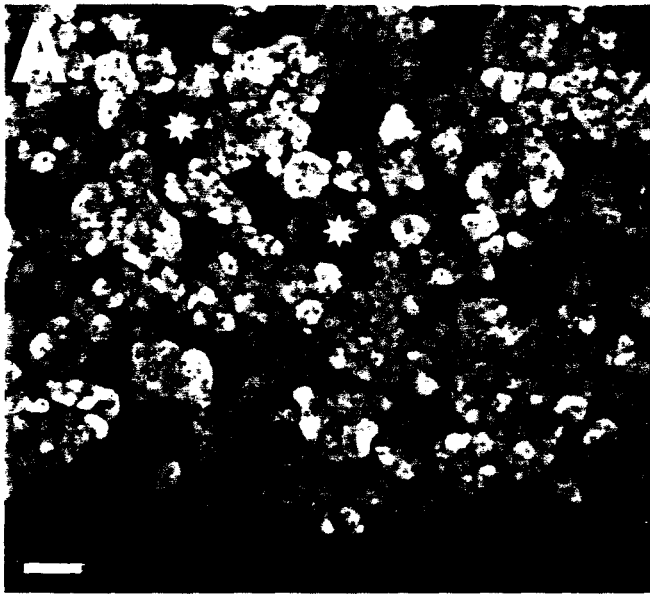
En règle générale, l'immunsérum anti-Met-enképhaline-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (anti-MERGL) révèle peu, voire pas, de cellules immunoréactives (Figures 1-4 A et B et 1-12 A), cependant, dans de rares surrénales, les cellules immunoréactives peuvent être abondantes (Figure 1-4 D). Chez ces animaux (Figure 1-4 D), nous n'avons pas observé de variations "parallèles" du marquage NPYergique et l'innervation enképhalinergique paraissait moins abondante que dans la majorité des surrénales étudiées (Figure 1-4 A et B). Le marquage anti-MERGL est souvent préférentiellement associé aux cellules noradrénergiques (Figure 1-4 B











et E) ; toutefois, un marquage peut également être détecté dans des cellules adrénérigiques (Figure 1-4 C) et ce, principalement lorsque les cellules enképhalinergiques sont abondantes (Figure 1-4 D). Les doubles marquages NPY/MERGL ont permis d'établir que ces deux immunoréactivités pouvaient être colocalisées dans des cellules adrénérigiques (Figure 1-4 C/F).

*Les cellules chromaffines sont donc généralement dépourvues de marquage anti-Met-enképhaline-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>. Dans de rares surrénales, le nombre de cellules marquées peut être important ; en général, l'innervation enképhalinergique paraît moins dense. Les rares cellules enképhalinergiques détectées sont souvent associées aux cellules noradrénérigiques mais les cellules adrénérigiques ont la capacité d'exprimer cette immunoréactivité. Dans ces dernières, une colocalisation MERGL/NPY peut parfois être observée.*

#### b-2) NPY et neurotensine (NT)

Le nombre de cellules marquées par l'immunsérum anti-NT est très variable d'un individu à l'autre (Figure 1-5 D, E et F). Bien que l'intensité de la réaction immunohistochimique soit généralement très faible (Figures 1-5 F et 1-6 A), du matériel NT-like a été révélé dans de nombreuses cellules chromaffines. Dans certaines surrénales, le marquage est principalement associé aux îlots de cellules noradrénérigiques dépourvues de NPY (Figure 1-5 A et D). Une colocalisation NPY/NT a cependant été maintes fois observée dans des cellules adrénérigiques (Figures 1-5 C/F et 1-6 A/D).

*La répartition du matériel NT-like présente de fortes variations inter-individuelles. Cette immunoréactivité, généralement très faible en intensité, apparaît associée aux îlots noradrénérigiques et/ou adrénérigiques. Une colocalisation NT/NPY a été observée dans de nombreuses cellules adrénérigiques.*

#### b-3) NPY et CGRP

Les cellules chromaffines marquées par l'anti-CGRP sont peu nombreuses (Figure 1-6 E). Elles sont généralement isolées ou en petits groupes de deux à quatre cellules au sein d'îlots de cellules adrénérigiques (Figure 1-6 E). La technique de double marquage NPY/CGRP a permis d'établir une colocalisation de ces deux immunoréactivités bien que le signal immunohistochimique obtenu avec

le cNPY soit en général faible (Figure 1-6 B/E). Nous n'avons jamais observé de CGRP dans les îlots de cellules noradrénergiques [PNMT(-)]. *Le CGRP est présent dans de rares cellules adrénérgiques et NPYergiques.*

#### b-4) NPY et galanine (GAL)

Un marquage galaninergique est observé dans de très rares cellules chromaffines (Figure 1-6 F), encore moins abondantes que les cellules à CGRP. Les cellules marquées par l'anti-GAL sont préférentiellement associées aux îlots adrénérgiques. Les doubles marquages cNPY/GAL nous ont permis d'établir que ces deux immunoréactivités pouvaient être colocalisées. Cependant, l'intensité du marquage NPYergique était toujours très faible, contrairement à celle pouvant être observée dans des cellules dépourvues de marquage anti-GAL (Figure 1-6 C et F).

#### b-5) NPY et substance P (SP)

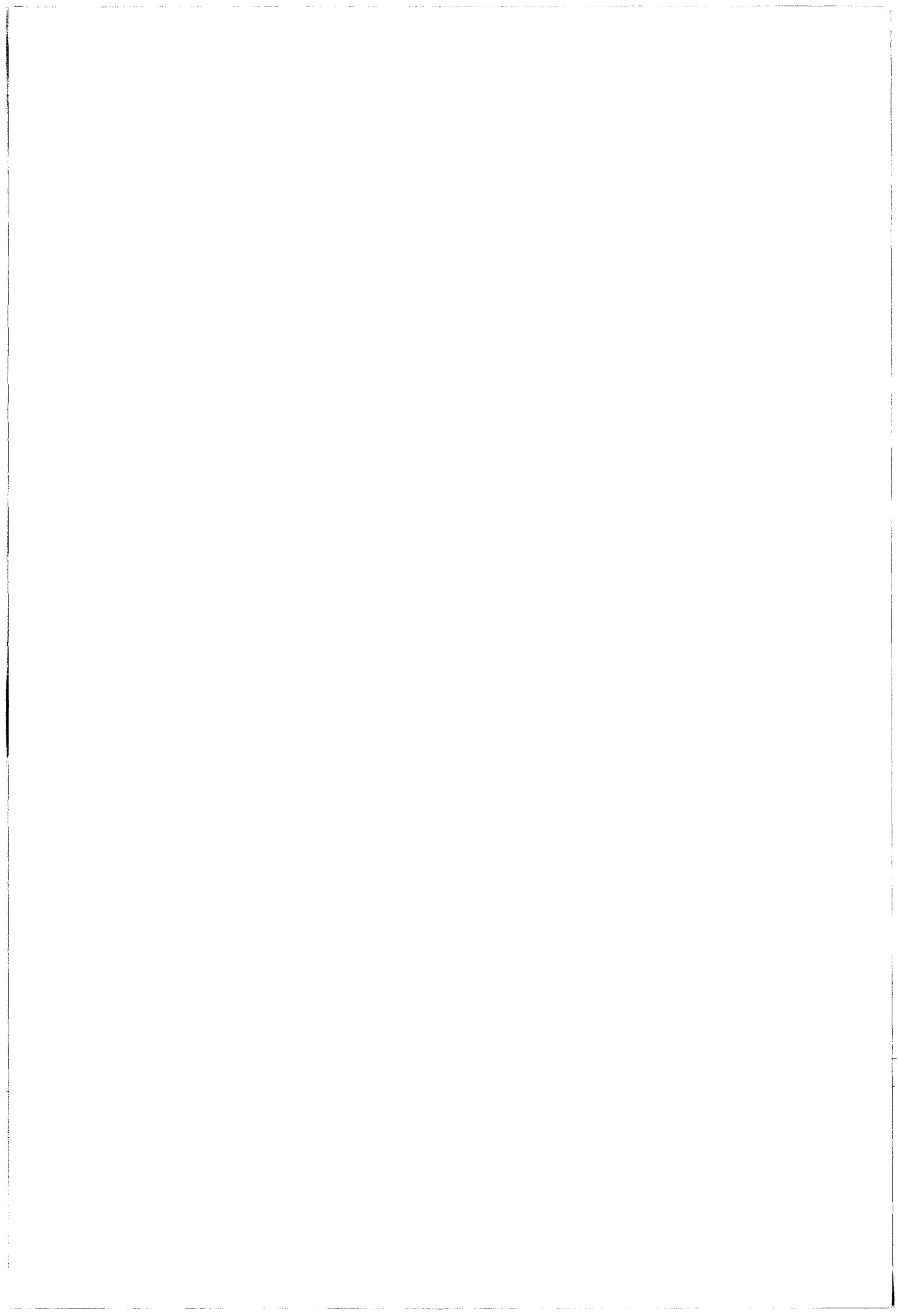
Parmi toutes les substances neuropeptidiques recherchées et détectées dans les cellules chromaffines, la SP et la galanine sont les plus rarement observées. Les doubles marquages cNPY/SP concernent très peu de cellules, toutes situées dans des îlots adrénérgiques ; toutefois l'intensité du marquage anti-NPY ne nous a jamais permis d'établir avec certitude une colocalisation de ces deux peptides dans les cellules chromaffines.

#### b-6) NPY et autres neuropeptides

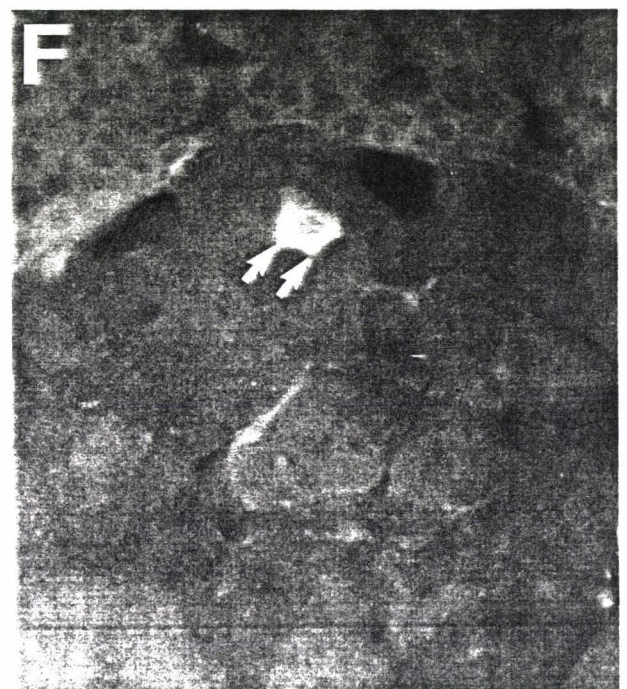
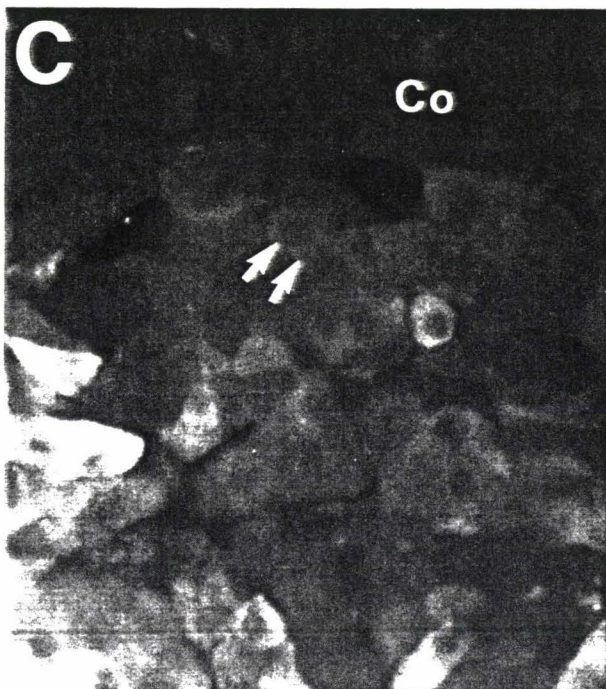
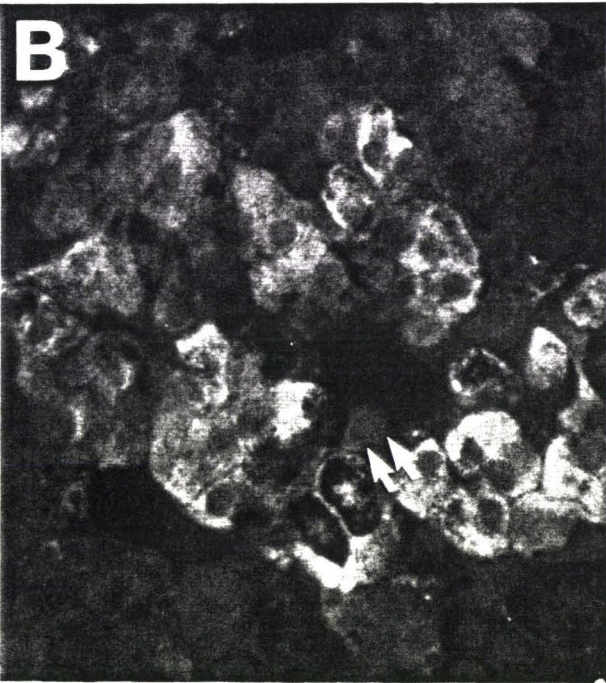
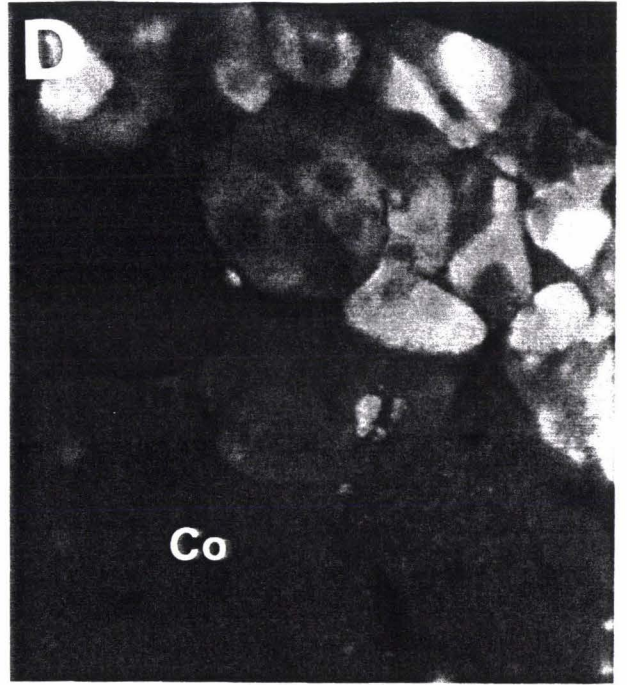
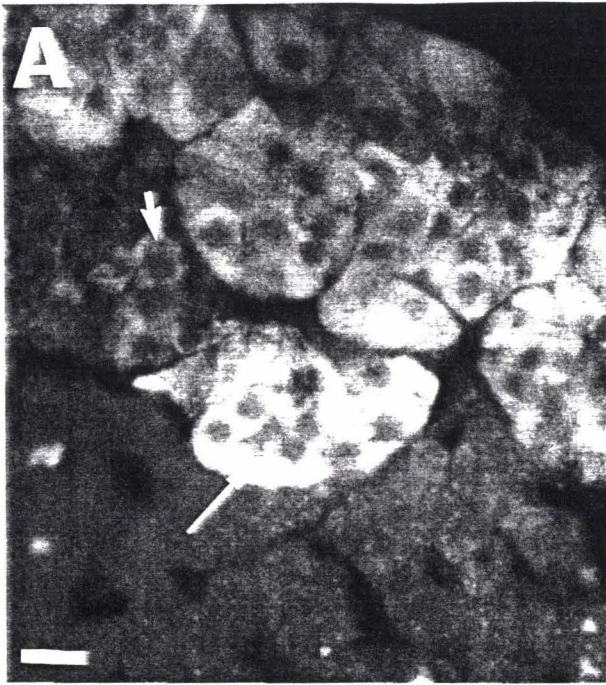
Deux immunsérums dirigés respectivement contre les parties N et C terminales de l'ACTH (ACTH<sub>1-24</sub> et ACTH<sub>18-39</sub>) ainsi qu'un immunsérum spécifique de l'hormone mélanostimulante ( $\alpha$ MSH) qui, tous trois, marquent fortement les cellules du lobe neurointermédiaire de l'hypophyse, n'ont pas permis de marquer spécifiquement les cellules chromaffines.

L'immunsérum anti-CRF que nous avons utilisé ne marque pas davantage de structures surrénaliennes.

Des immunsérums dirigés contre le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) ou une partie de son précurseur le pré-pro VIP-PHM<sub>111-122</sub> (ppVIP), l'ocytocine (OT) ou l'arginine vasopressine (AVP) et une partie de leur neurophysine associée (NP-I et NP-II respectivement), la somatostatine <sub>1-12</sub> (SRIF), la dynorphine A (DYN A), la dynorphine B (DYN B) et la cholécystokinine sulfatée (CCK<sub>8-S</sub>) ou non (CCK<sub>8</sub>), ne marquent pas les cellules chromaffines.





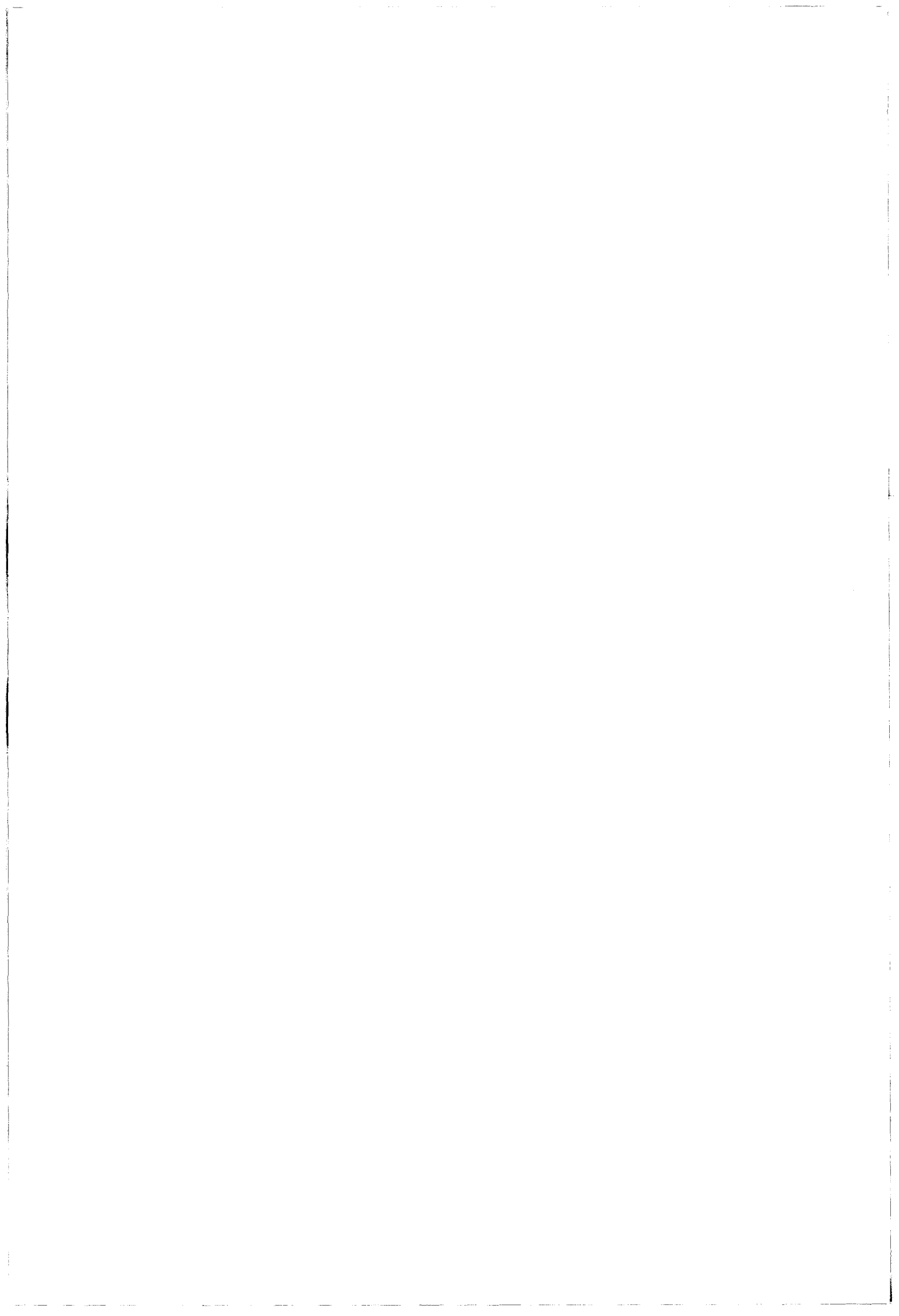


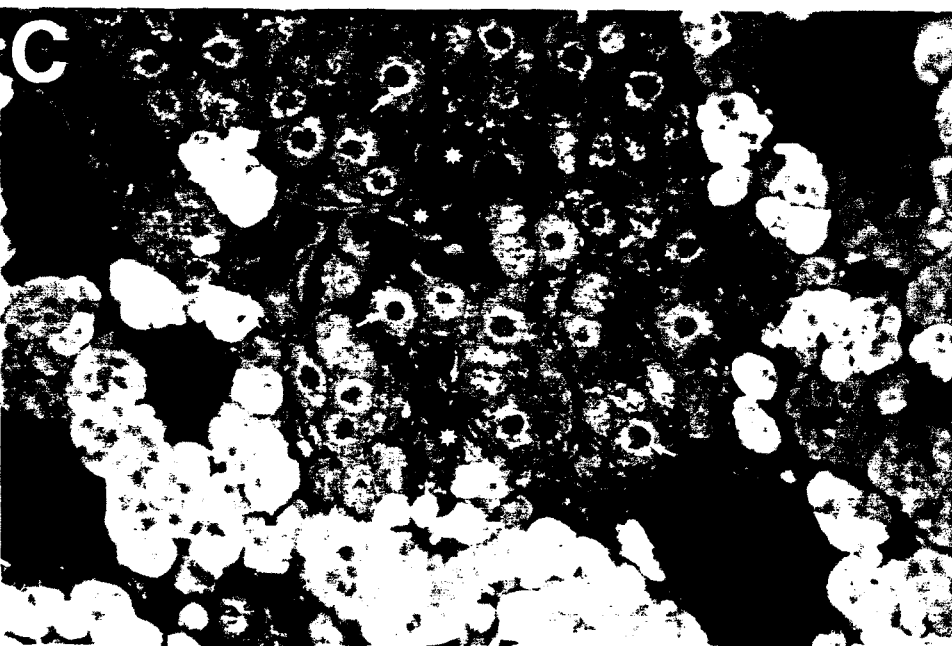
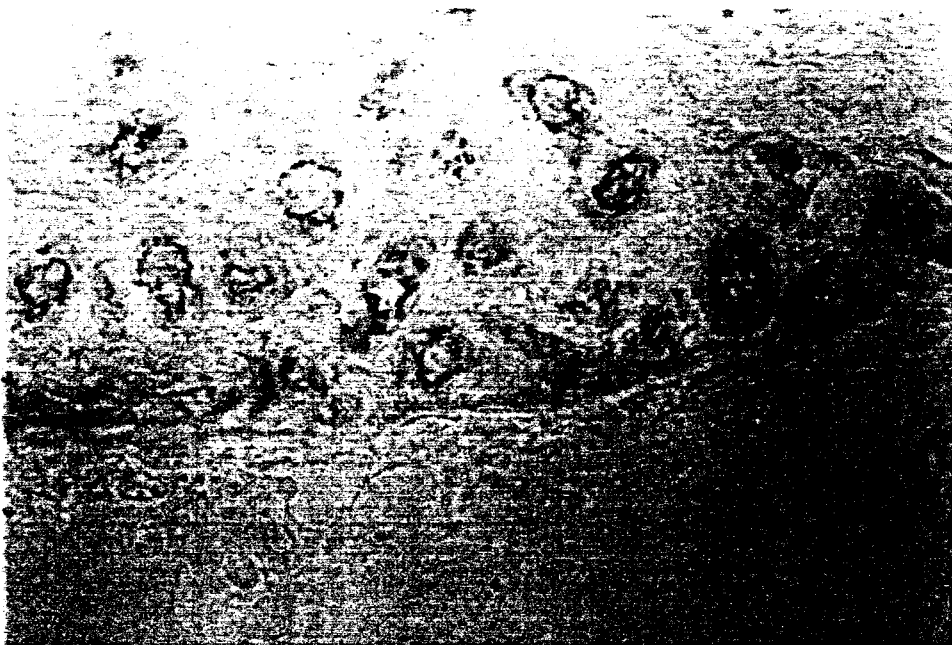
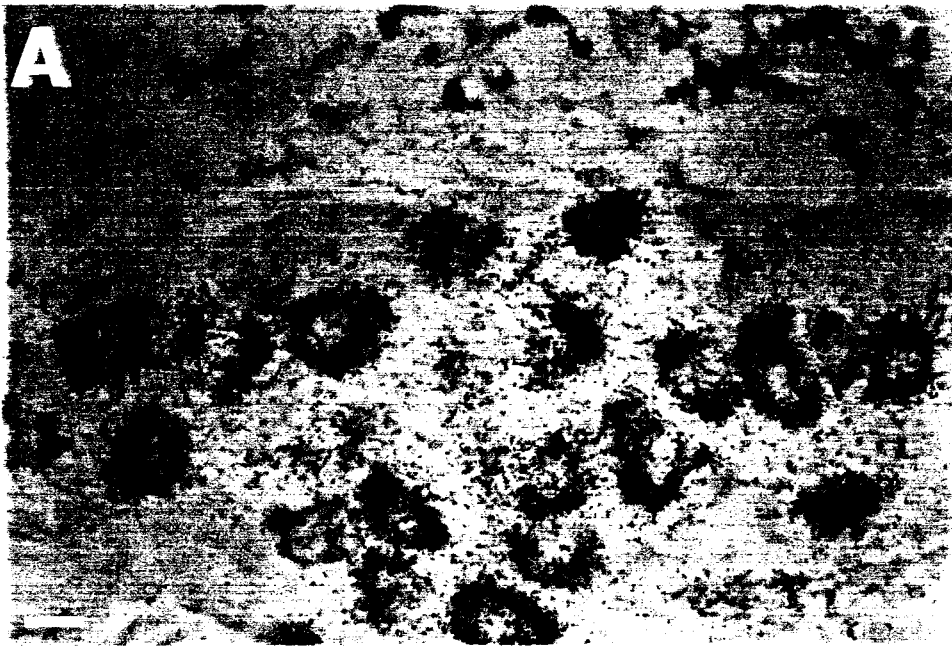


*En conclusion, dans les surrénales normales du rat, le NPY, la Neurotensine et la Met-enképhaline-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> (MERGL) sont généralement ou occasionnellement présents dans de nombreuses cellules chromaffines. Le NPY est le neuropeptide le plus fortement exprimé dans les cellules chromaffines généralement adrénérgiques. Par opposition, le CGRP, la GAL et la SP apparaissent comme des peptides mineurs dans la mesure où leur présence n'est observée que dans un tout petit nombre de cellules. L'intensité des marquages anti-neuropeptides, tout comme le nombre de cellules marquées, présentent par ailleurs une variabilité inter-individuelle parfois très surprenante. Le NPY est colocalisé dans les cellules adrénérgiques PNMT(+) avec d'autres amines (5-HT) et/ou des neuropeptides (NT, MERGL, CGRP et GAL).*

## **2°) Les neurones ganglionnaires intramédullaires**

Les neurones que nous avons détectés dans la médullosurrénale ont un diamètre compris entre 20 et 40  $\mu\text{m}$ , bien supérieur à celui des cellules chromaffines typiques (Figure 1-7 C). Leur fréquence est très variable d'un individu à l'autre. Ils se caractérisent par un marquage NPYergique de type "golgien" quel que soit l'immunsérum utilisé (Figure 1-7 C et 1-8 C). Les ganglions péricurréaliens présentent des neurones dont le marquage NPYergique est tout à fait comparable à celui des neurones intrasurréaliens (Figure 1-7 B et C). De plus, les neurones péricurréaliens (Figure 1-7 A) et intrasurréaliens possèdent les ARNm codant pour le NPY. Dans une coupe de surrénale, ces neurones sont parfois isolés (Figure 1-8 B) mais plus généralement groupés en amas pouvant comporter jusqu'à 30 neurones, voire davantage (Figure 1-7 C). Ils sont le plus souvent localisés au centre, exceptionnellement à la périphérie, de la médullosurrénale. On ne les a jamais rencontrés dans les zones corticales de la surrénale, contrairement aux cellules chromaffines. Ces neurones sont par ailleurs fréquemment localisés à





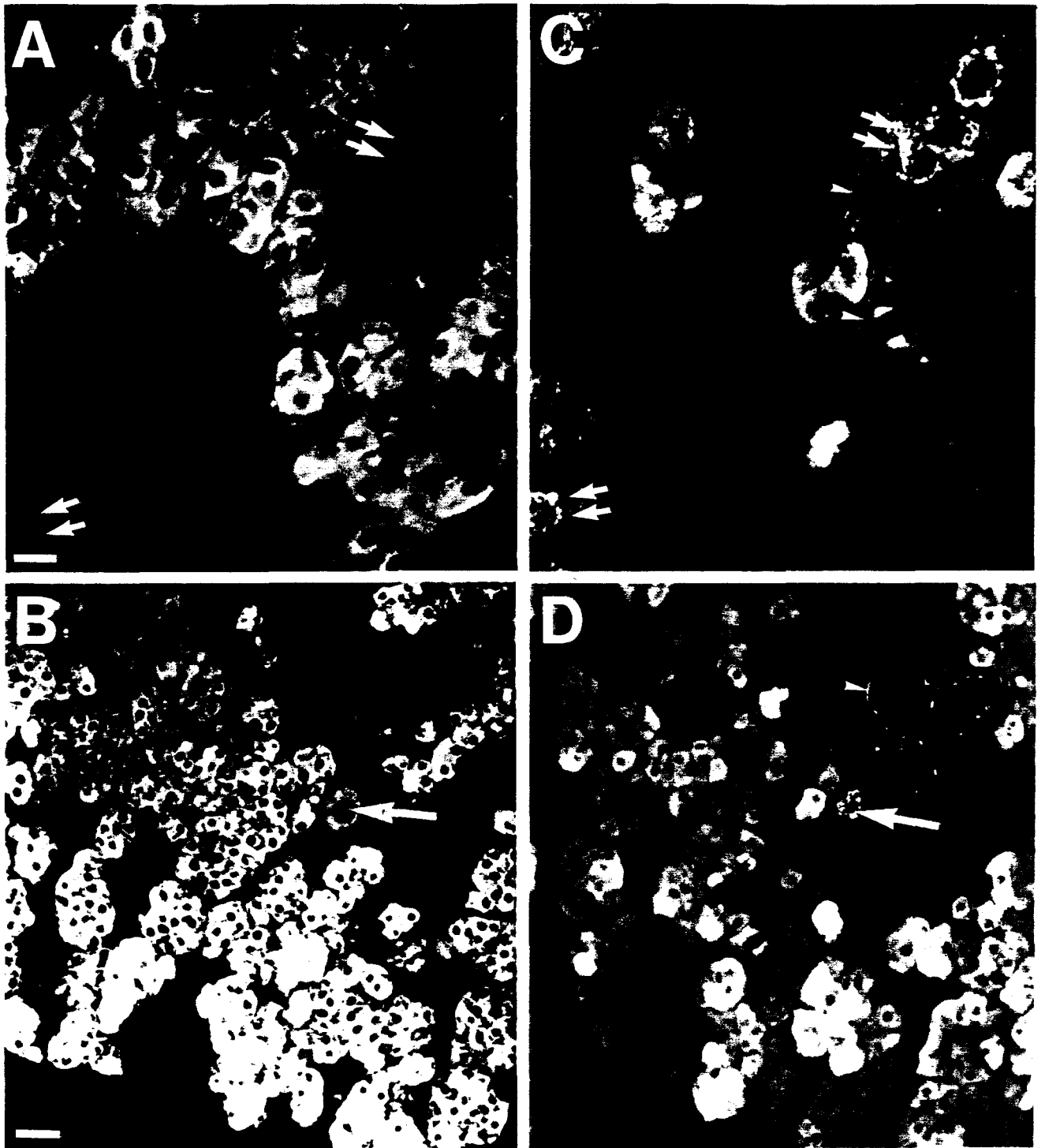


Figure 1-8  
Neurones NPYergiques intrasurrénaliens.

A et C : Double marquage réalisé avec l'anti-TH et le cNPY. Le cNPY visualise des neurones faiblement marqués par l'anti-TH (doubles flèches). Contrairement aux neurones, les cellules chromaffines sont intensément immunoréactives pour l'anti-TH.

B et D : Un neurone (flèche) réapparaît sur ces coupes adjacentes traitées par l'anti-TH (B) ou par l'anti-NPY (D).

L'innervation médulosurrénalienne NPYergique (pointes de flèche en C et D) n'apparaît généralement pas marquée par l'anti-TH.

Barre en A : 10  $\mu\text{m}$  ; barre en B : 30  $\mu\text{m}$ .

proximité de la vascularisation médullaire (Figure 1-7 C). Des expériences de double marquage ou de simple marquage sur des coupes adjacentes ont montré qu'à l'exception du marquage avec les immunsérums anti-NPY (NPY et C-PON), aucun des immunsérums dirigés contre les neuropeptides que nous avons testés ne marque spécifiquement ces neurones. Par contre, l'examen de coupes adjacentes traitées par les immunsérums anti-NPY et les IgG anti-TH ou les doubles marquages TH/NPY (12 ou cNPY) ou TH/C-PON permettent d'affirmer que ces neurones intramédullaires sont à la fois TH(+) et NPY(+) (Figures 1-1 A/B et 1-8). Dans les neurones, le marquage anti-TH est cytoplasmique et généralement de très faible intensité, contrairement à celui des cellules chromaffines (Figure 1-8 A) ; dans certains cas toutefois, ces neurones peuvent être fortement TH(+) (Figure 1-8 B). L'immunsérum de lapin anti-TH, que nous avons utilisé au cours de notre D.E.A., ne nous avait pas permis de révéler la présence d'un marquage catécholaminergique dans ces neurones. La réaction histoenzymatique mettant en évidence une activité NADPH-diaphorase marque les neurones intrasurréaliens (Figure 1-15 B). Nous avons détecté des neurones intensément marqués par l'anti-VIP ou ppVIP dans des ganglions péricurréaliens mais ce type de neurone n'est pas observé dans le tissu médullaire.

*Les neurones intrasurréaliens peuvent être caractérisés par un intense marquage NPYergique, un faible marquage anti-TH et une activité NADPH-diaphorase. Ils sont généralement associés en îlots caractéristiques comportant un nombre variable de neurones. La fréquence de ces îlots présente de fortes variations d'un individu à l'autre.*

### 3°) L'innervation surréalienne

#### a) Innervation de la corticosurréale

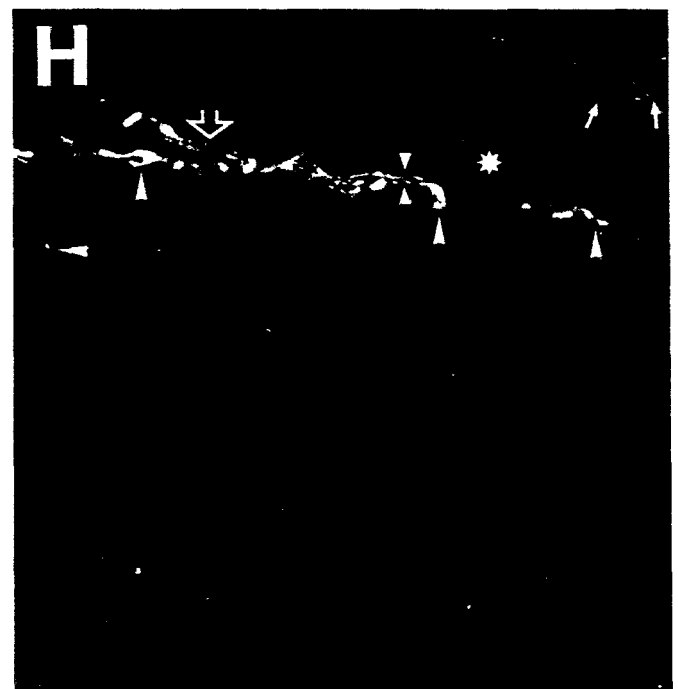
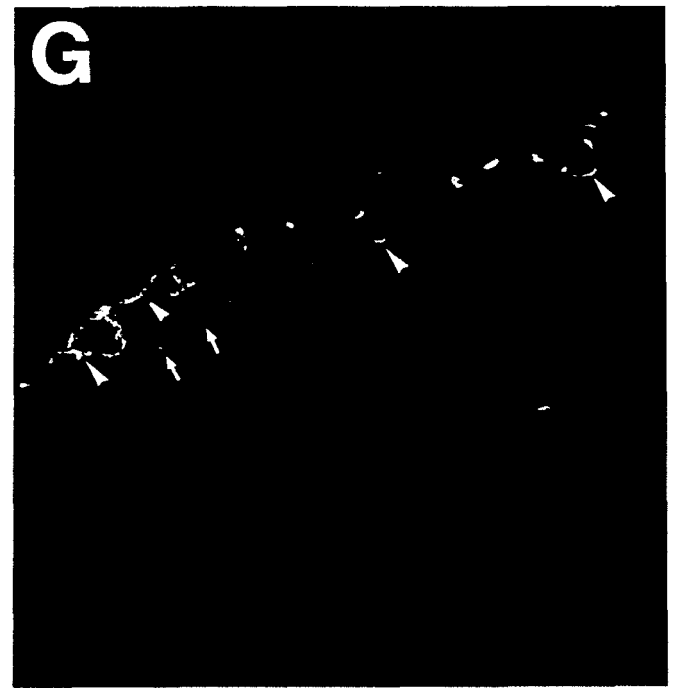
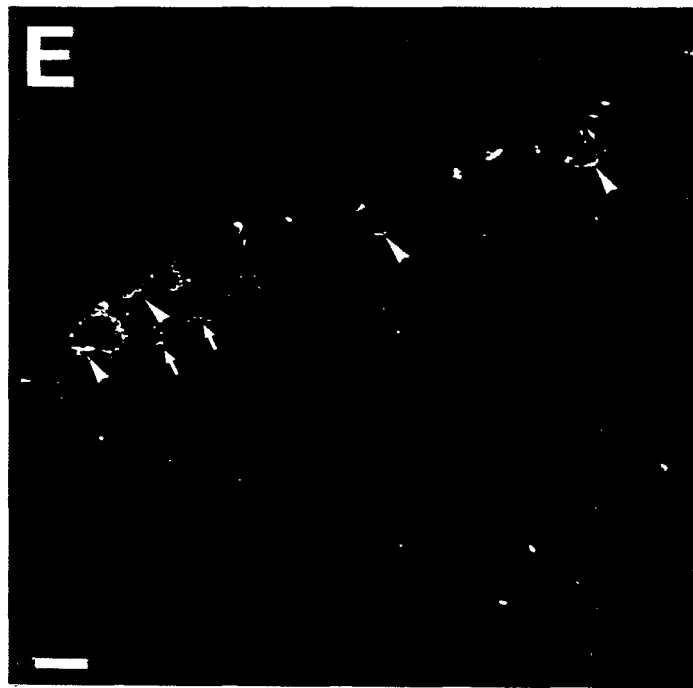
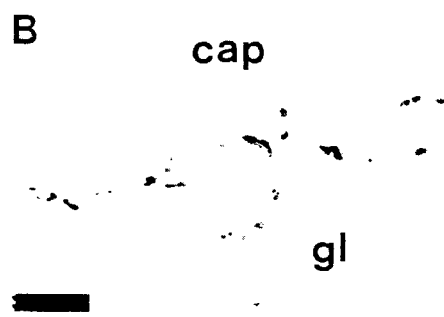
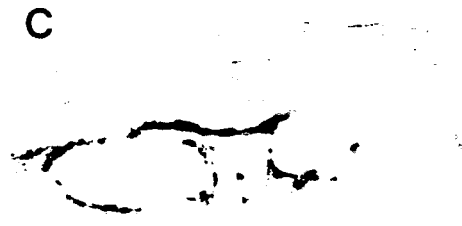
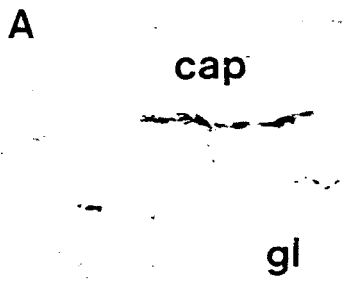
La zone capsulo-glomérulaire reçoit une dense innervation NPYergique et VIPergique. Sur des coupes adjacentes, les fibres immunoréactives NPY(+) ou VIP(+) ont une distribution semblable et peuvent être très abondantes. Ceci nous a conduit à rechercher une éventuelle

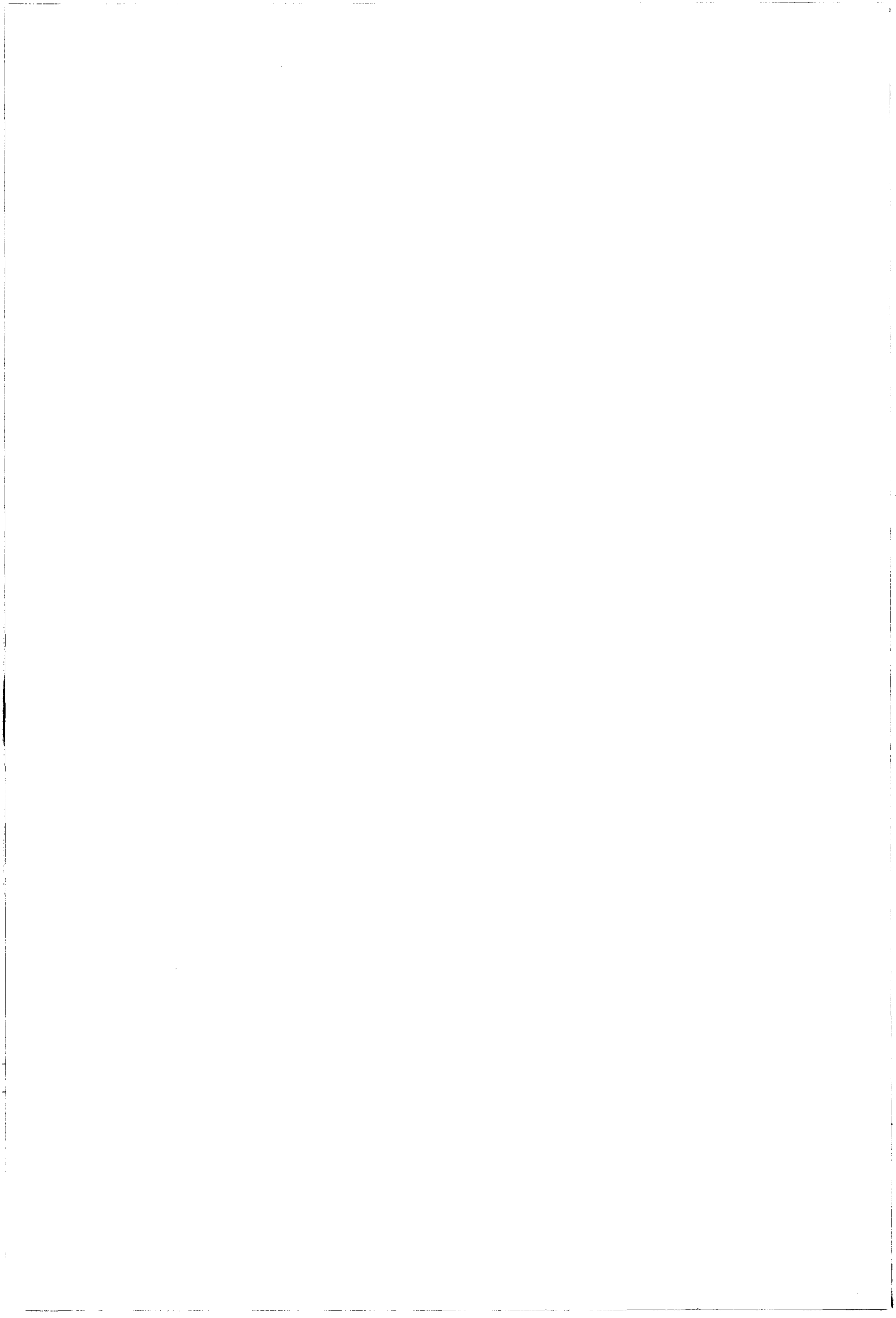


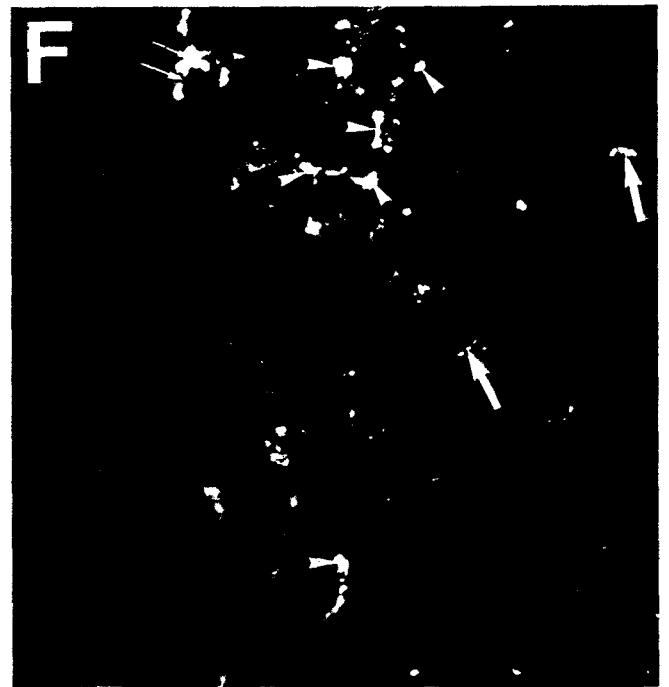
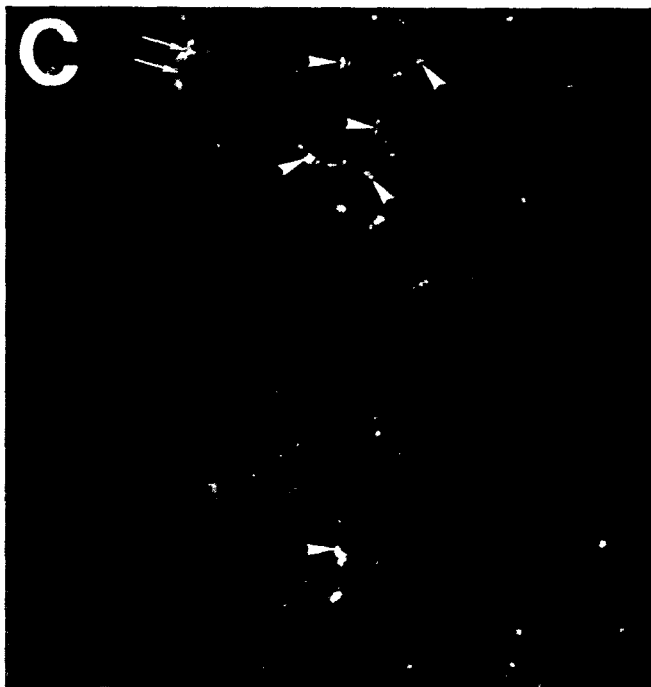
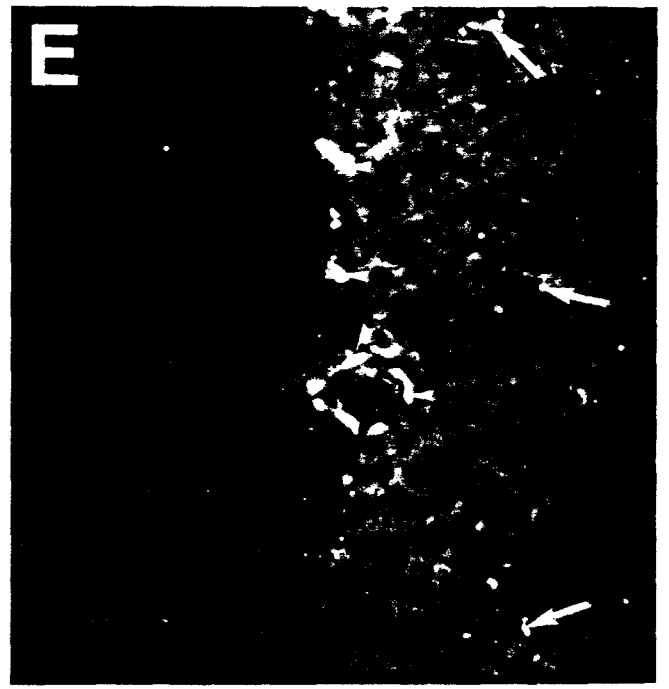
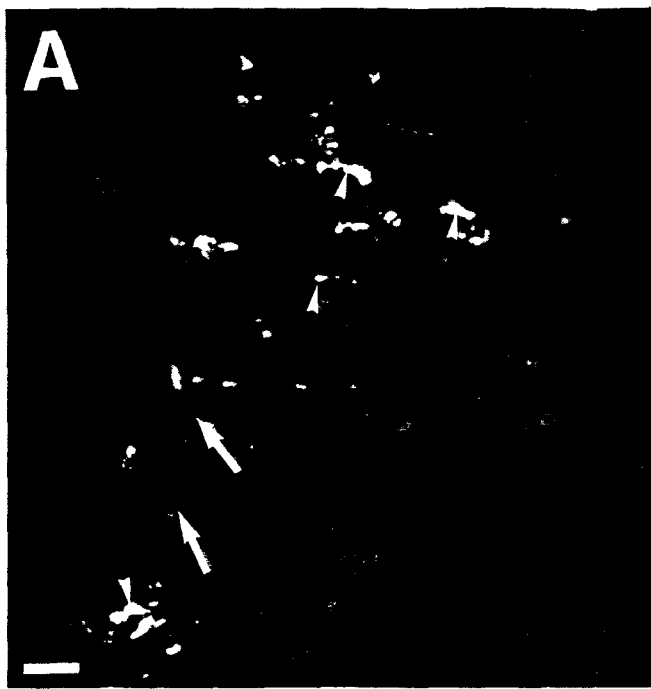
colocalisation du NPY et du VIP dans ces fibres du cortex surrénalien. Les résultats obtenus aussi bien avec la technique d'éluion des anticorps (Figure 1-9 A-D) qu'avec la technique du double marquage (Figure 1-9 E-H) démontrent de manière indubitable que les deux types d'immunoréactivité sont colocalisés dans la plupart des fibres nerveuses capsulo-glomérulaires. Une colocalisation NPY/VIP a également été observée dans des fibres capsulo-glomérulaires de deux surrénales humaines normales. Les fibres doublement marquées par les immunsérums anti-NPY et anti-VIP étaient cependant moins nombreuses chez l'homme que chez le rat. Chez ce dernier, l'innervation NPY- et VIPergique paraît associée aussi bien aux artérioles du plexus vasculaire qu'aux cellules glomérulaires impliquées dans la synthèse d'aldostérone (Figures 1-8 à 1-11 B). Dans certaines surrénales, la zone glomérulée apparaît comme prise en sandwich entre ces réseaux de fibres. Des fibres à VIP et NPY, à orientation radiale, atteignent les zones plus profondes du cortex. Les expériences de double marquage NPY/TH ou C-PON/TH, VIP/TH ou ppVIP/TH montrent que le phénotype catécholaminergique est le plus souvent associé aux phénotypes peptidergiques, bien que les marquages immunohistochimiques ne soient pas toujours parfaitement superposés et n'aient pas toujours le même aspect (Figures 1-10 et 1-11 A/B). Le marquage à l'aide de l'immunsérum anti-TH est généralement plus discret et plus fin que les marquages peptidergiques. Pour certaines fibres, la superposition des immunoréactivités TH/NPY, VIP ou ppVIP et NPY/ VIP ou ppVIP n'a pas été observée (Figures 1-9 et 1-10). Contrairement aux fibres nerveuses des plexus vasculaires capsulo-glomérulaires, les fibres associées aux artérioles extrasurréaliennes ne présentent pas de colocalisation TH/VIP ou NPY/VIP (Figure 1-9 F et H) ; par contre, elles sont marquées par les anti-NPY et -TH (Figures 1-9 H et 1-11 A/B). Par ailleurs, des troncs nerveux qui pénètrent la capsule surrénalienne sont doublement marqués par le cocktail d'anticorps NPY/TH (Figure 1-11 A/B), mais ils ne possèdent que de rares fibres marquées par l'anti-VIP.

Des fibres marquées par l'anti-CGRP sont présentes dans la zone capsulo-glomérulaire. Elles ne paraissent pas associées spécifiquement à la vascularisation bien que certaines d'entre elles aient été observées à proximité de vaisseaux. Les fibres marquées par l'anti-CGRP sont toujours moins abondantes que la population de fibres NPYergiques. Elles peuvent avoir une distribution très similaire avec une orientation tangentielle sous la capsule et radiale en direction de la zone médullaire









(Figure 1-11 C). De nombreuses fibres marquées par l'anti-CGRP sont également présentes dans les troncs nerveux qui pénètrent la capsule fibreuse. La technique de double marquage (CGRP/TH ou CGRP/NPY) ne nous a pas permis d'attribuer à ces fibres une nature catécholaminergique ou NPYergique.

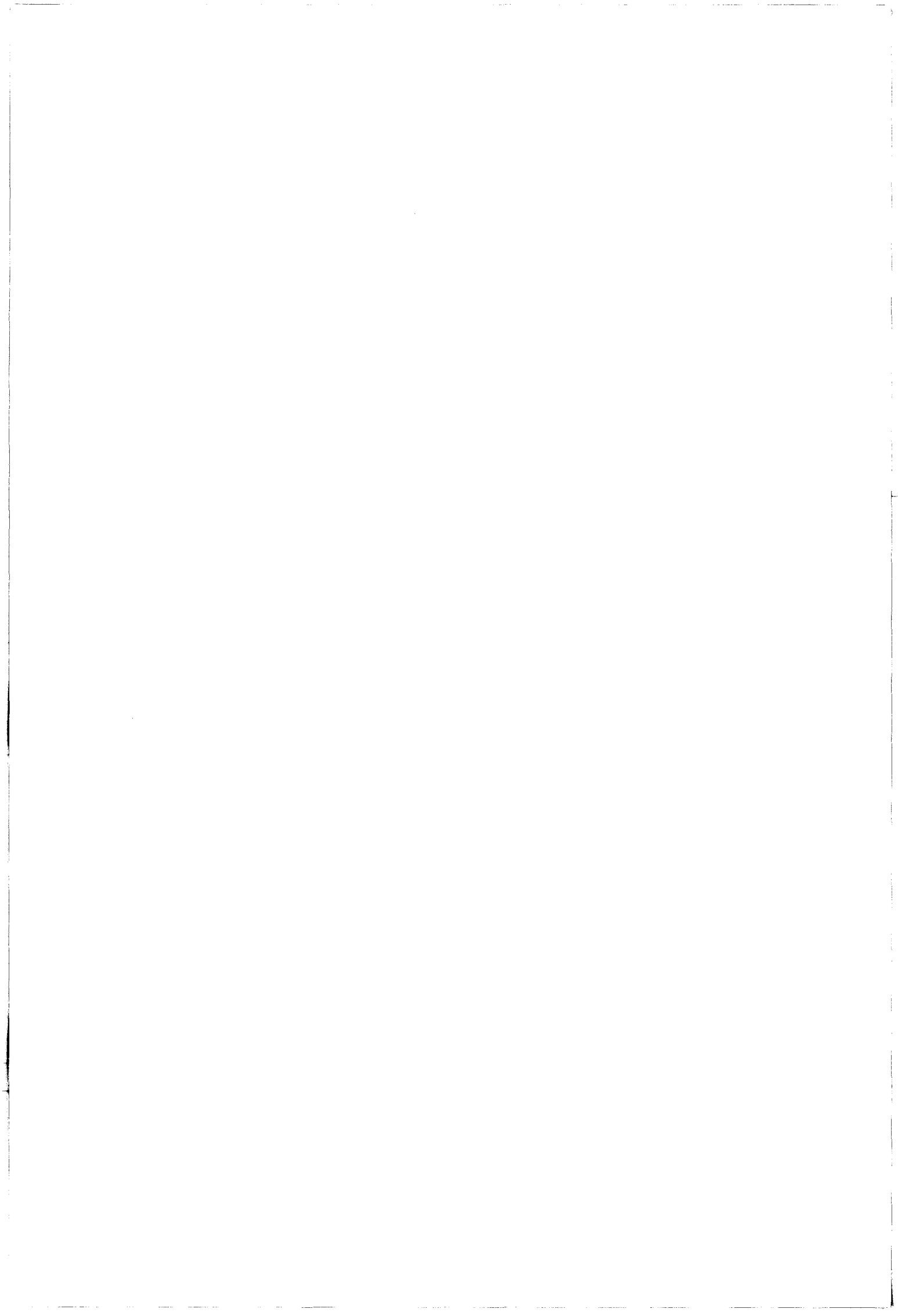
La zone capsulo-glomérulaire de la surrénale présente également de rares fibres marquées par les immunsérums anti-GAL, anti-CCK<sub>8</sub> et anti-SP. Bien que beaucoup plus rares, leur distribution est comparable à celle des fibres à CGRP avec une orientation tangentielle sous la capsule et radiale dans les zones corticales sous-jacentes. Les fibres à GAL, CCK<sub>8</sub> et SP ne paraissent pas associées à la vascularisation, contrairement aux fibres catécholaminergiques, NPYergiques et VIPergiques. Nous n'avons pas observé de colocalisation GAL/NPY ou SP/NPY bien que, comme pour les fibres CGRP(+), les fibres GAL(+) et SP(+) sont parfois détectées à proximité des fibres NPYergiques. L'absence de colocalisation entre GAL ou SP et le NPY est en accord avec le fait que les fibres galaninergiques, tout comme les fibres à CGRP, SP ou à CCK<sub>8</sub>, sont généralement plus fines que les fibres corticales à NPY et VIP. Nous n'avons pas comparé l'innervation peptidergique de la zone capsulo-glomérulaire avec celle révélée par la réaction histochimique mettant en évidence une activité NADPH-diaphorase. En effet, si des fibres marquées peuvent être détectées après un temps de réaction long, la forte réactivité des cellules corticales gêne l'interprétation des résultats.

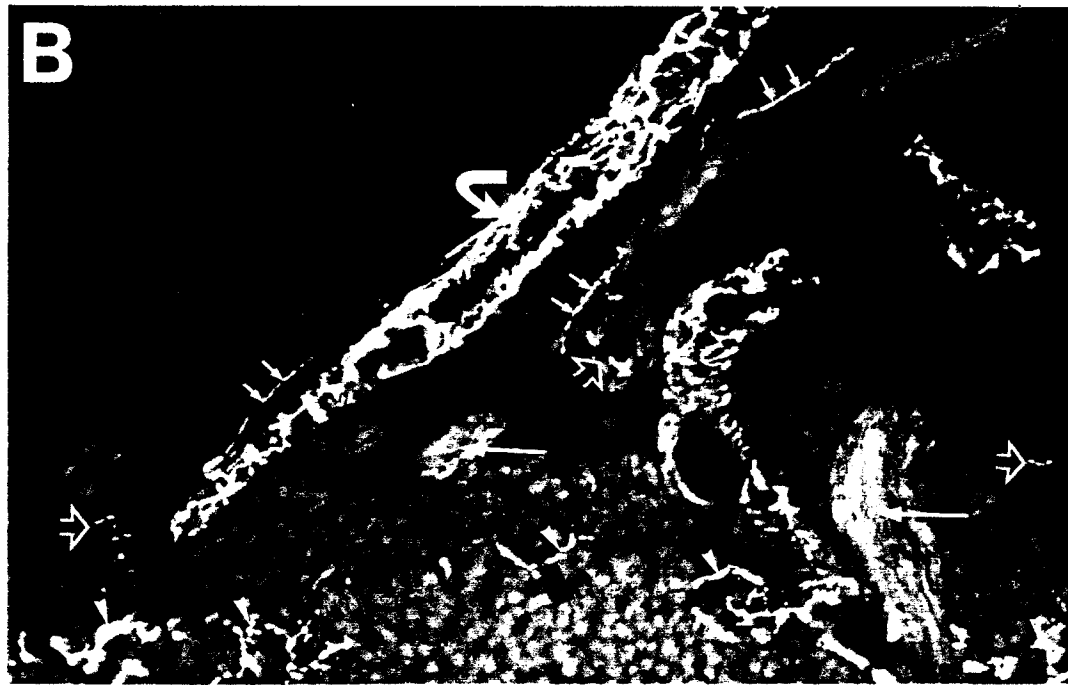
*La présence de fibres nerveuses dans le cortex surrénalien est principalement détectée au niveau de la zone capsulo-glomérulaire. Quelques fibres à orientation radiale intéressent les zones corticales sous-jacentes. L'innervation majeure est de nature NPYergique, VIPergique et catécholaminergique. L'innervation corticale comprend aussi des fibres marquées par les immunsérums anti-CGRP, -GAL, -CCK<sub>8</sub> ou -SP, les fibres CGRP(+) étant toujours les plus abondantes.*

#### **b) Innervation de la médullosurrénale**

Dans la médullosurrénale, de nombreuses catégories de fibres sont détectées à proximité des cellules chromaffines et/ou des neurones ganglionnaires.







Les fibres les plus abondantes qui sont manifestement de nature enképhalinergique (Figures 1-4 A, B et 1-12 A) semblent plus particulièrement innerver des îlots de cellules chromaffines adrénérergiques (Figure 1-4 B et C). Dans ces îlots adrénérergiques, de rares fibres ont été détectées autour de cellules marquées par l'anti-MERGL (Figure 1-4 C). Nous n'avons détecté que de rares fibres enképhalinergeriques à proximité des neurones ganglionnaires NPY(+) alors que ce type de fibres abonde dans certains ganglions péri-surrénaliens (Figure 1-14 B et C). Avec des temps de réaction longs, de nombreuses fibres marquées par la réaction histochemique mettant en évidence une activité NADPH-diaphorase, sont également visibles dans la médullosurrénale. Ces fibres ne sont pas de nature NPYergique (Figure 1-12 C et F).

Des fibres à CGRP innervent les cellules chromaffines et sont détectées à proximité des neurones ganglionnaires NPYergiques (Figure 1-14 A/D) ; elles sont parfois très denses dans certains îlots de cellules chromaffines mais elles n'ont pas été associées à un type d'îlot particulier (noradrénérergique ou adrénérergique).

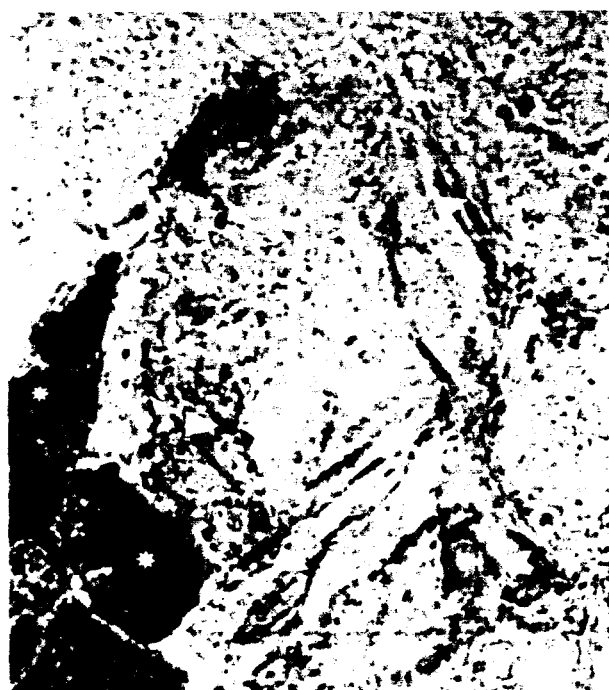
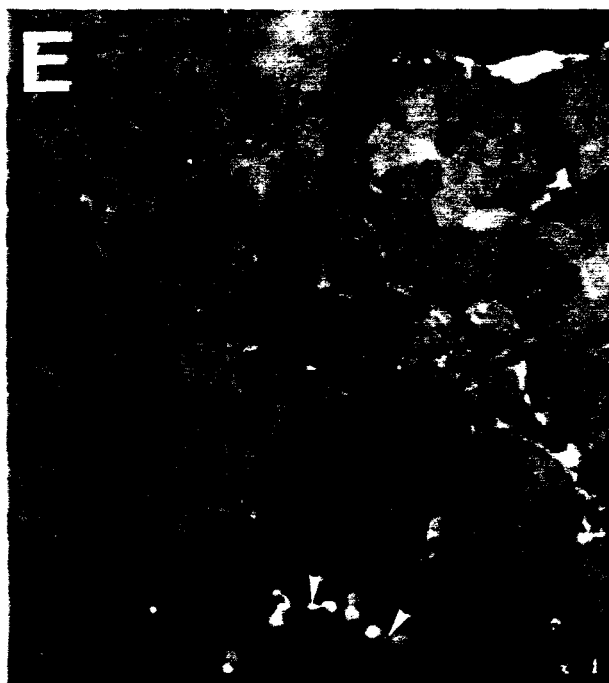
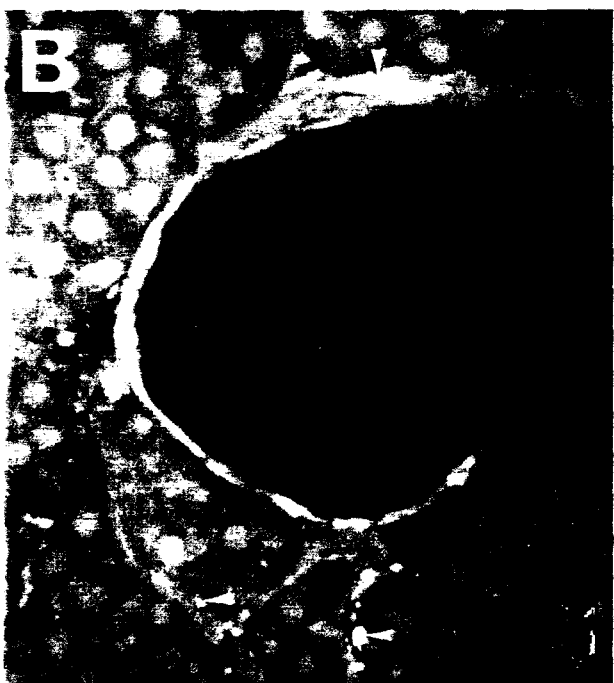
Des fibres marquées par l'immunsérum anti-SP, moins abondantes que celles à CGRP, forment généralement des plexus denses dans les îlots de cellules chromaffines noradrénérergiques dépourvues de NPY (Figure 1-13 A-C). De tels plexus n'ont jamais été observés dans les îlots adrénérergiques bien que de rares fibres puissent être détectées.

Des fibres marquées par les immunsérums anti-GAL (Figure 1-12 E) et anti-CCK<sub>8</sub> (Figure 1-12 D) beaucoup moins abondantes que celles à CGRP ou à SP, ont aussi été observées à proximité de certaines cellules chromaffines.

De rares fibres VIPergiques sont présentes au voisinage de cellules chromaffines et à proximité des vaisseaux (Figure 1-12 B). Une colocalisation NPY/VIP a été observée dans des fibres innervant des îlots de cellules chromaffines situés en périphérie de la médullosurrénale. Dans la région plus profonde de la médulla, un recouvrement des immunoréactivités anti-NPY et anti-VIP n'est généralement pas observé, contrairement au cortex. Les fibres VIPergiques y sont d'ailleurs souvent plus fines que dans le cortex ou dans les îlots de cellules chromaffines situés en périphérie de la médullosurrénale.

Au sein des gros troncs nerveux qui se ramifient dans la médullosurrénale, des fibres marquées par les immunsérums anti-MERGL, anti-





### Figure 1-13

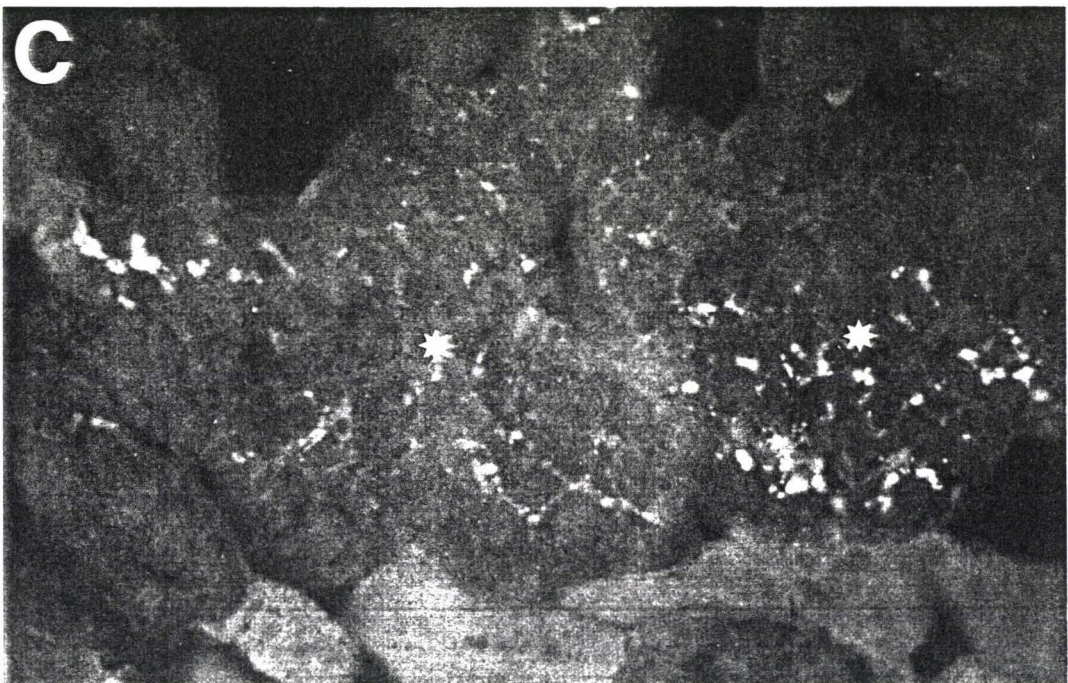
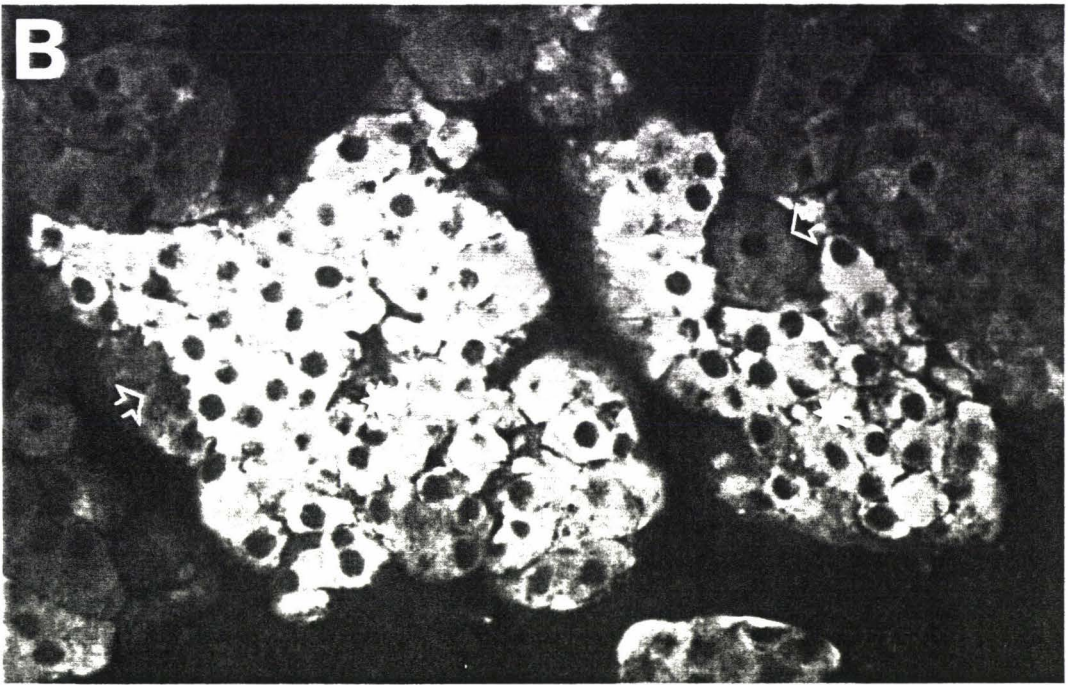
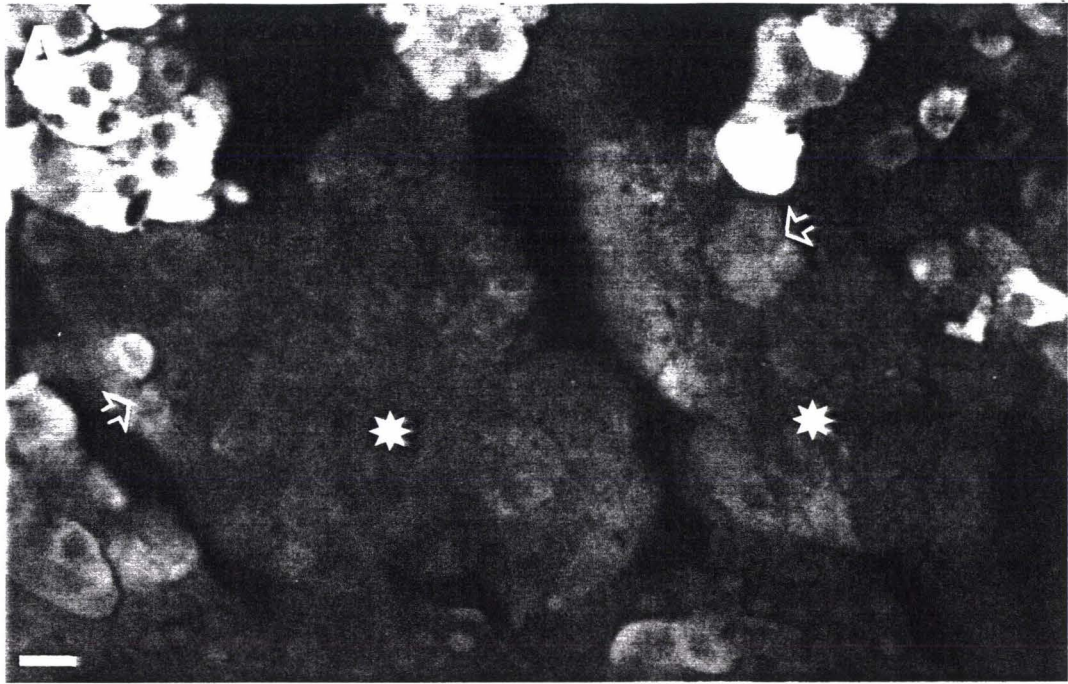
Innervation SPergique d'un îlot de cellules noradrénergiques.  
Démonstration sur deux coupes adjacentes.

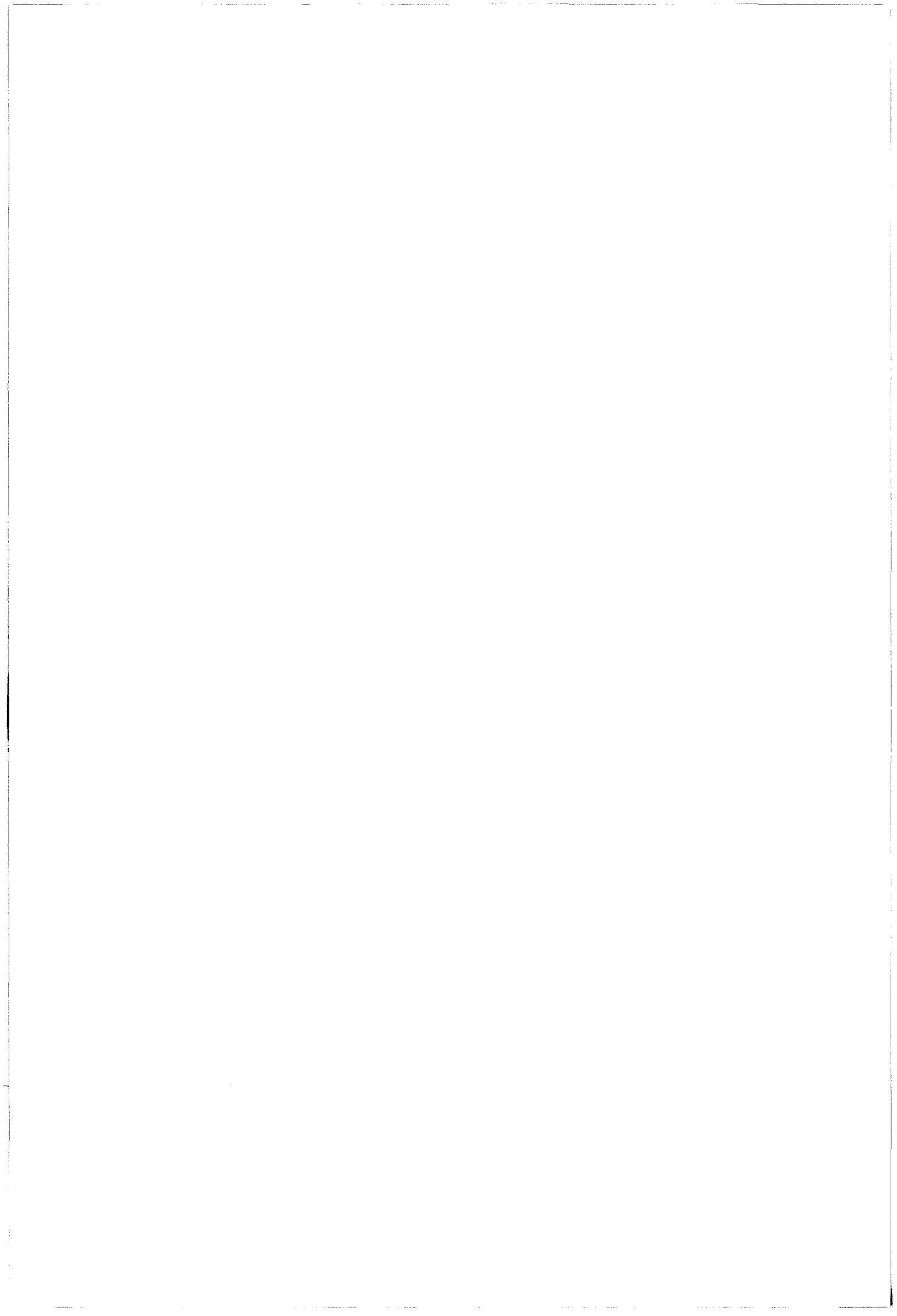
**A - B** : Double marquage NPY/TH (A/B). Les cellules des îlots noradrénergiques (étoiles) sont toujours fortement marquées par l'anti-TH (B) et sont peu, voire pas NPYergiques (A). L'organisation en îlots des cellules chromaffines n'est pas toujours nette puisque des cellules possédant des caractéristiques histologiques de cellules adrénérgiques sont parfois enchevêtrées dans les îlots noradrénergiques (flèches ouvertes).

**C** : Coupe adjacente à (A/B) marquée pour la SP. Cette coupe montre une innervation SP positive dense au sein des îlots fortement marqués par la TH et pratiquement dépourvus de marquage anti-NPY (étoiles).

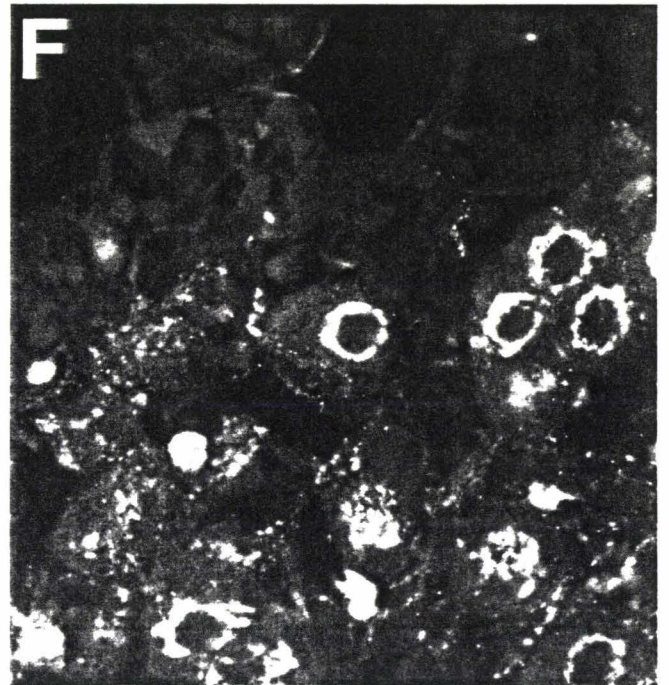
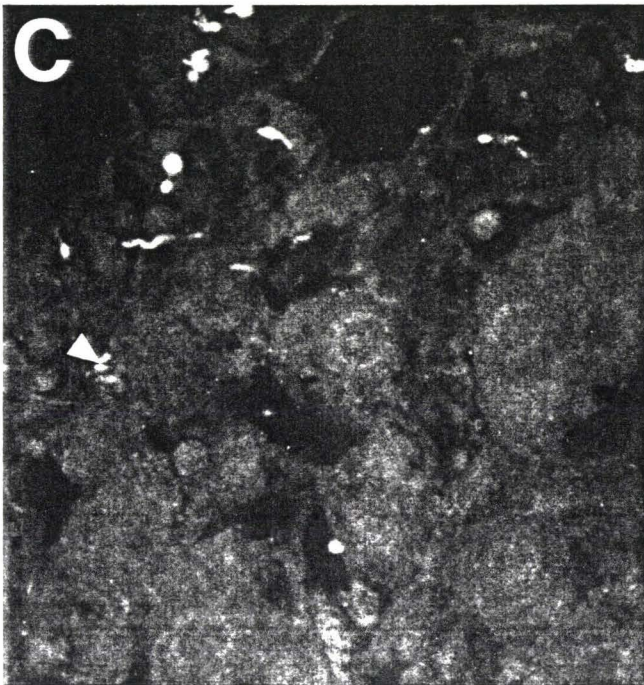
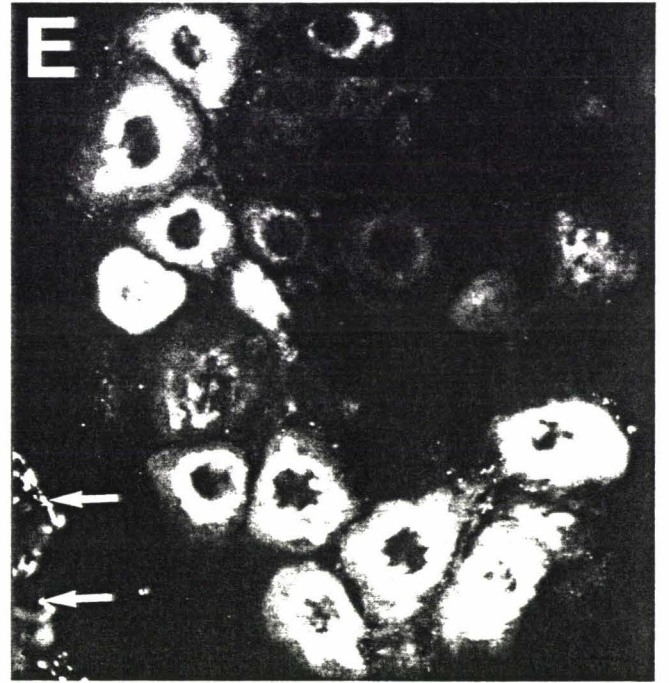
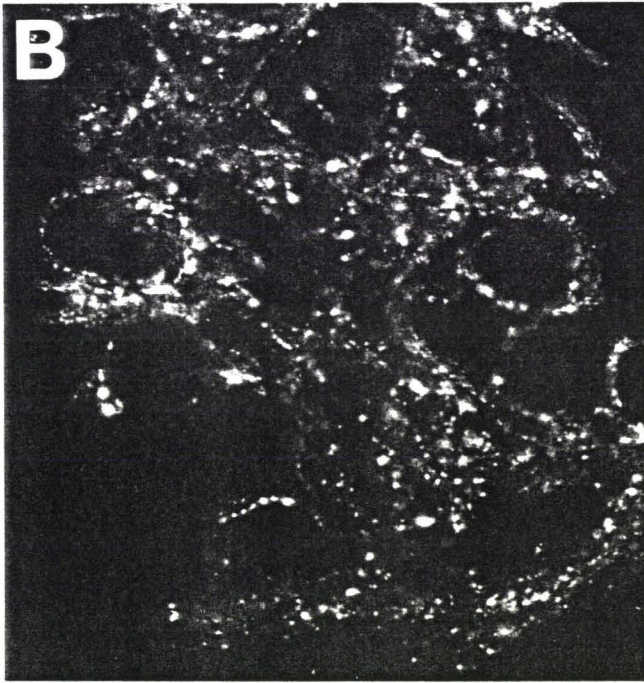
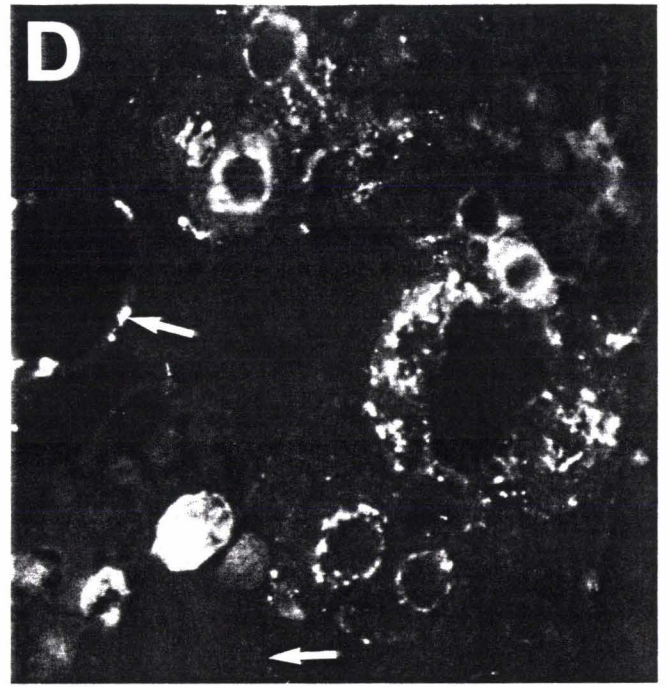
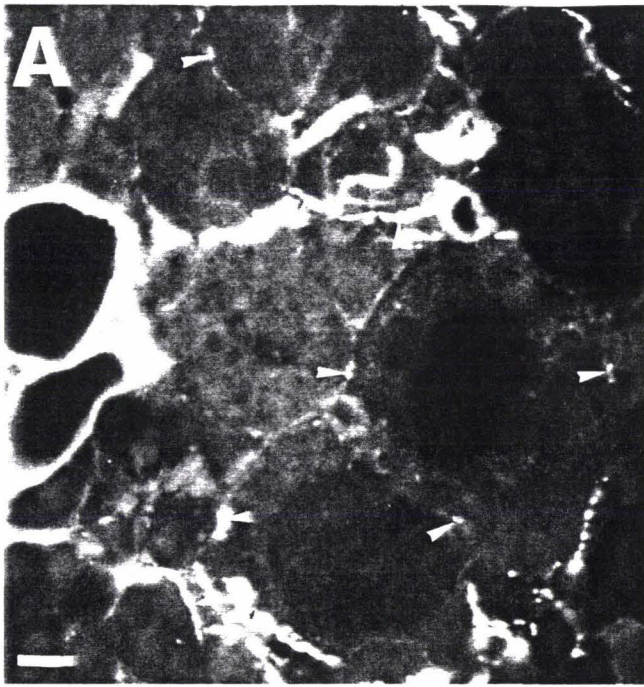
A-C : Barre en A : 6  $\mu\text{m}$











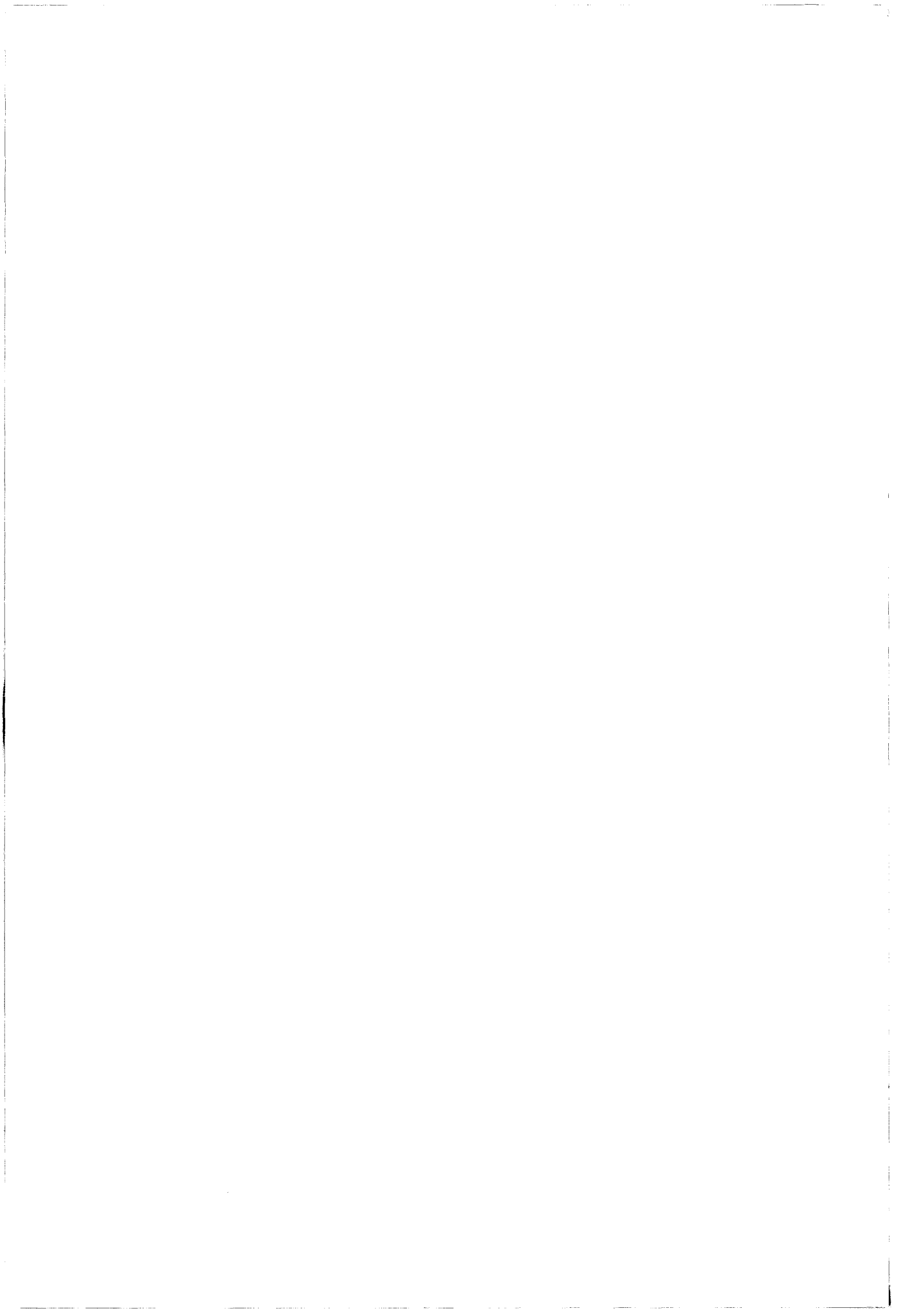


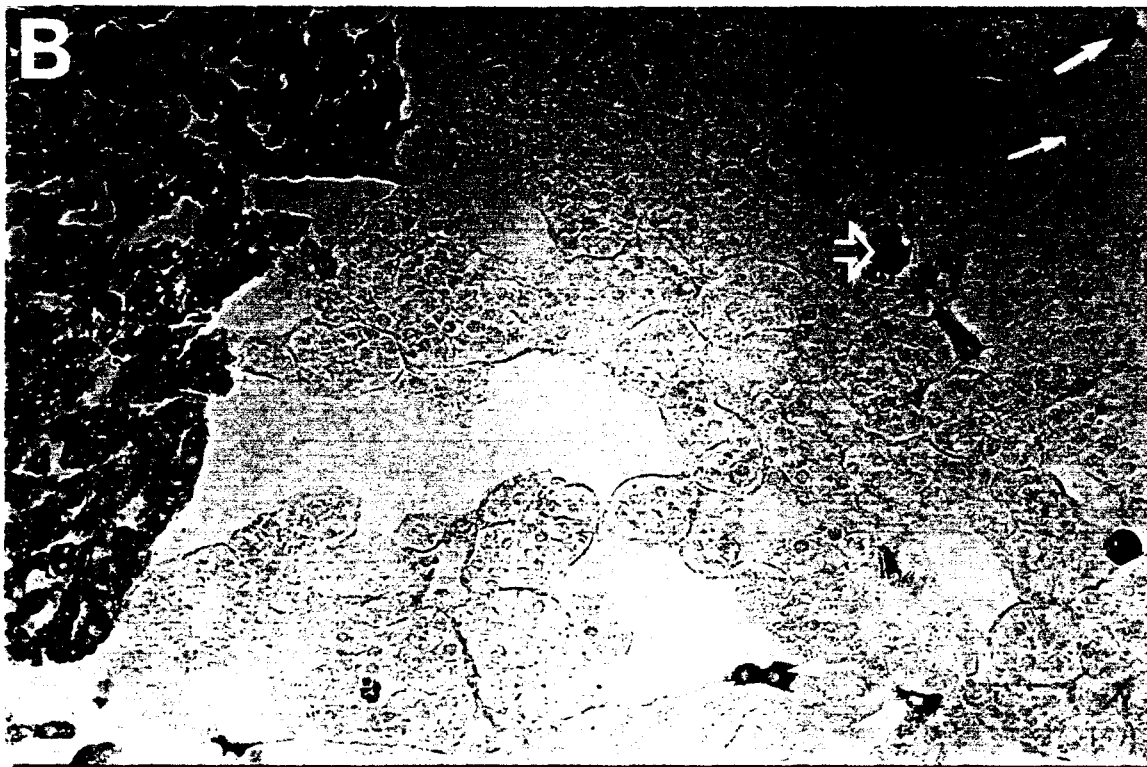
CGRP, anti-SP, anti-NPY et anti-TH, anti-GAL, anti-CCK8 et anti-VIP ont été détectées. Leur fréquence respective varie en fonction des individus et, pour un marquage donné, la densité de l'innervation des cellules chromaffines peut présenter d'importantes variations. Des fibres peptidergiques ont été parfois observées à proximité de cellules chromaffines également marquées pour ce même peptide. Par exemple, des cellules marquées par l'immunsérum anti-MERGL peuvent être innervées par des fibres de même type ou encore, des cellules NPYergiques peuvent recevoir des fibres NPYergiques (Figure 1-12 C). Dans de nombreux cas, les cellules chromaffines adrénérergiques "innervées" par des fibres NPYergiques sont peu ou pas marquées par le cNPY (Figure 1-5 C).

*La médullosurrénale est innervée par des contingents de fibres marquées par les immunsérums anti-MERGL, -CGRP, -SP, -NPY, -GAL, -VIP et -CCK8. Les fibres enképhalinerergiques sont les plus couramment observées. La densité de l'innervation peptidergique présente néanmoins d'importantes variations inter-individuelles. Les cellules chromaffines peuvent être innervées par ces différentes catégories de fibres néanmoins, des îlots de cellules chromaffines paraissent plus spécifiquement innervés par certaines catégories de fibres peptidergiques. C'est le cas, d'une part pour les îlots de cellules noradrénérergiques, dans lesquels des fibres SPergiques constituent souvent des plexus denses, et d'autre part pour les îlots de cellules adrénérergiques qui reçoivent plus spécifiquement une dense innervation enképhalinerergique.*

#### **4°) Révélation histochimique d'une activité NADPH-diaphorase.**

La réaction histoenzymatique de mise en évidence d'une activité NADPH-diaphorase marque intensément les cellules du cortex surrénalien. Le marquage est toujours plus intense dans les zones fasciculée et réticulée où le produit de la réaction apparaît après un







temps de réaction de courte durée (moins de 15 minutes) (Figure 1-15 A). La zone glomérulée, quant à elle, est généralement faiblement marquée et présente toujours un marquage qui la différencie nettement des zones sous-jacentes, quelles que soient les conditions de fixation des tissus (post-fixation ou non). La capsule surrénalienne et les cellules chromaffines ne sont jamais marquées. Cette réaction met de surcroît en évidence quelques cellules dispersées au sein du tissu chromaffine (Figure. 1-15 B). Ces cellules sont majoritairement des cellules corticales identifiables par la présence de gouttelettes lipidiques. Nous n'avons pas été en mesure d'établir la moindre corrélation entre la distribution de ces cellules corticales et les cellules chromaffines situées à leur périphérie, révélées par les immunosérums anti-NPY et anti-PNMT ; les deux types d'ilôts (adrénergique et noradrénergique) peuvent jouxter ces cellules.

## **B - Ontogenèse de la lignée sympathosurrénalienne et ontogenèse surrénalienne au cours du développement embryonnaire**

Des structures embryonnaires n'appartenant pas à la lignée sympathosurrénalienne sont susceptibles d'être révélées par immunohistologie, très tôt au cours du développement. Ces structures marquées ne seront pas décrites bien que certaines n'aient jamais été préalablement signalées dans la littérature ; on peut citer par exemple la présence de VIP et de somatostatine dans des cellules pancréatiques, par ailleurs marquées par le cNPY, dès le 12<sup>ème</sup> jour de gestation.

### **1°) Chaîne paravertébrale (CPV) et plexus prévertébraux (PPV)**

Bien que, entre les stades E 11,5 et E 16,5, la majorité de nos immunosérums aient été utilisés en simple marquage pour rechercher quels sont les messagers chimiques qui apparaissent le plus précocement dans la lignée sympathosurrénalienne (LSS), les résultats décrits ci-dessous concernent principalement, sinon exclusivement, l'apparition et la distribution des marquages anti-TH, -NPY et

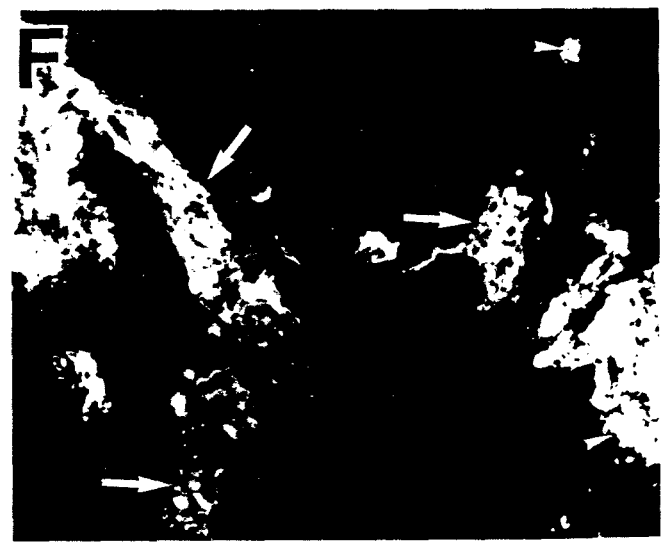
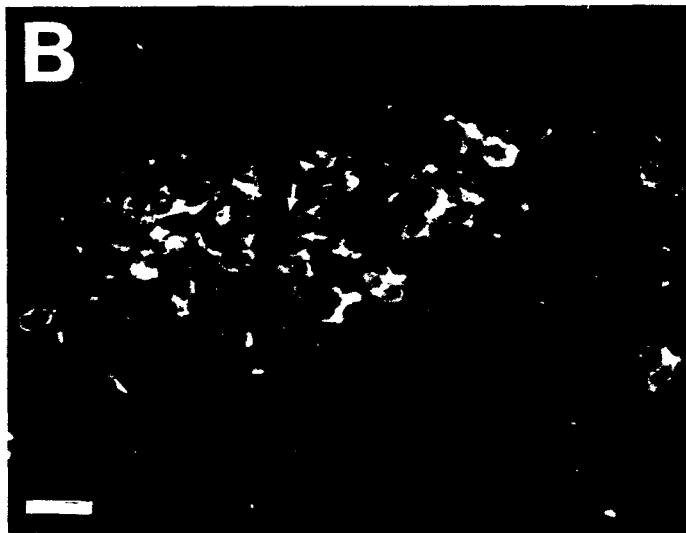
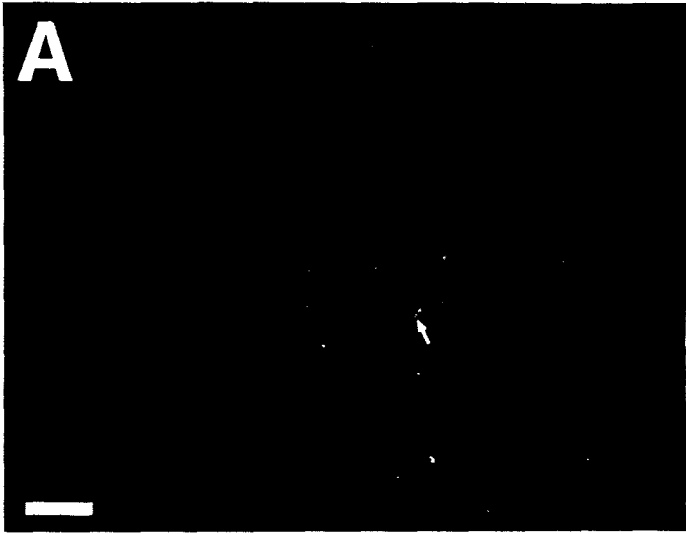
-somatostatine (SRIF). Nous décrivons, lorsque aucune précision ne sera apportée, les événements relatifs à l'ontogenèse de la LSS dans la région thoraco-lombaire de l'embryon. En effet, la migration et la différenciation des cellules sympathosurréaliennes se font selon un axe rostro-caudal. Ainsi, pour la chaîne paravertébrale (CPV) qui s'étend de la tête à la région caudale, les phénomènes pouvant être observés rostralement à E 11,5 le sont plus tardivement à E 12,5 voire E 13,5, dans la région caudale.

Lors de l'apparition des cellules précurseurs de la LSS ou du système nerveux entérique (SNE), des différences sont perceptibles quant aux immunomarquages obtenus avec les immunsérums anti-NPY et anti-C-PON. Ainsi, dès l'apparition de ces cellules, le C-PON est généralement détecté dans la majorité d'entre elles alors que le NPY ne l'est distinctement que dans de très rares cellules. Le marquage anti-C-PON étant diffus (Figure 1-16 A et B), il pourrait suggérer une éventuelle réaction croisée puisqu'il est semblable, mais de plus faible intensité, à celui obtenu avec les IgG anti-TH (Figure 1-16 D et E). Le même cocktail (C-PON/TH), utilisé à des stades ultérieurs du développement, montre que les cellules fortement marquées par l'anti-TH, ne le sont pas par l'anti-C-PON (Figure 1-16 C et F). De plus, un marquage anti-C-PON est également obtenu en simple marquage dans la quasi totalité des cellules précurseurs. Ces différences d'immunomarquage obtenues avec les anti-NPY et -C-PON, nous ont amené à considérer qu'une structure était NPYergique quand les deux marquages anti-NPY et anti-C-PON étaient clairement détectés en son sein.

Dans l'embryon, les premières cellules qui présentent un intense marquage anti-TH sont les cellules du SNE. Dès E 11,5, ces cellules TH(+) sont généralement marquées par l'anti-C-PON et plus rarement par l'anti-NPY, mais elles sont toutes SRIF(-).

Au douzième jour de gestation, de part et d'autre de l'aorte, les cellules typiquement sympathosurréaliennes TH(+) ont atteint leur place définitive dans l'embryon. Ces cellules sympathoprécursus constitueront la chaîne paravertébrale (CPV). Dès ce stade, la présence d'un marquage anti-NPY peut être détectée dans de rares cellules (Figures 1-16 A et 1-17 B). Entre E 12,5 et E 13,5 ces deux types de marquage ne sont pas toujours étroitement corrélés ; en effet, un marquage anti-NPY peut aussi bien être détecté dans des cellules faiblement ou fortement TH(+) (Fig 1-17A/B et E/F). En règle générale,





après le 13<sup>ème</sup> jour de la gestation, le marquage anti-NPY est détecté dans les cellules faiblement marquées par l'anti-TH (Figures 1-18 C/F et 1-20 B/C). Dès l'apparition des cellules sympathoprécursors, certaines cellules possèdent des prolongements cellulaires pouvant être TH- ou, plus rarement, NPY-immunoréactifs (Figure 1-17 A/B). A proximité de ces cellules, on peut mettre en évidence des fibres somatostatinerigiques (Figure 1-17 C). De nombreuses fibres et, semble-t-il, de très rares cellules somatostatinerigiques, sont par ailleurs révélées sur le trajet du nerf vague qui innerve des cellules entériques, transitoirement catécholaminergiques (Figure 1-17 D/H).

Aux stades E 12,5 et E 13,5, les cellules de la CPV sont dépourvues de marquage anti-5-HT, -MERGL, -VIP, -GAL, -CCK, -CGRP, -SP, -PNMT, -ACTH, -CRF, -AVP et -OT.

Au stade E13,5, après l'apparition des cellules NPYergiques, on observe également la présence de rares cellules marquées par l'anti-SRIF (Figure 1-17 G). Le nombre de cellules NPYergiques augmente considérablement et un marquage anti-NPY, granulaire et intense, est détecté dans de nombreuses cellules autour de E13,5/14,5 (Figure 1-17 F), tandis que parallèlement l'intensité du marquage anti-TH diminue.

A partir de E 14,5, au moins deux grands types cellulaires sont identifiables dans la CPV (Figure 1-18 A/D) :

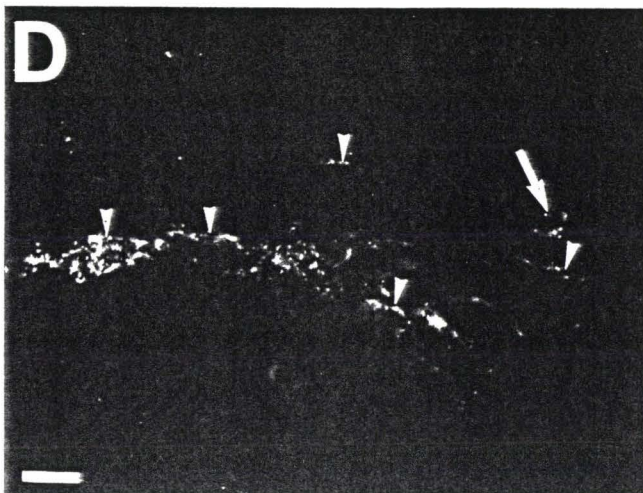
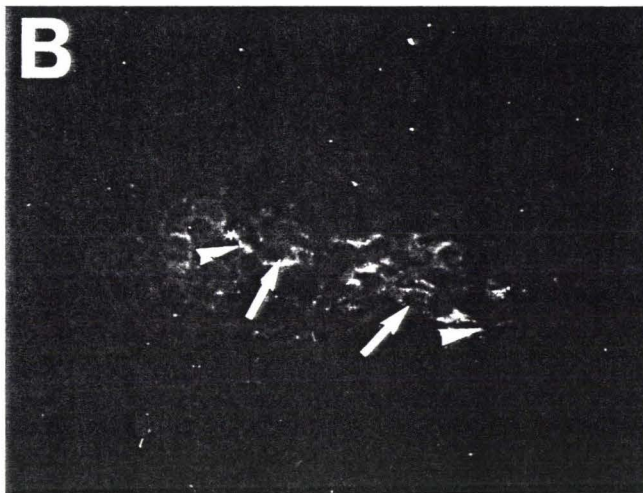
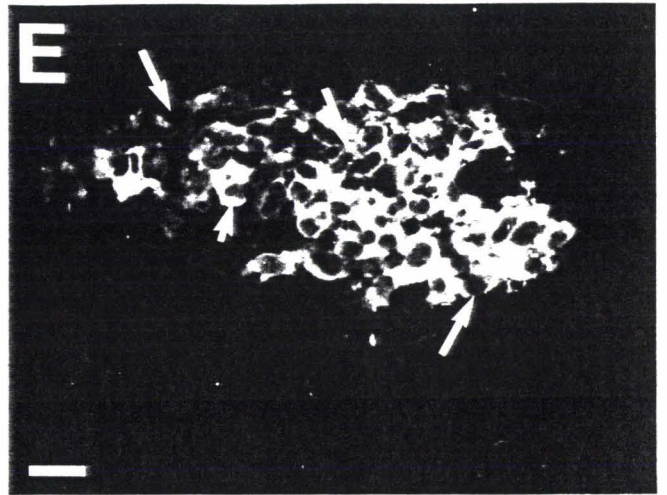
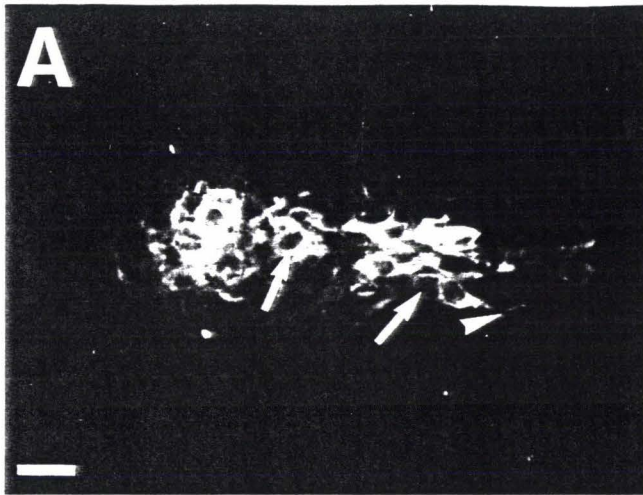
a) des cellules fortement marquées par l'anti-TH, généralement dépourvues d'autres types de marquage, en particulier SRIF(-) (Figures 1-18 A/D et B/E) et NPY(-) (Figures 1-18 C/F et 1-20 B/C).

b) des cellules de plus grand diamètre qui perdent progressivement leur intense marquage TH mais sont marquées par les anti-NPY et l'anti-SRIF ; ces cellules correspondent aux neurones sympathiques différenciés. Ces derniers constituent très tôt la majorité des cellules de la CPV.

Dès les stades embryonnaires E 14,5/15,5, de rares neurones de gros diamètre peuvent apparaître dépourvus de marquage anti-TH (Figure 1-18 A/D) ; ils sont plus nombreux aux stades ultérieurs du développement (Figure 1-18 B/E et C/F). Les changements phénotypiques pourraient être en relation avec l'apparition d'un marquage anti-VIP, détecté dans de rares neurones autour de E15,5. Jusqu'à E 16,5, les neurones de la CPV sont dépourvus de matériel immunoréactif de type 5-HT, MERGL, CGRP, GAL, SP, et CCK. Néanmoins, de nombreux neurones intensément marqués par l'anti-MERGL sont présents dans l'estomac dès E 16,5. A ce stade, les neurones de la CPV sont, pour la plupart, NPYergiques, somatostatinerigiques et faiblement



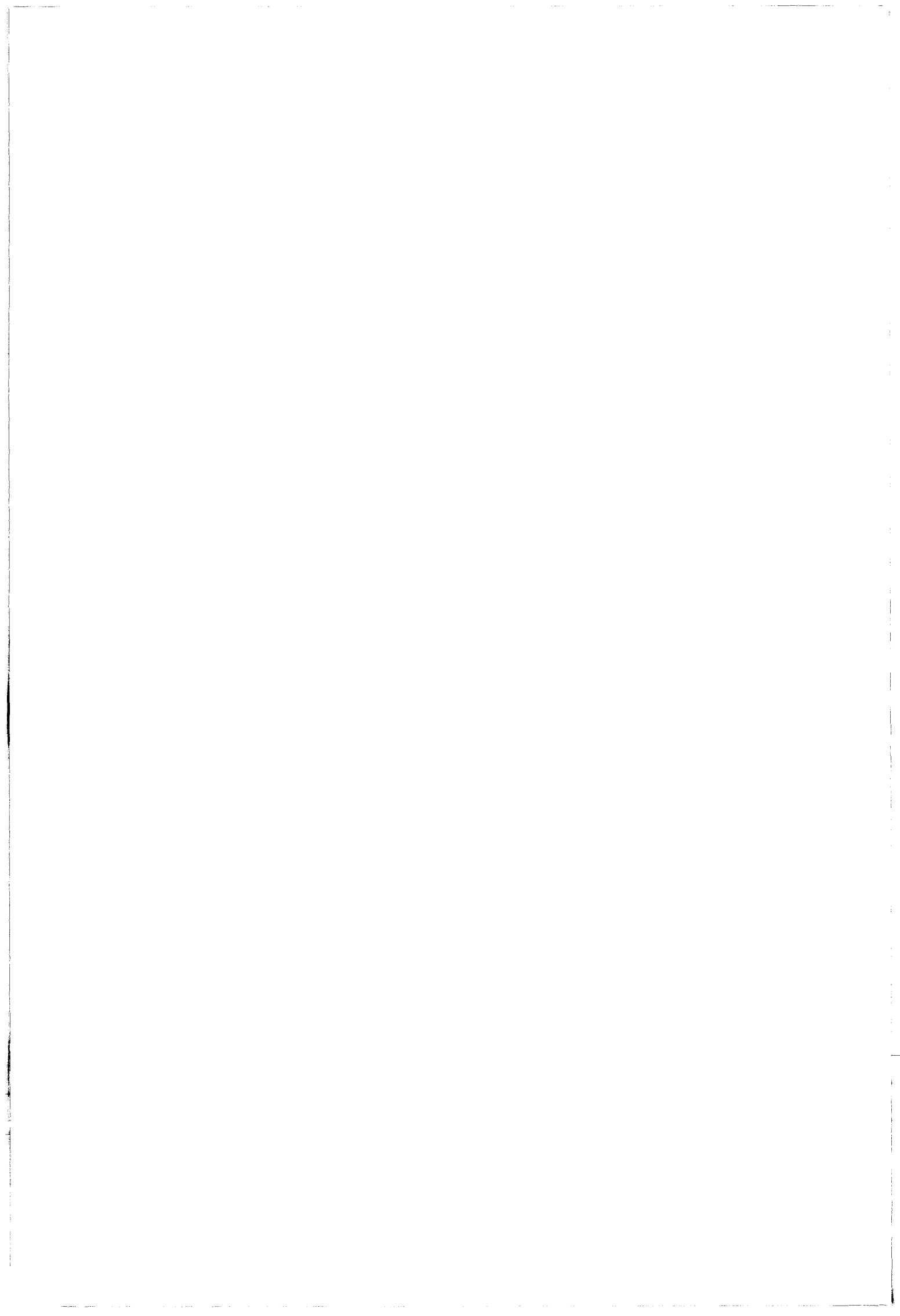


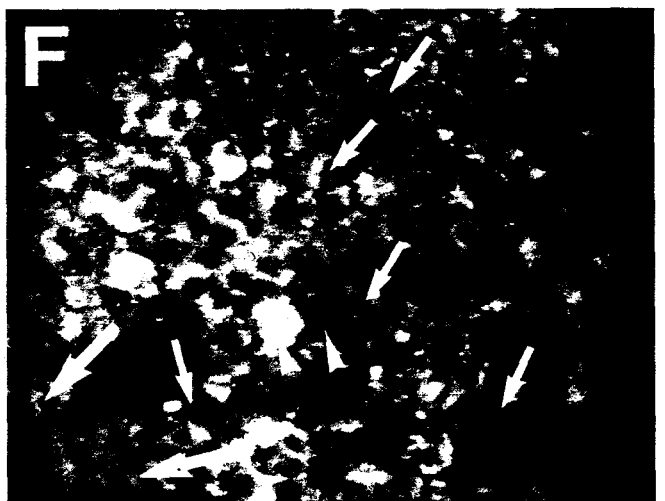
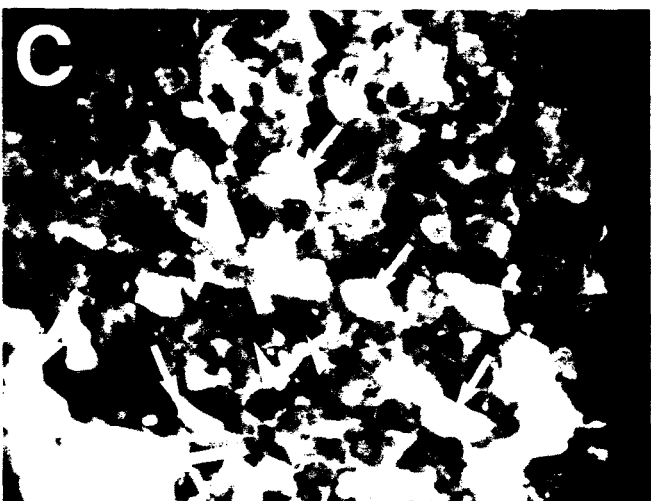
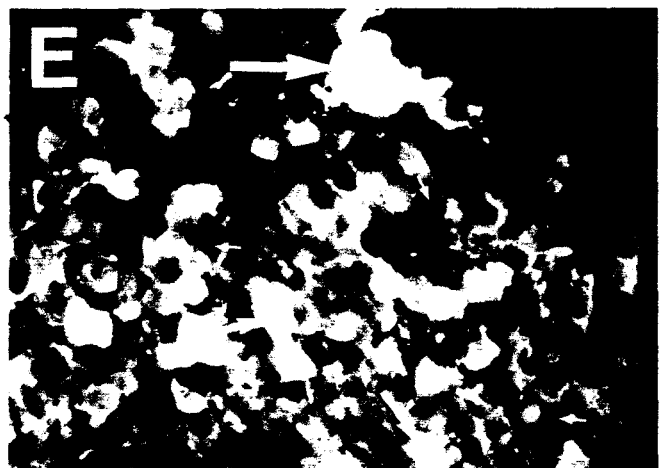
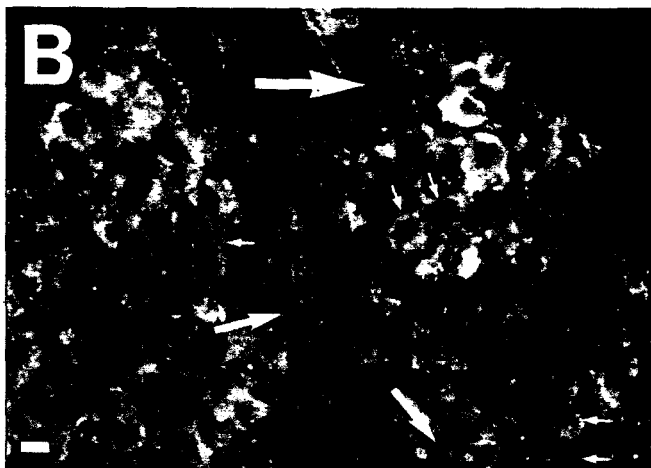
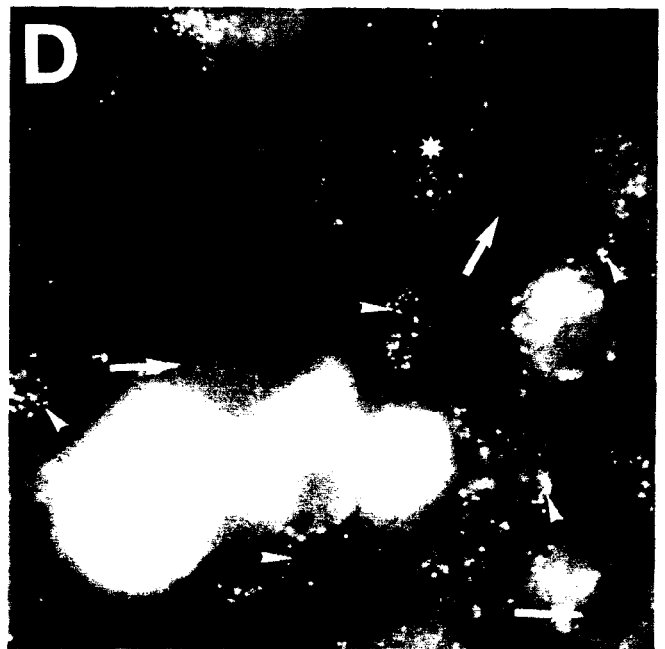


marqués par l'anti-TH (Figure 1-18 B/E et C/F). Jusqu'à la naissance, les marquages anti-NPY et anti-TH sont toujours détectés dans la majorité des neurones tandis que le marquage anti-SRIF disparaît presque totalement de ces cellules. Toutefois, on observe encore de rares neurones somatostatinerigiques autour de la naissance. Dans la période périnatale, nous avons réalisé des doubles marquages VIP/TH. Les neurones VIPergiques sont bien plus rares que les neurones NPYergiques et sont dépourvus de marquage anti-TH (les immunoréactivités VIP et TH ont pu néanmoins être colocalisées dans de rares neurones).

Dans la CPV, des cellules fortement TH(+) sont détectées jusqu'à la naissance. Elles peuvent être soit dispersées au sein des autres types cellulaires (Figure 1-19 A) soit associées en îlots plus ou moins importants (Figure 1-18 B/E et C/F). Ces îlots apparaissent à des stades relativement tardifs de la gestation (E 16,5-17,5). Au cours du développement embryonnaire, les cellules de ces îlots sont SRIF(-) et NPY(-) mais toujours intenses TH(+). Elles correspondent à des cellules SIF (*Small intensely fluorescent cells*) embryonnaires.

*Peu de temps après leur apparition précoce (vers E 12,5), de rares cellules sympathoprécursurs, caractérisées par un marquage anti-TH, sont aussi NPYergiques. A ce stade, des fibres somatostatinerigiques sont observées à proximité de ces cellules qui deviennent elles-mêmes, peu de temps après SRIF(+). Dans les neurones, l'apparition du NPY, et moins probablement du SRIF, semble corrélée avec une diminution de l'intensité du marquage TH. Autour de E 15,5, un marquage VIPergique apparaît dans de rares neurones de la CPV. A E 16,5, la quasi totalité des neurones de la CPV est NPY(+) et SRIF(+) mais faiblement TH(+). En fin de gestation, la majorité des neurones est toujours NPYergique et catécholaminergique ; seuls de rares neurones sont somatostatinerigiques. Le marquage anti-SRIF est donc transitoirement détecté dans la majorité des neurones de la CPV. A la naissance, les neurones VIPergiques sont dépourvus de marquage anti-*





*TH* ; néanmoins il existe de rares neurones à la fois faiblement *TH*(+) et *VIP*(+).

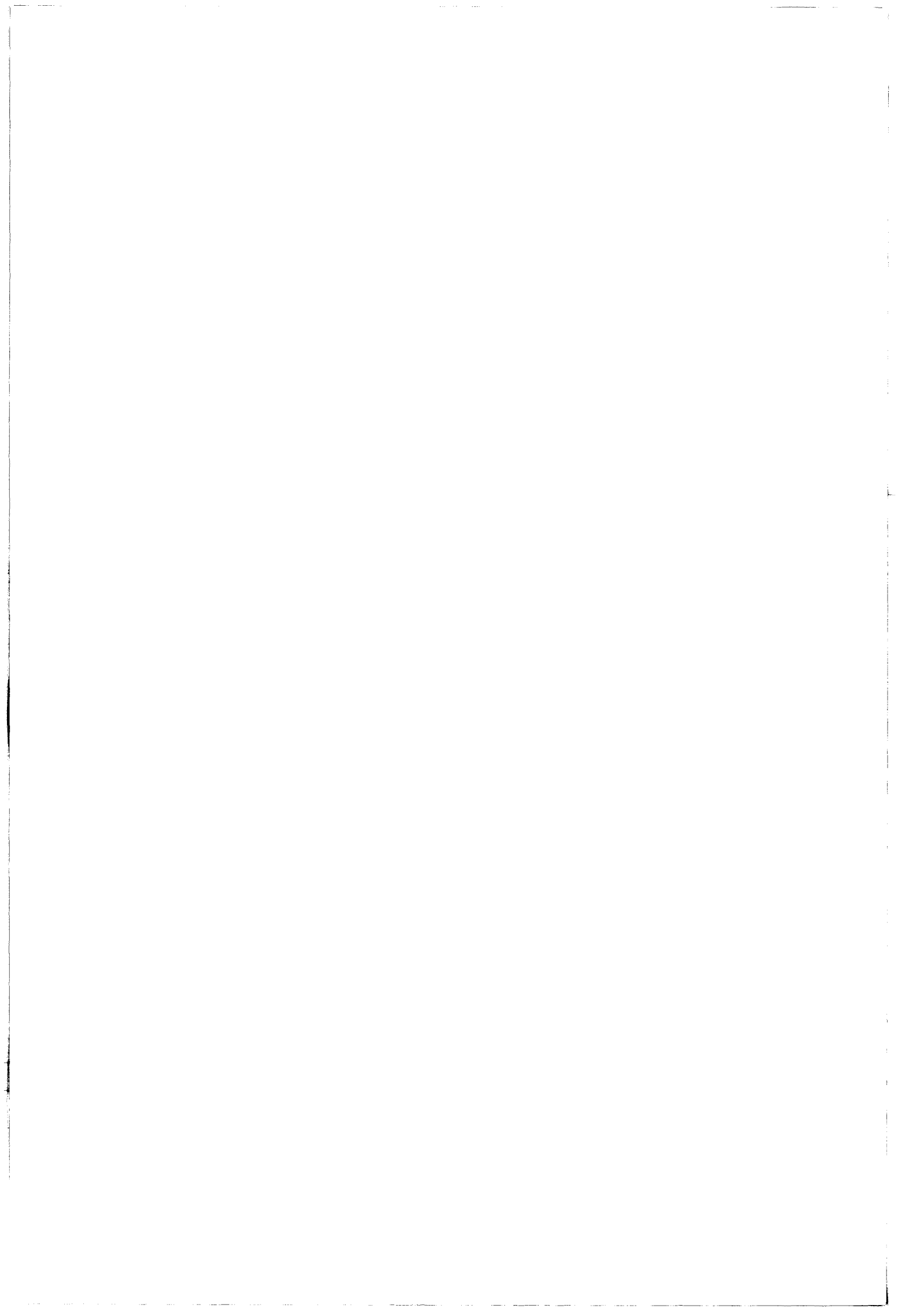
Au cours de l'ontogenèse de la CPV, des cellules vont garder les caractéristiques des cellules précurseurs avec, en particulier, une forte immunoréactivité *TH*. Des cellules de ce type vont s'associer en îlots au cours du dernier tiers de la gestation (E 16,5/17,5). Au cours du développement embryonnaire, les cellules des îlots sont toujours *SRIF*(-) et *NPY*(-).

Entre le 13<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour de la gestation, une seconde migration s'opère. Au stade E 14,5, des cellules *TH*(+) sont observées en position ventrale par rapport à l'aorte ; elles sont peu abondantes mais deux populations cellulaires s'individualisent très rapidement pour former des ganglions distincts mais parfois enchevêtrés (fig 1- 16 F ; 19 A, C et E).

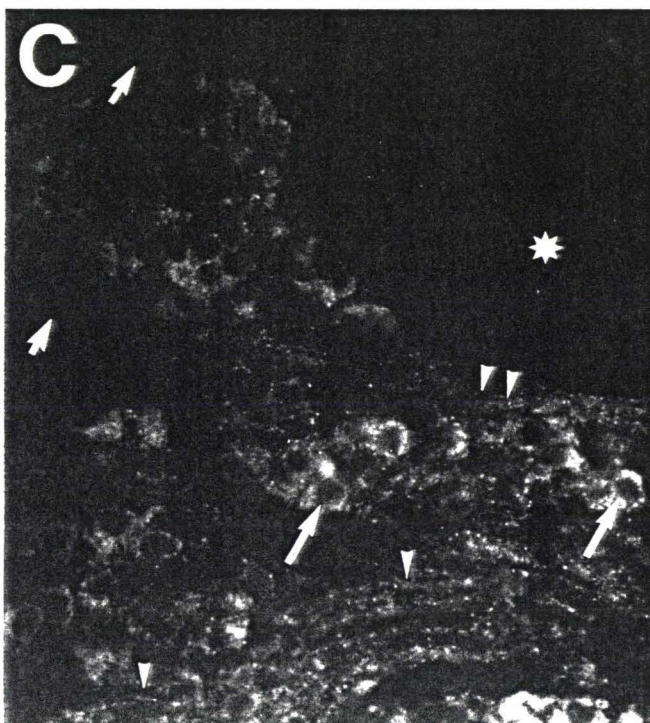
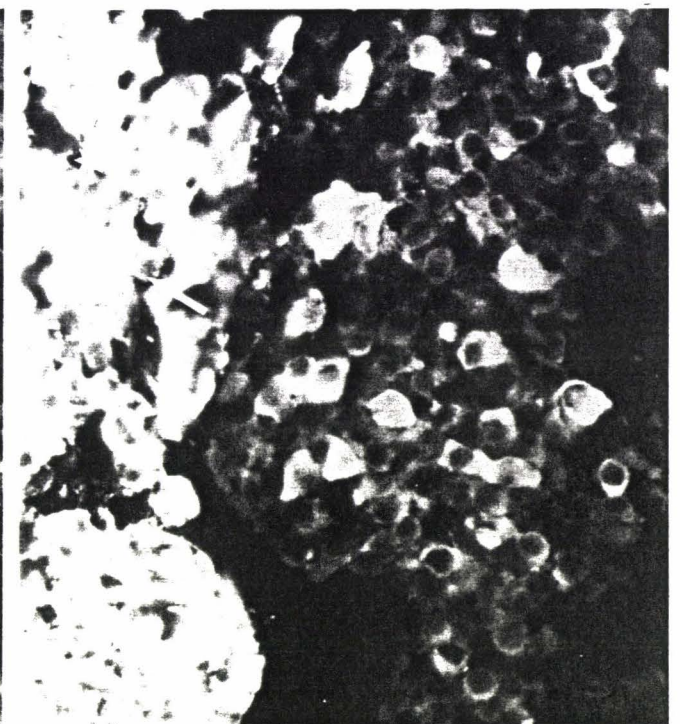
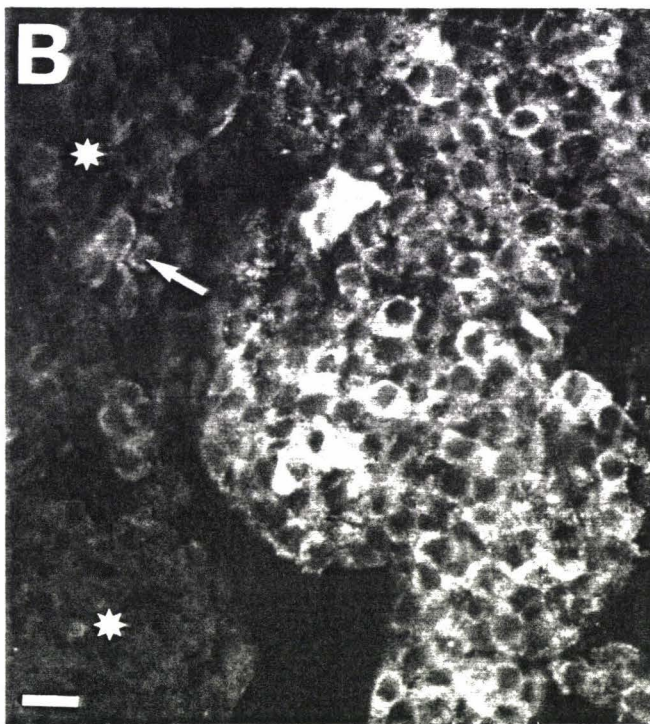
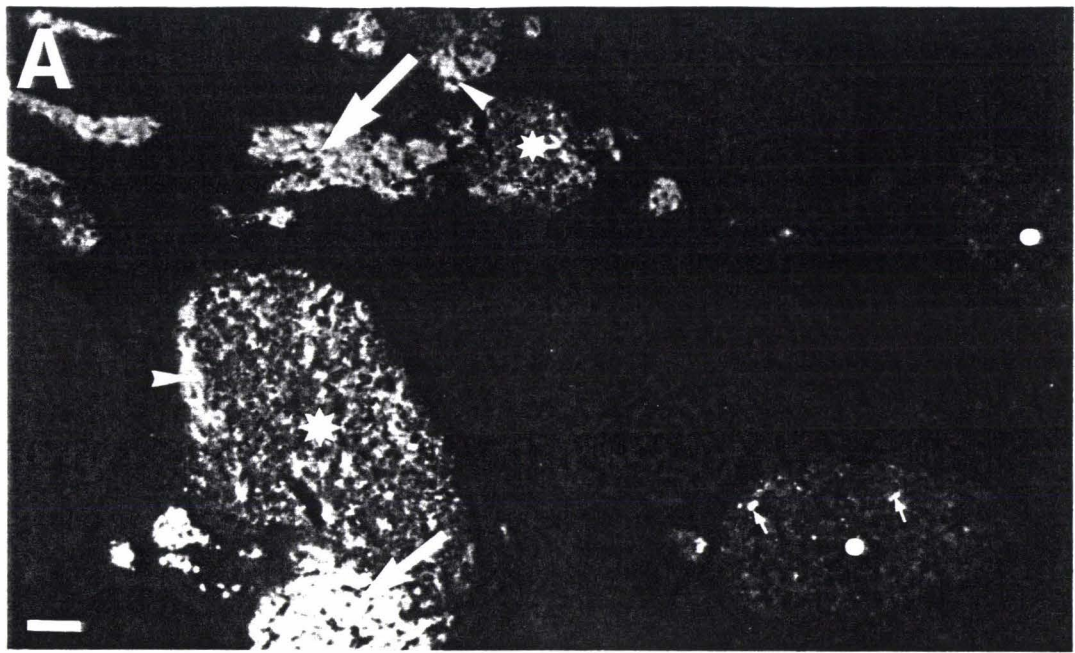
Toutes les cellules catécholaminergiques prévertébrales sont initialement *SRIF*(-) et, seules des cellules des ganglions caractérisés par un fort marquage *NPY*ergique et un faible marquage catécholaminergique, exprimeront un marquage anti-*SRIF*. Celui-ci apparaît avec la même chronologie que dans la CPV ; absent jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour de gestation, il apparaît au-delà. Entre E 16,5 et E 19,5, l'intensité du marquage anti-*SRIF* est plus faible que celle observée dans la CPV ou dans certains ganglions péricruraux. Durant la période E 17,5 - E 19,5, les cellules sont, dans leur majorité, *NPY*ergiques, faiblement catécholaminergiques et somatostatinerigiques. A la naissance, le marquage anti-*SRIF* n'est détecté que dans de rares cellules.

L'autre type de ganglion correspond aux paraganglions. Jusqu'à E 19,5, les cellules qui les constituent sont intensément *TH*(+) (Figures 1-16 F et 1-19 A, C, E), *NPY*(-) (Figures 1-16 F et 1-19 B, C) et *SRIF*(-). Des îlots de cellules paraganglionnaires sont également observés au sein des ganglions sympathiques péricruraux (Figure 1-19 C/E) ; leur taille importante les distingue des îlots de cellules *SIF* embryonnaires. Les structures paraganglionnaires n'ont pas fait l'objet d'un examen exhaustif et n'ont pas été étudiées dans la période périnatale. Des investigations réalisées avec les divers immunosérums suggèrent que ces









cellules sont hétérogènes. Par exemple, un marquage anti-MERGL est détecté dans certaines de ces cellules dès E 16,5.

*Dans le plexus prévertébral, les ganglions peuvent avoir une distribution complexe mais très tôt, au moins deux grandes populations de cellules s'individualisent et constituent des ganglions distincts. L'une de ces populations exprime, avec une chronologie comparable, les mêmes immunoréactivités (TH(±)/NPY(+)/SRIF(+)) que celles observées dans les neurones de la CPV. Jusqu'à E 19,5, l'autre population présente apparemment les mêmes caractéristiques immunohistologiques que les cellules SIF de la CPV. Elle est intensément TH(+) mais SRIF(-) et NPY(-).*

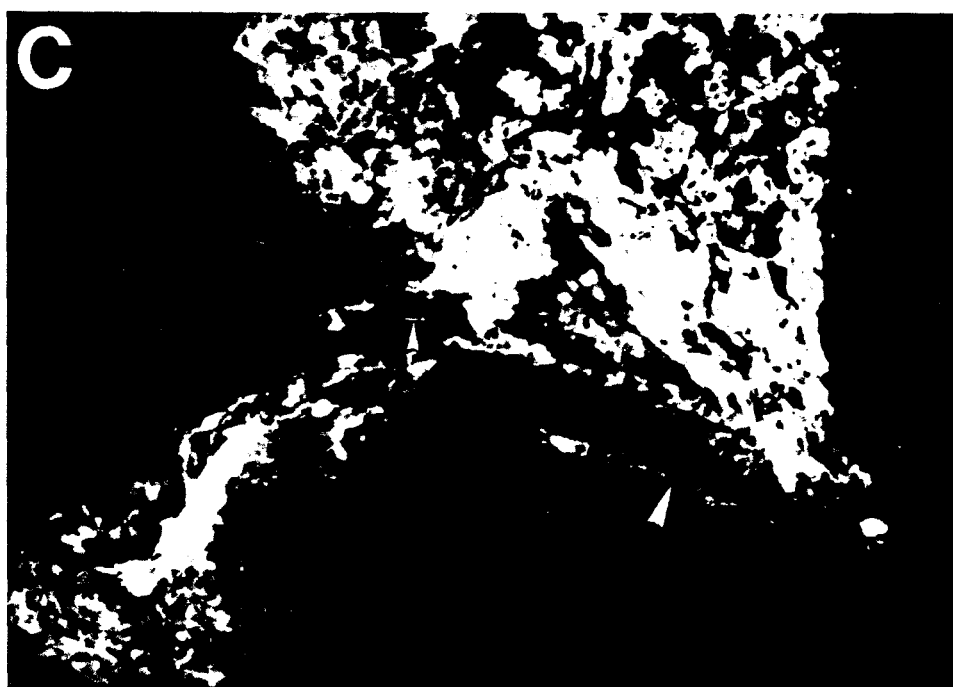
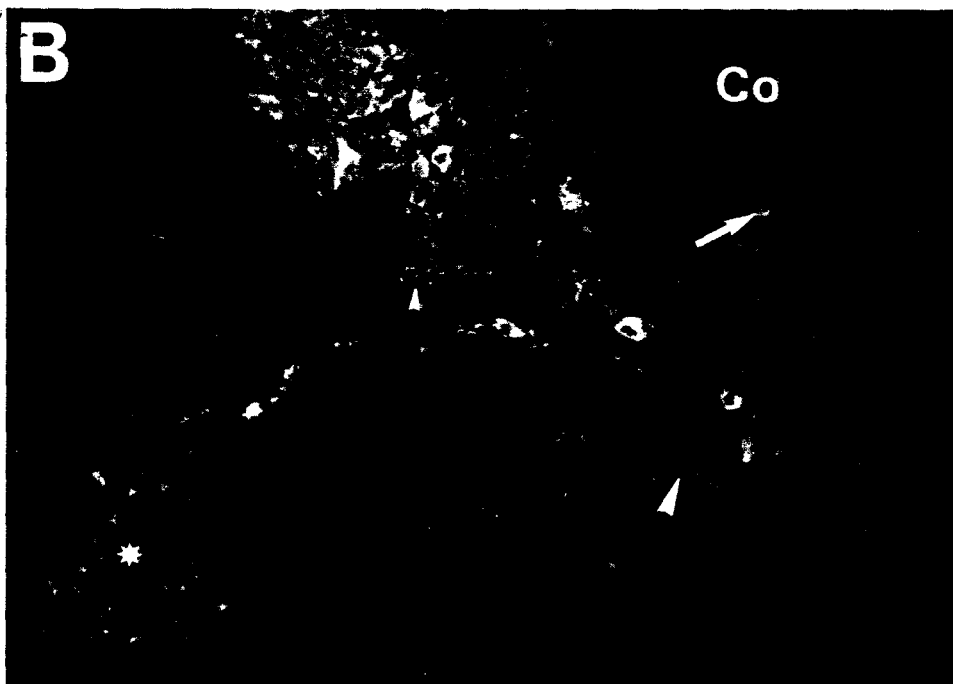
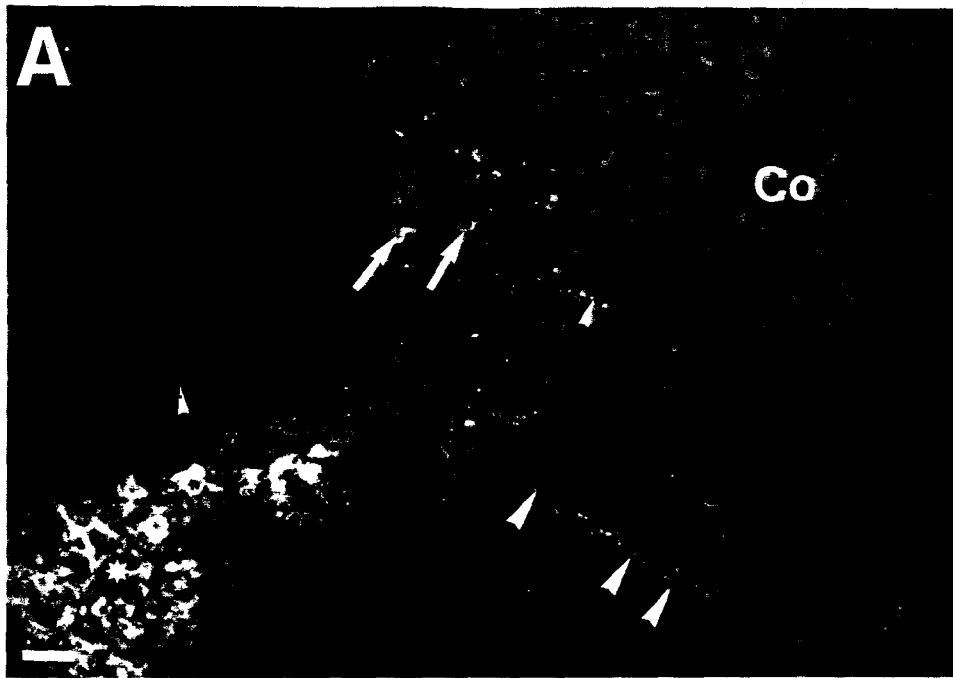
## 2°) Ontogenèse surrénalienne

Nous avons étudié l'apparition d'immunomarquages en parallèle avec la détection d'une activité NADPH-diaphorase dans les cellules du cortex surrénalien. Seuls les immunomarquages bien représentés dans la surrénale adulte ont fait l'objet d'un examen exhaustif (marquages anti-NPY, anti-MERGL, anti-NT, anti-CGRP, anti-PNMT et anti-5-HT).

### a) Colonisation surrénalienne

La colonisation s'opère en deux étapes à partir de la CPV. Entre les stades E 13,5 et E 14,5, des cellules migrent simultanément en direction des plexus prévertébraux et du cortex fœtal. A ces stades, les cellules du cortex fœtal ne présentent aucune activité NADPH-diaphorase, même lorsque les temps de réaction ont été prolongés. Au pôle aortique du cortex surrénalien, des cellules sympathoprécurseurs constituent un ganglion alors que d'autres cellules semblent quitter ce blastème pour coloniser le cortex (Figure 1-20). Aux stades E 14,5 - E 15,5, certaines cellules du blastème sont NPYergiques et l'on détecte également quelques rares cellules somatostatinerigiques (Figure 1-20). Ce blastème constituera vraisemblablement un ganglion nerveux puisque les marqueurs immunohistochimiques caractérisant les neurones de la CPV ou ceux des PPV sont détectés avec une chronologie comparable dans de nombreuses cellules (Figure 1-20). Dans certains







blastèmes, il n'est pas rare de détecter des îlots de cellules ayant les caractéristiques de cellules paraganglionnaires.

Pendant la phase de colonisation (E 14 - E 15), à l'exception des rares cellules NPYergiques (Figure 1-20 B), aucune autre immunoréactivité n'est observée dans les cellules catécholaminergiques TH(+) qui colonisent le cortex. Ces cellules sont SRIF(-), PNMT(-), 5-HT(-), MERGL(-), CGRP(-), GAL(-), CCK(-), VIP(-) et SP(-). Dès cette phase, de rares fibres somatostatinerigiques et/ou NPYergiques sont présentes à proximité des cellules colonisant le cortex. A partir du stade E 15,5, pour des temps de réaction entraînant un intense marquage des cellules corticales de la surrénale adulte, une faible activité NADPH-diaphorase est détectée dans de nombreuses cellules corticales qui présentent par ailleurs de rares gouttelettes réfringentes.

Dès ce stade et plus généralement à E 16,5 (en fonction des fœtus), différents types cellulaires peuvent être individualisés au sein du cortex fœtal d'après leur distribution et les immunoréactivités qu'ils expriment ; c'est ainsi que l'on peut noter :

a) des cellules, initialement dispersées dans le cortex fœtal, présentant généralement un intense marquage TH. Ces cellules expriment déjà (ou exprimeront) les immunoréactivités caractéristiques des cellules chromaffines de l'adulte.

b) des cellules faiblement TH(+) mais fortement NPY(+) et C-PON(+). Ces cellules s'associent en îlots caractéristiques dans lesquels on détecte également la présence de SRIF. Elles possèdent donc les caractéristiques immunohistologiques des neurones sympathiques embryonnaires de la CPV et des PPV.

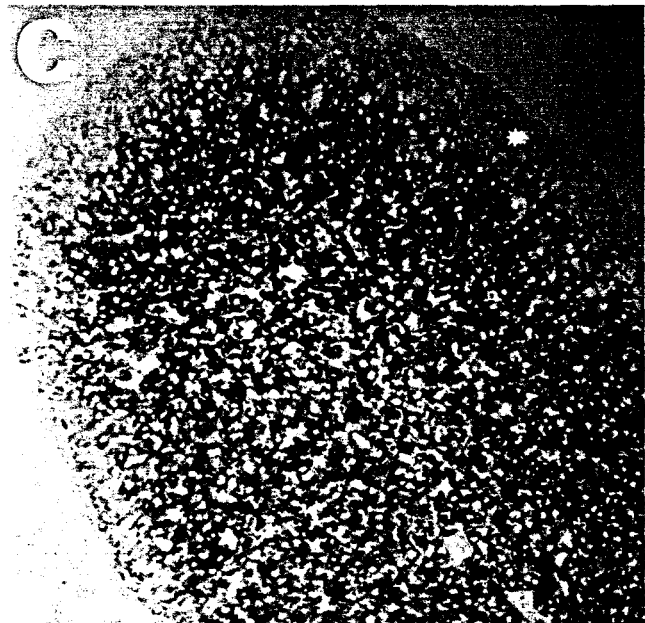
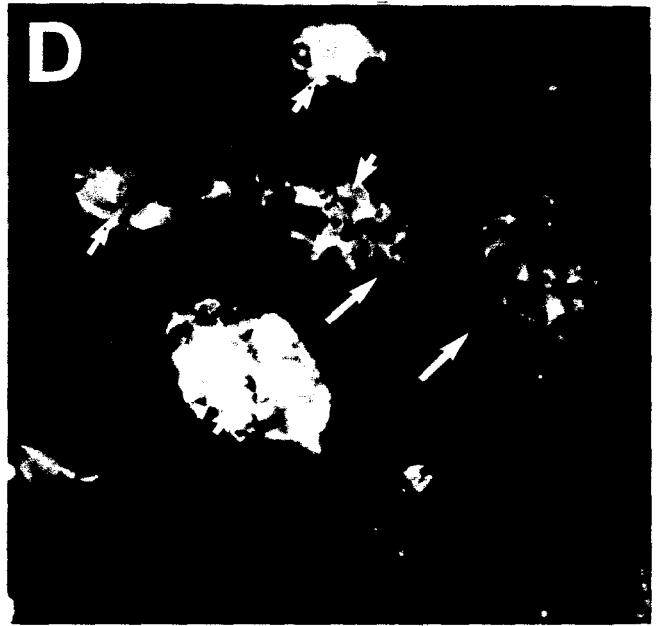
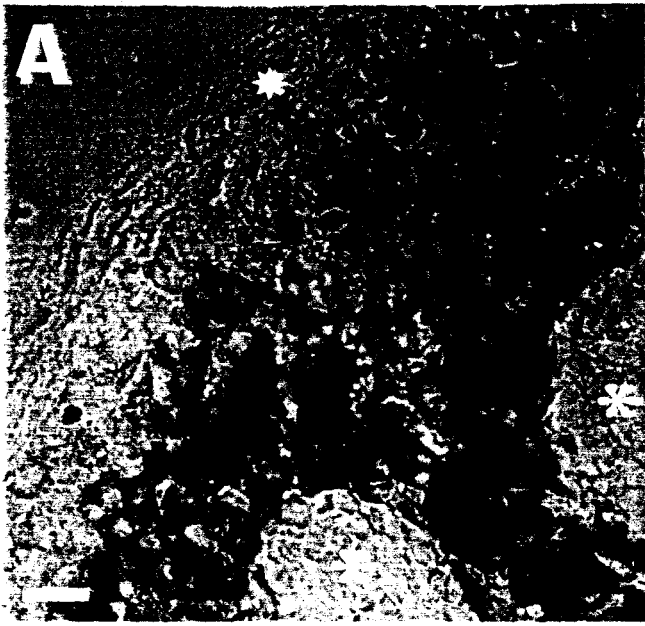
#### **b) Cellules chromaffines et activité NADPH-diaphorase.**

A partir du stade E16,5, le marquage par la réaction histochimique est hétérogène, certaines cellules apparaissant beaucoup plus fortement marquées que d'autres (Figure 1-21 A). Parallèlement, on observe une augmentation du nombre de granules réfringents vraisemblablement de nature lipidique.

Dans des cellules dûment identifiées en tant que cellules chromaffines, entre E 15,5 et E 16,5, apparaissent simultanément les marquages anti-PNMT, anti-5-HT, et, pour de rares cellules, anti-MERGL et anti-NPY. Entre E 16,5 et E 19,5 il n'y a pas de fort marquage NPYergique dans les





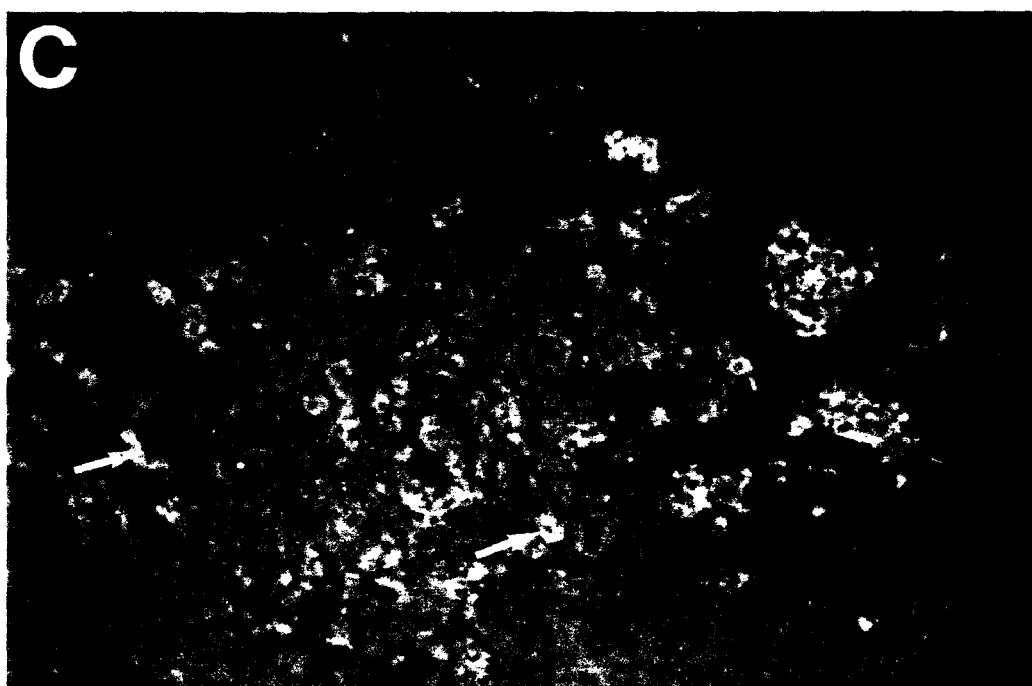
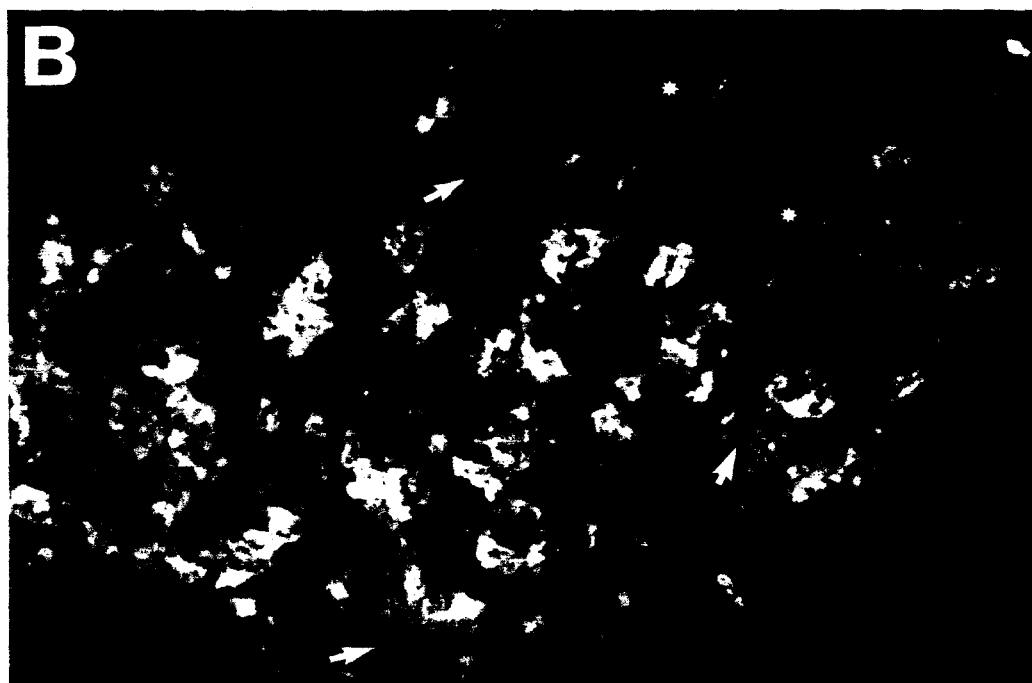
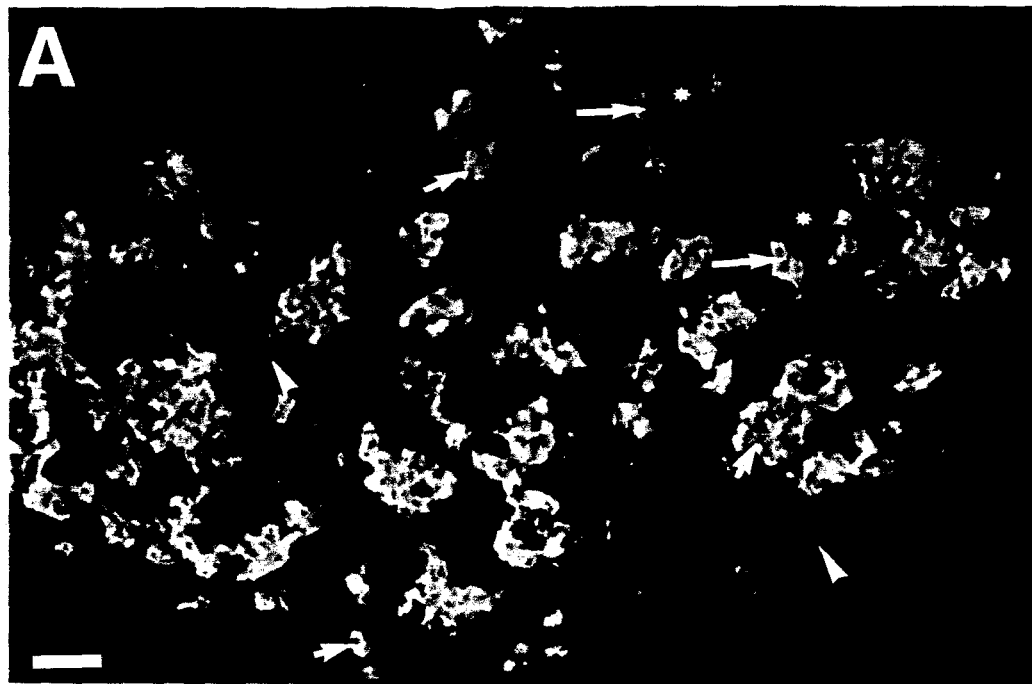


## Figure 1-22

Stade E 17,5. Marquages anti-TH(A), anti-5-HT(B) et anti-C-PON (C) dans la glande surrénale.

A - C : Double marquage TH/5-HT (A/B) dans les cellules médullosurrénaliennes. Les marquages sont colocalisés dans la majorité des cellules chromaffines mais certaines cellules intensément immunoréactives pour la TH sont dépourvues de marquage anti-5-HT (flèches courtes). Les neurones associés en îlots (étoiles) sont faiblement immunoréactifs pour la TH et sont dépourvus de marquage anti-5-HT. Des cellules qui possèdent les caractéristiques de cellules précurseurs (fortement marquées par l'anti-TH) sont détectées autour de ces neurones (flèches en A). Cette coupe a préalablement été traitée pour mettre en évidence une activité NADPH diaphorase dans les cellules corticales (pointes de flèches). C : Les mêmes îlots de neurones (étoiles) réapparaissent sur cette coupe espacée de 40  $\mu\text{m}$  par rapport à la coupe A/B. Les cellules qui sont associées en îlots sont intensément marquées par l'anti-C-PON (étoiles) mais seules de rares cellules chromaffines, fortement marquées par l'anti-TH (non illustré), sont immunoréactives pour le C-PON (flèches en C).

Barre en A : 50  $\mu\text{m}$ .

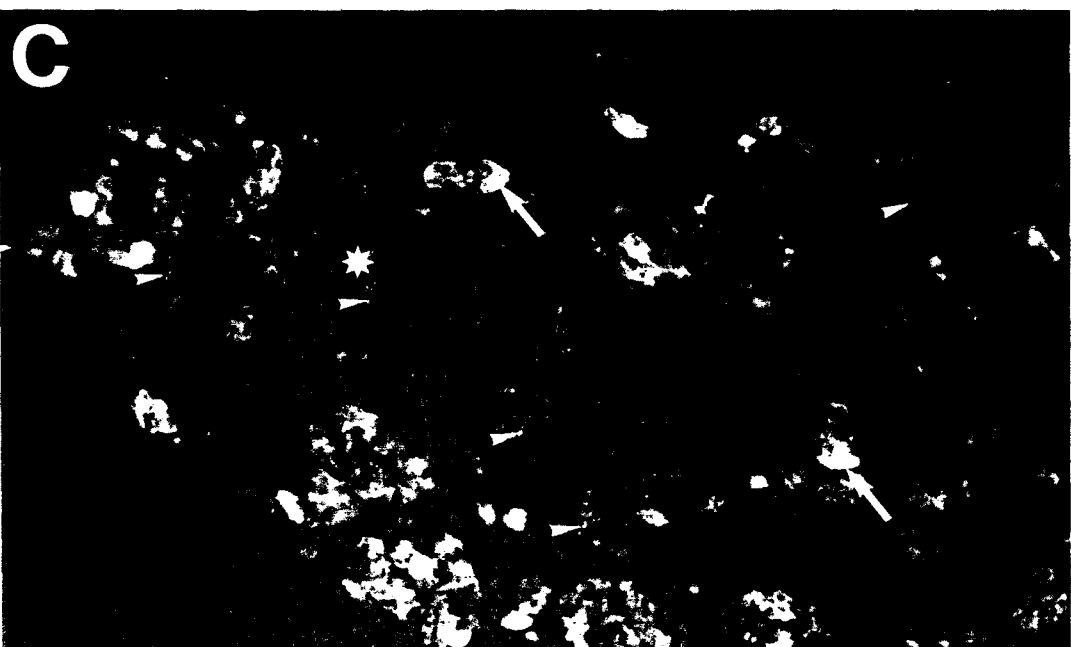
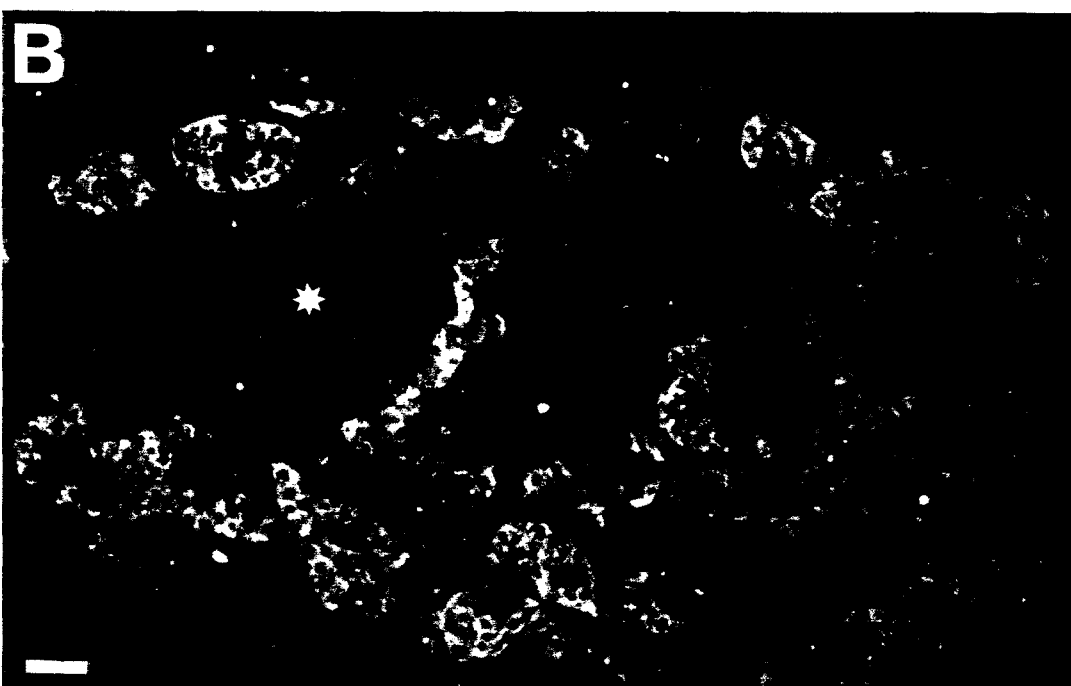
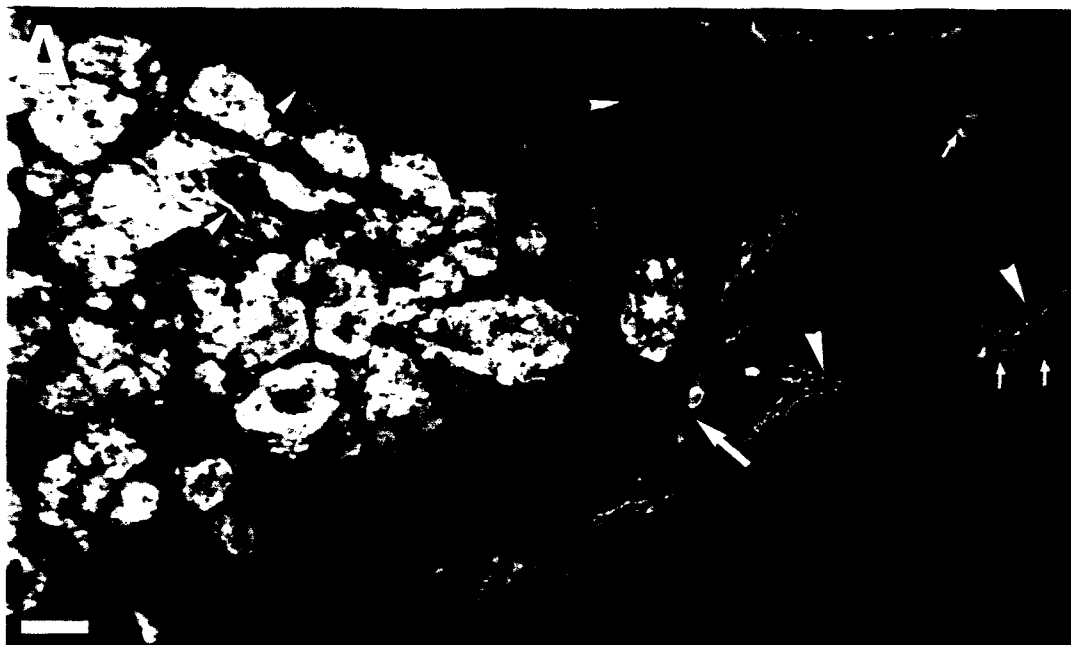


cellules chromaffines mais le nombre de cellules faiblement marquées augmente (Figures 1-21 D/E et 1-22 C). Ces cellules chromaffines n'expriment pas aussi intensément une immunoréactivité NPY-like que les neurones du blastème ou des îlots intrasurréaliens (Figures 1-21 E et 1-22 C). Au cours de cette période, on peut noter parallèlement une uniformisation et une forte augmentation de l'activité NADPH-diaphorase dans les cellules corticales (Figure 1-21 A et B). C'est à partir de E18,5, que la majorité des cellules corticales présente un intense marquage NADPH(+) et que des différences d'intensité de marquage sont clairement visibles entre la zone glomérulée et les zones sous-jacentes.

Autour du 17<sup>ème</sup> jour de gestation, un marquage anti-neurotensine (NT), faible en intensité, apparaît dans quelques cellules chromaffines. Peu de temps après, à E 19,5, de rares cellules chromaffines peuvent être marquées par l'anti-CGRP. Au cours de l'ontogenèse surrénalienne, le nombre de cellules chromaffines marquées par les différents anti-neuropeptides présente déjà des variations inter-individuelles. Néanmoins, chez le fœtus à terme et principalement chez les nouveau-nés, la majorité des cellules chromaffines est NPYergique et neurotensinergique tandis que les cellules marquées par l'anti-MERGL et l'anti-CGRP sont toujours abondantes, ce qui n'est pas le cas chez l'adulte (Figures 1-23 et 1-24). Contrairement aux cellules chromaffines des nouveau-nés de 1 et 2 jours (toujours fortement immunoréactives), celles de surrénales prélevées peu de temps après la naissance (NN 0) sont parfois dépourvues d'un intense marquage pour tous ces anti-neuropeptides. Ce n'est qu'à partir du quinzième jour postpartum que les marquages anti-neuropeptides sont "similaires" à ceux que l'on détecte dans la médullosurrénale de l'adulte.

Entre E 16,5 et la naissance, le nombre de cellules chromaffines augmente ; ces cellules s'associent progressivement en une structure médullaire centrale. La présence de cellules dans le cortex fœtal peut être cependant observée jusqu'au terme de la gestation et même dans la période post-natale (Figure 1-23 A). Une délimitation nette entre cortex et médulla pour la souche de rat étudiée (Wistar) s'opère ; les surrénales adultes qui présentent des digitations de cellules chromaffines s'immiscant dans le cortex superficiel sont relativement rares. A partir du stade E 17,5/18,5, les cellules chromaffines observées en situation ectopique dans le cortex sont toujours des cellules bien différenciées pouvant exprimer des marquages anti-PNMT, anti-NPY, anti-5-HT, anti-







MERGL et aussi anti-NT. Jusqu'à la naissance, de rares cellules fortement marquées par les IgG anti-TH sont parfois dépourvues de marquage anti-PNMT ou -5-HT (Figure 1-22 A et B). Nous n'avons pas détecté de cellules chromaffines marquées par les immunosérums anti-GAL et anti-SP au cours du développement embryonnaire et chez les nouveau-nés de 1 et 2 jours.

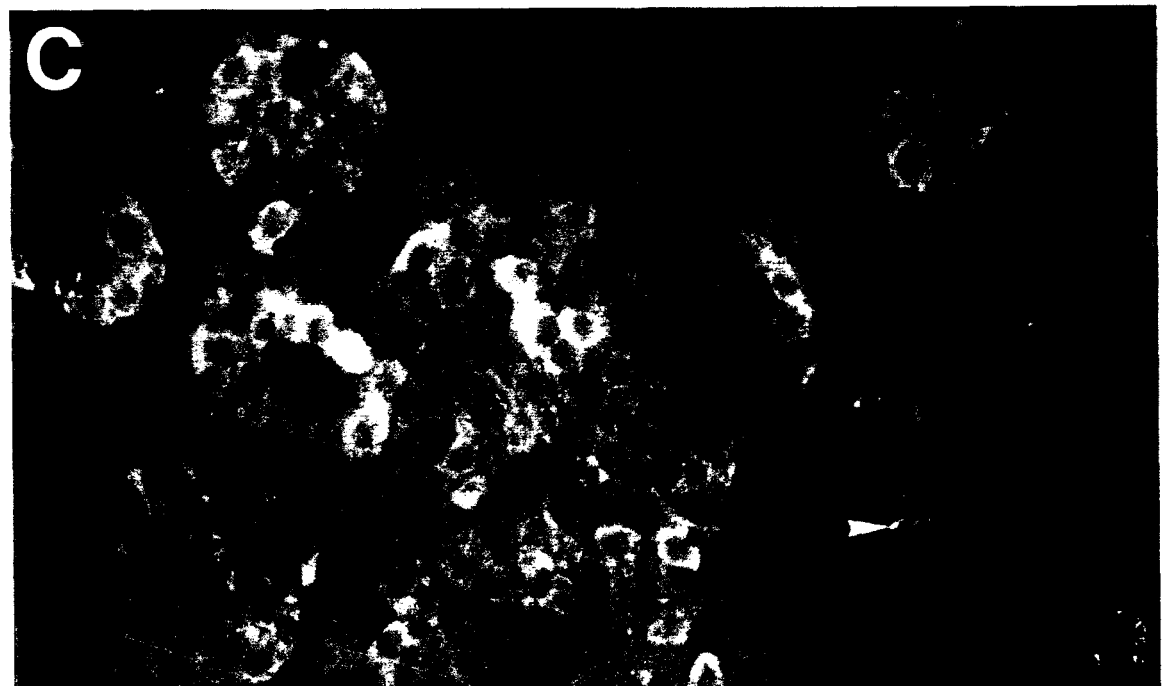
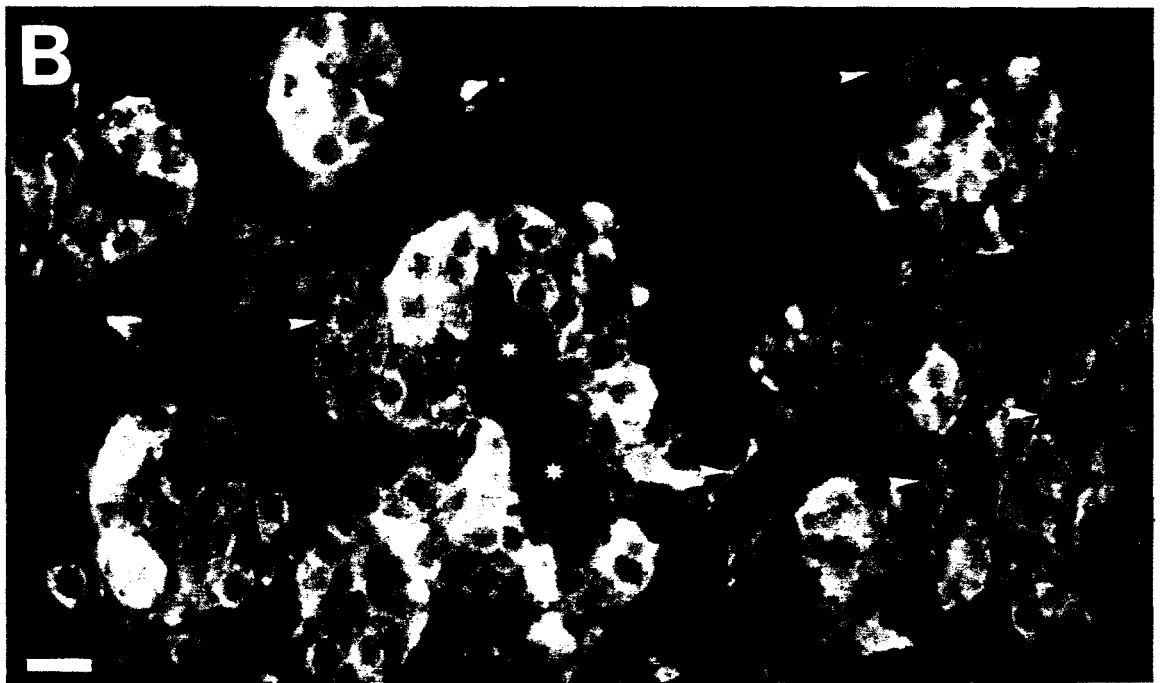
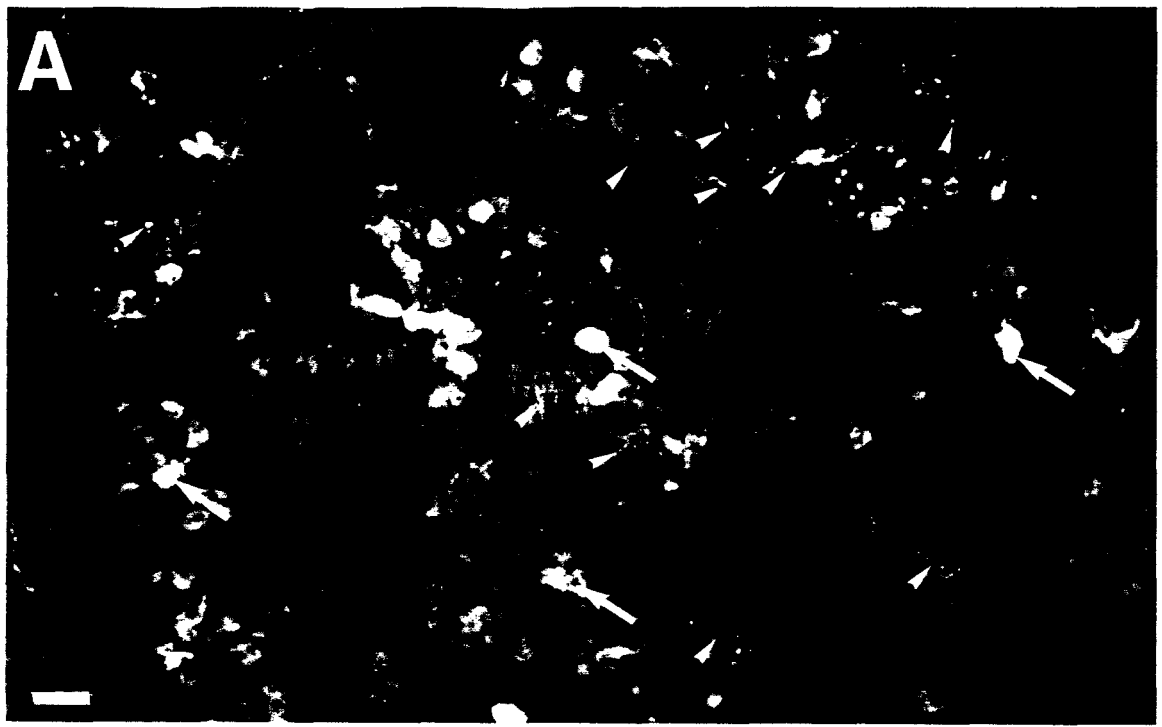
*En résumé, dès E 16,5, les immunoréactivités anti-PNMT, anti-5-HT, anti-NPY et anti-MERGL sont détectées dans des cellules chromaffines. Avant E 19,5, le NPY est généralement peu, voire pas, exprimé dans les cellules chromaffines mais la présence de rares cellules marquées par les anti-NPY est observée dès la phase de colonisation du cortex fœtal. Dans les cellules chromaffines, on observe une apparition prénatale des marquages anti-NPY, anti-NT, anti-CGRP et anti-MERGL. Chez tous les nouveau-nés de 1 jour, les cellules chromaffines marquées par les anti-MERGL anti-CGRP, anti-NPY et anti-NT sont plus nombreuses et/ou présentent généralement une intensité de marquage plus forte que chez le fœtus ou l'adulte. Dans la période périnatale, la PNMT et la 5-HT ne sont pas exprimées dans toutes les cellules chromaffines fortement TH(+). Les cellules chromaffines ne sont jamais SRIF(+) au cours du développement et chez l'adulte. L'apparition des marquages anti-MERGL, anti-PNMT, anti-NPY et anti-5HT pourrait être temporellement corrélée avec l'apparition d'une activité-NADPH diaphorase et de gouttelettes lipidiques dans les cellules corticales. De même, l'apparition des marquages anti-NT et anti-CGRP pourrait être en relation avec la forte augmentation de l'intensité du produit de cette réaction dans les cellules corticales. La colonisation ne paraît pas se poursuivre tardivement au cours de l'ontogenèse surrénalienne puisque, dès E 17,5, les cellules détectées dans le cortex sont en général bien différenciées.*

### c) Neurones intra- ou péricapsulaires

Dans la surrénale, une population de cellules plus intensément NPY(+) que les cellules chromaffines et faiblement TH(+) (Figures 1-21 D/E et 1-25 B et D) n'est par contre jamais marquée par les anti-PNMT, -5-HT, -NT, -CGRP et -MERGL (Figures 1-22 B et 1-23 B et C). Ces cellules sont associées en îlots qui, selon le stade de gestation et les fœtus, peuvent être plus ou moins nombreux et importants par leur taille. Quant à leur localisation elle paraît assez anarchique puisque de tels îlots ont pu être observés jusque sous la capsule fibreuse. Un marquage somatostatinergique est également détecté dans certains îlots dès E16,5 et surtout entre E 18,5 et E 19,5 (Figures 1-21 F et 1-25 A, E et C) mais tous les îlots, de même que toutes les cellules de ces îlots, ne sont pas toujours SRIF(+) (Figure 1-25 A et C). Aux stades où ils sont les plus nombreux, ces îlots peuvent être de grande taille (Figure 1-25 A/D). Dans certains d'entre eux, de rares cellules SRIF(+) sont encore détectées à terme (21<sup>ème</sup> jour de gestation). Dans ces îlots, le marquage anti-SRIF est généralement d'intensité comparable à celui des neurones des plexus prévertébraux. Des fibres somatostatinerghes (Figure 1-25 E) et NPYergiques (Figure 1-25 B) paraissant provenir de ces îlots et semblant se diriger vers le cortex surrénalien, ont été détectées dès le 17<sup>ème</sup> jour de gestation. Au cours du développement embryonnaire, des cellules fortement catécholaminergiques sont souvent détectées en bordure de ces îlots de neurones (Figures 1-21 D ; 1- 22 A et 1-25 D). A 1 ou 2 jours postpartum, les neurones sont moins nombreux mais encore présents. Chez les nouveau-nés de 8 ou 15 jours ou chez l'adulte, les îlots de neurones sont généralement rares, le nombre de cellules qui les constituent est fortement réduit ; à ces stades postnataux, un très faible marquage anti-TH peut toujours être détecté (Figure 1-25 F), contrairement au marquage somatostatinerghique. Un marquage anti-NPY golgien, caractéristique des neurones de l'adulte, a été clairement détecté chez les nouveau-nés de 15 jours. Chez les nouveau-nés de 1 et 2 jours, un marquage anti-SRIF n'est plus détecté dans la majorité des neurones NPYergiques des ganglions péricapsulaires (Figure 1-26 B/E).

*En résumé, les cellules des îlots intrasurrénaliens, ainsi que celles du ganglion qui se forme au pôle aortique de la surrénale, partagent les marqueurs des sympathoblastes de la CPV et de certains ganglions des plexus prévertébraux. Ces neurones intrasurrénaliens sont précocement*





*associés en îlots. Chez les nouveau-nés de 8 et 15 jours et chez l'adulte, ces îlots de neurones sont également présents mais ils sont dépourvus de marquage anti-SRIF. De plus, leur taille et leur nombre ne sont plus comparables à ce qu'ils étaient au cours du développement prénatal.*

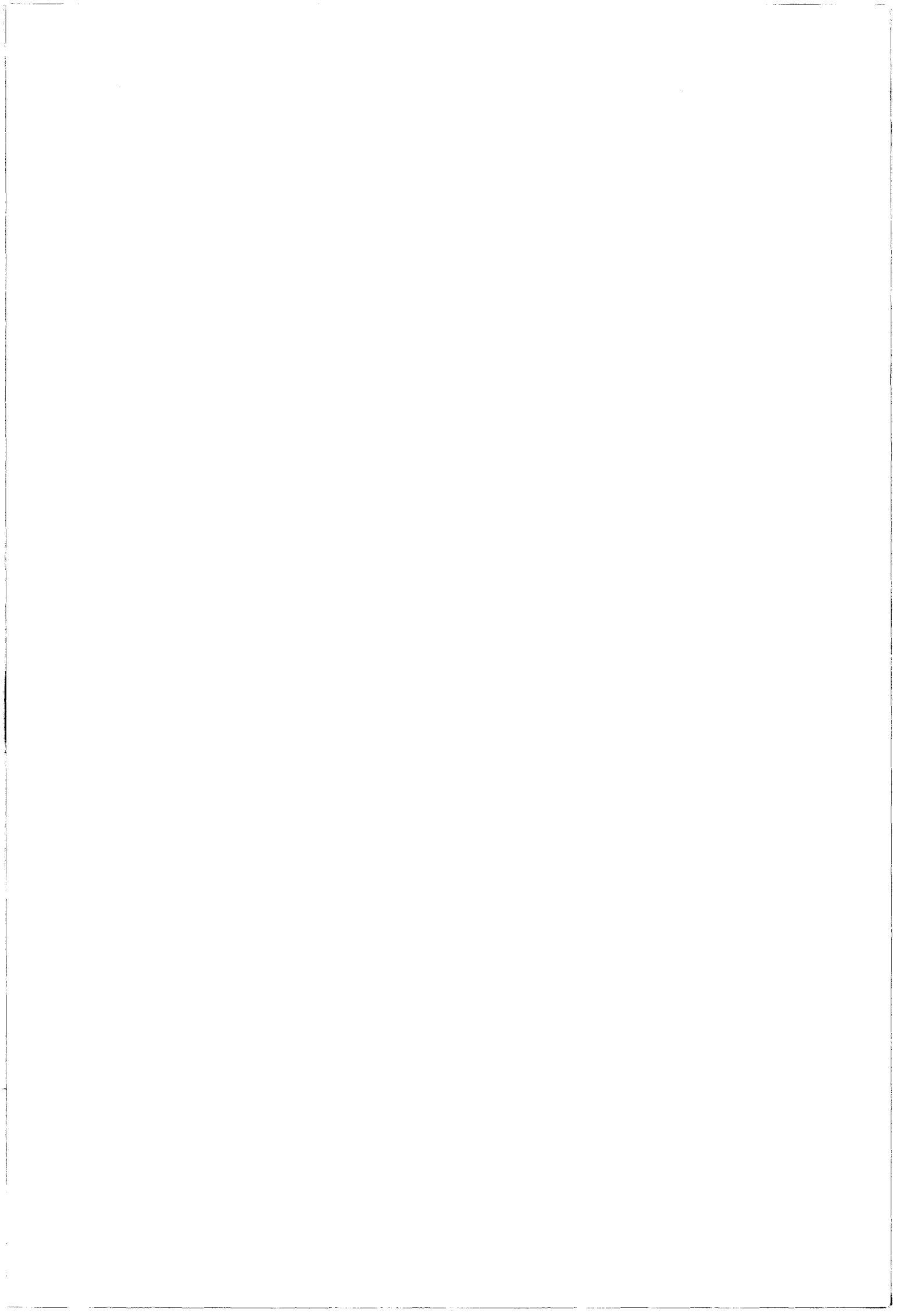
#### **d) Innervation surrénalienne**

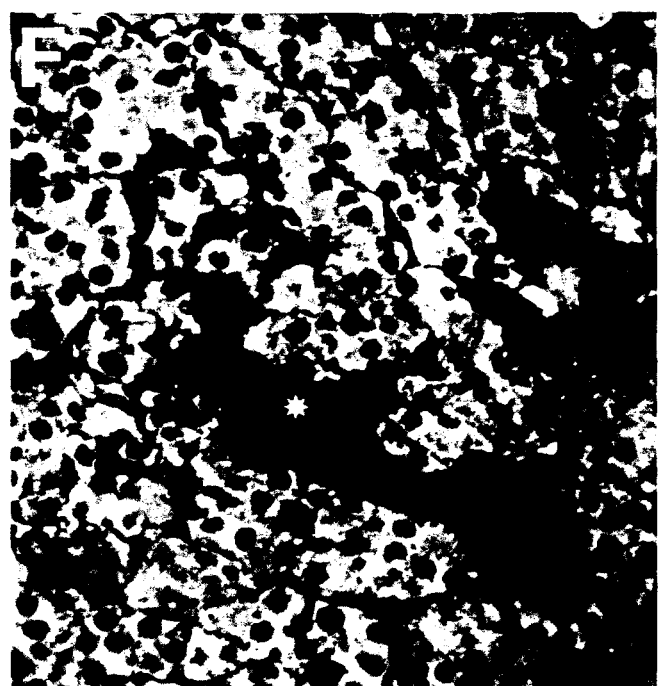
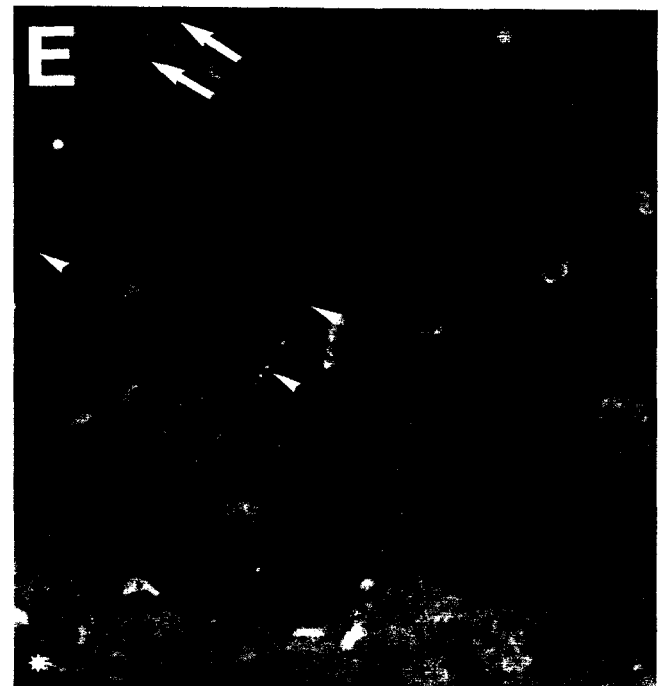
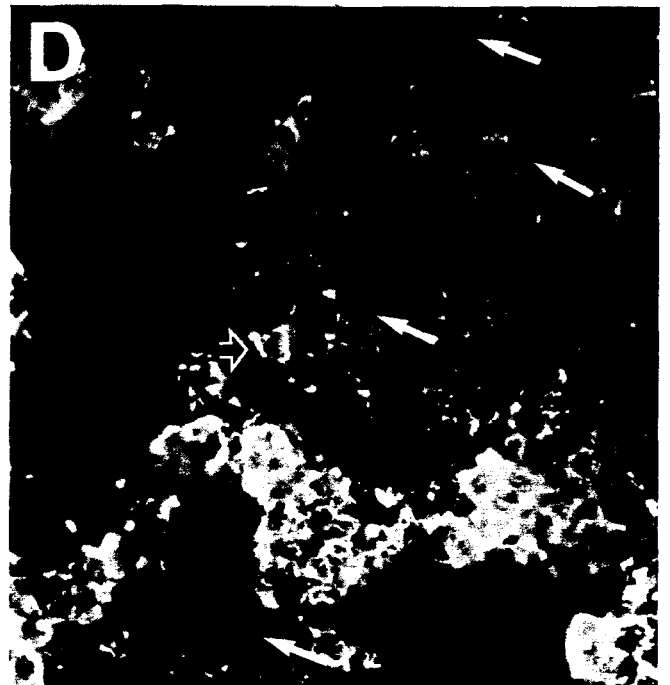
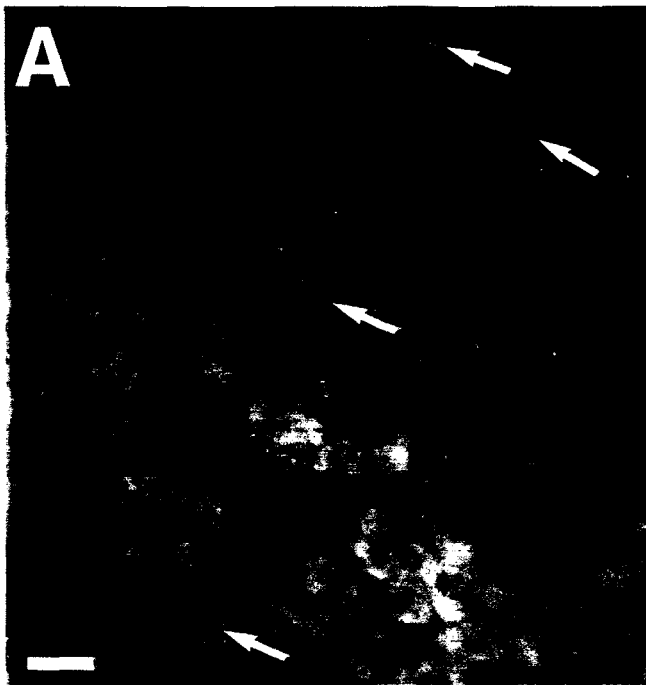
Nous avons recherché la présence de fibres nerveuses à proximité des cellules chromaffines avant et dès la naissance. Très tôt au cours du développement embryonnaire, des fibres marquées par les immunsérums anti-TH, -NPY ou -SRIF sont visibles dans et autour de la surrénale (Figure 1-20). Dans la période périnatale, de nombreuses fibres NPYergiques et catécholaminergiques, mais de rares fibres somatostatinerigiques, peuvent être détectées dans de gros troncs nerveux dirigés vers la médullosurrénale (Figure 1-26 B/E). Des fibres NPYergiques sont détectées à proximité des cellules médullaires qui sont, à ces stades, fortement NPY(+) et TH(+) (Figure 1- 23 A ; 1-24 B). Dès le 19<sup>ème</sup> jour de la gestation, de très rares fibres marquées par l'immunsérum anti-CGRP sont présentes à proximité des cellules chromaffines et des îlots de neurones ; par la suite, la densité de cette innervation augmente. De gros troncs nerveux pénétrant le cortex (Figure 1-26 D) et de nombreuses fibres innervant le tissu médullaire sont observés aux alentours de la naissance (Figure 1-23 C ; 1-24 A et 1-26 F). Dans la médullosurrénale périnatale, on ne détecte pas de fibres marquées par les immunsérums anti-GAL, -CCK ou -SP. Chez des nouveau-nés, de rares fibres marquées par les immunsérums anti-VIP ou anti-MERGL (Figure 1-24 C) ont été observées à l'intérieur ou dirigées vers la médullosurrénale.

Dans le cortex surrénalien, la présence de fibres sous-capsulaires SRIF(+) a pu être détectée autour du 17<sup>ème</sup> jour de gestation (Figure 1-26 A). Ces fibres pourraient, en partie, provenir des neurones somatostatinerigiques intramédullaires (Figure 1-25 E). Au voisinage de la naissance, des fibres corticales à NPY/TH, VIP/TH et CGRP sont visibles. Les fibres NPYergiques (Figure 1-26 E) sont plus abondantes que celles à VIP ou à CGRP ; elles sont cependant moins nombreuses que chez l'adulte, mais ont une distribution comparable. L'innervation sous-capsulaire somatostatinerigique n'est plus détectée à la naissance (Figure 1-26 B).

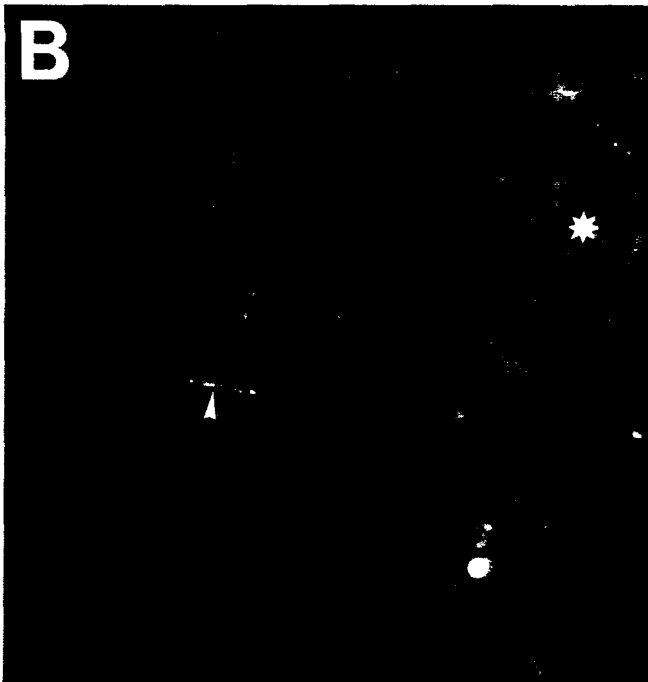
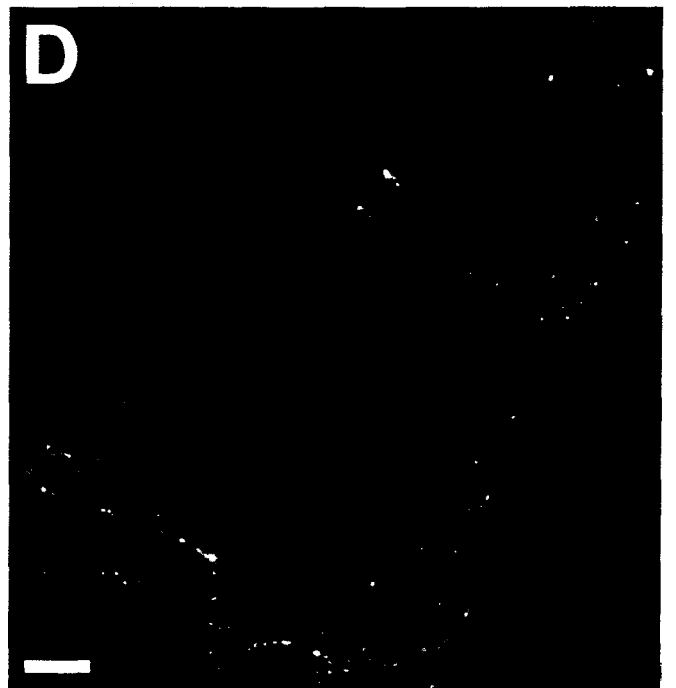
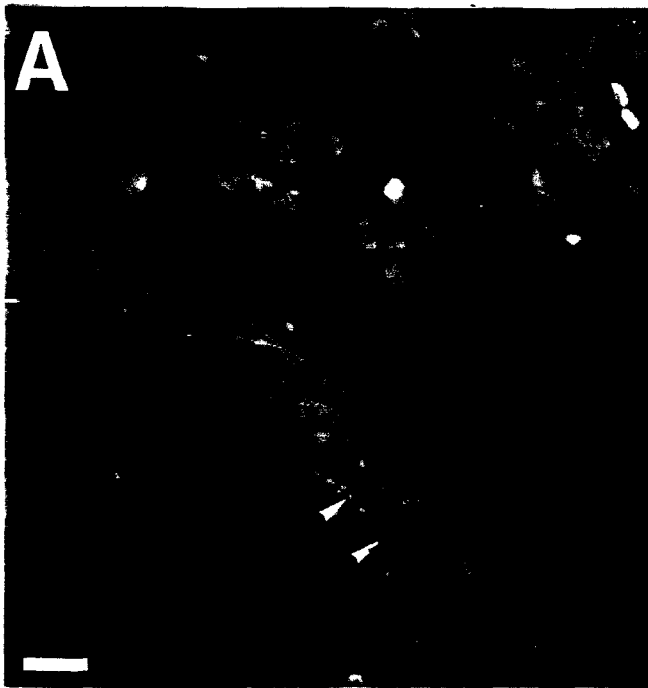
*Dans la période périnatale, de gros troncs nerveux NPY/TH(+) ou CGRP(+) sont observés en direction de la médullosurrénale ; certaines des fibres qui les constituent sont visibles à proximité de cellules chromaffines et de neurones ganglionnaires. Le cortex surrénalien présente également de rares fibres peptidergiques à NPY/TH, VIP/TH et CGRP.*











#### IV - DISCUSSION

##### Distribution de messagers chimiques dans la surrénale du rat adulte

###### *Le Neuropeptide Y (NPY).*

La détection par hybridation *in situ* des ARNm du Neuropeptide Y (NPY) et le marquage à l'aide d'immunsérums spécifiques anti-NPY et anti-C-PON, montrent sans ambiguïté que le NPY est synthétisé dans la majorité des cellules chromaffines de la surrénale du rat adulte, dans des neurones intrasurréaliens et aussi dans de nombreux neurones de ganglions situés au voisinage de la surrénale. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de PIERIBONE et coll. (1992) relatifs à la distribution des ARNm codant pour le NPY dans le système nerveux périphérique et la surrénale, ainsi qu'avec ceux de SCHALLING et coll. (1988a, b, 1991) et de DAGERLIND et coll. (1990) relatifs à la présence d'ARNm codant pour le NPY dans les cellules chromaffines et les neurones intrasurréaliens du rat.

Notre étude immunohistologique montre par ailleurs que le NPY est préférentiellement exprimé dans les cellules chromaffines adrénérgiques, marquées par l'immunsérum anti-PNMT [PNMT(+)] et par ailleurs 5-HT(+). Néanmoins, un marquage est parfois associé à de rares cellules appartenant à des îlots de cellules noradrénérgiques [PNMT(-)]. Cette localisation préférentielle de NPY dans les cellules adrénérgiques est en accord avec les précédentes observations de plusieurs auteurs (KURAMOTO et coll., 1986 ; LUNDBERG et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990) mais en désaccord avec celles de VARNDELL et coll. (1984) et MAJANE et coll. (1985), qui signalent au contraire une expression de NPY dans les cellules noradrénérgiques de la surrénale de mammifères, dont celle de bovins. De leur côté, SCHALLING et coll. (1988) rapportent, comme nous, la présence possible de NPY dans les deux types de cellules chromaffines du rat, avec toutefois, une localisation préférentielle dans les cellules adrénérgiques. Les immunsérums que nous avons utilisés pour détecter les cellules NPYergiques ne donnent pas des marquages équivalents. La majorité des cellules chromaffines est marquée par l'anti-NPY

(immunsérum 12) et l'anti-C-PON, bien que ce dernier semble plus sensible que le premier. Une étude réalisée en déposant des fragments de NPY sur des membranes de nitrocellulose nous a permis d'établir que, contrairement au 12, l'anti-NPY obtenu chez le cobaye (cNPY), utilisé pour les doubles marquages, reconnaît le fragment 18-36 du NPY. Ces différences dans la reconnaissance antigénique sont probablement responsables du fait que le cNPY marque moins de cellules chromaffines que le 12 ou l'anti-C-PON. Le cNPY marque de façon plus homogène les dérivés neuronaux de l'adulte (neurones ganglionnaires et fibres nerveuses). Ces observations immunohistochimiques suggèrent que les motifs antigéniques exposés et/ou la biosynthèse du préproNPY pourraient différer selon les types cellulaires (cellules chromaffines, neurones). Des différences de sensibilité et/ou de spécificité des immunsérums utilisés pourraient rendre compte de la grande variabilité des données de la littérature quant au nombre de cellules chromaffines NPYergiques. Pour SCHALLING et coll. (1988b), la grande majorité des cellules chromaffines serait NPYergique, pour d'autres elles ne représenteraient que 40% (HENION et LANDIS, 1990), la moitié (KURAMOTO et coll., 1986) ou plus de la moitié des cellules chromaffines (PELTO-HUIKKO, 1989 ; IGUCHI et coll., 1991). Une autre cause susceptible d'expliquer la divergence des données de la littérature pourrait être la variabilité inter-individuelle que nous avons notée pour l'abondance des cellules marquées à l'aide d'un même immunsérum. Néanmoins, les marquages obtenus avec les immunsérums anti-NPY (12) et anti-C-PON concernent toujours la majorité des cellules chromaffines. Ces observations suggèrent une relative plasticité dans l'expression du NPY au sein des cellules chromaffines. L'expression du gène du NPY dans les cellules chromaffines paraît obéir à des régulations complexes auxquelles participeraient des facteurs nerveux et endocriniens (FISCHER-COLBRIE et coll., 1988 ; HOFLE et coll., 1991). Des études relatives aux ARNm du NPY sont en cours au laboratoire à partir de surrénales d'animaux soumis à des états physiologiques contrôlés.

#### *Cellules chromaffines adrénérgiques ou noradrénérgiques.*

D'après nos observations en double marquage, les cellules noradrénérgiques [PNMT(-)], et par ailleurs 5-HT(-) et NPY(-), sont toujours, contrairement aux cellules adrénérgiques, fortement TH(+). Cette observation pourrait suggérer que la tyrosine hydroxylase (TH), ubiquitaire dans toutes les cellules chromaffines, est davantage



exprimée dans les cellules noradrénergiques que dans les cellules adrénérgiques. L'expression de la TH a fait l'objet de nombreuses études. Il semble que l'innervation préganglionnaire cholinergique soit très fortement, mais non exclusivement, impliquée dans sa régulation ; des facteurs hormonaux, dont les glucocorticoïdes, pourraient également intervenir (SCHALLING et coll., 1991). Toutefois, une intervention de ces hormones corticosurréaliennes paraît assez peu probable au niveau des cellules noradrénergiques puisque celles-ci, contrairement aux cellules adrénérgiques, sont dépourvues de récepteurs pour ces hormones (CECCATELLI et coll., 1991). L'existence d'un contrôle neuronal peptidergique de l'expression de la TH est fortement suggéré par les travaux de SCHALLING et coll. (1991). Un tel contrôle des cellules chromaffines noradrénergiques pourrait être envisagé à la lumière de nos observations immunohistologiques. On peut rappeler, à ce propos, que la substance P (SP) contenue dans des fibres innervant la médullosurrénale (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1985) est, d'après nos propres observations, plus particulièrement associée à l'innervation des îlots de cellules noradrénergiques ; par contre, les fibres enképhalinergiques innervent préférentiellement les îlots de cellules adrénérgiques. Ces données immunohistochimiques sont en faveur d'une innervation peptidergique qualitativement différente des deux types d'îlots de cellules chromaffines. Nos résultats concernant l'innervation enképhalinergique sont en accord avec l'étude de PELTO-HUIKKO (1989). En effet, selon cet auteur, l'innervation préganglionnaire des cellules chromaffines est hétérogène ; les fibres cholinergiques qui innervent les cellules noradrénergiques sont dépourvues d'enképhalines, contrairement à celles innervant les cellules adrénérgiques. A notre connaissance, une innervation préférentielle des îlots noradrénergiques par des fibres SPergiques n'a pas été rapportée dans la littérature ; néanmoins, KURAMOTO et coll. (1985) ont établi que les fibres à SP n'apparaissent pas aussi fréquemment et n'ont pas la même distribution que les fibres enképhalinergiques. Les cellules noradrénergiques recevraient plus de fibres cholinergiques (revue in KACHI et coll., 1993) et/ou de fibres marquées par un anti-NO-synthase (AFEWORK et coll., 1992) que les cellules adrénérgiques. A l'échelle ultrastructurale, des fibres nerveuses établissent davantage de synapses avec les cellules noradrénergiques qu'avec les cellules adrénérgiques (TOMLINSON et COUPLAND, 1990). En dernier lieu ces deux types de cellules chromaffines pourraient être activés par des stimuli neurogéniques

distincts (LAU et coll., 1987 ; VOLLMER et coll., 1992). Nos résultats et l'ensemble des observations rapportées dans la littérature sont en faveur d'une innervation qualitativement et quantitativement différente des deux types d'ilôts de cellules chromaffines. Cette innervation pourrait être également responsable du fait que le NPY est peu, voire pas, exprimé dans les cellules noradrénergiques qui sont en outre fortement TH(+).

***NPY et Met-ENK-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>.***

Nous avons mis en évidence la présence de cellules chromaffines marquées par l'immunsérum anti-Met-ENK-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> mais non par les immunsérums anti-ACTH<sub>18-39</sub>, anti- $\alpha$ MSH, anti-Dyn A et anti-Dyn B. Ces résultats sont en accord avec la présence d'ARNm codant pour la prépro-Enképhaline A (ppENK) dans les cellules chromaffines du rat (BLOCH et coll., 1986). Néanmoins, dans la surrénale adulte, la plupart des cellules chromaffines ne sont pas, sauf exception, enképhalinerigiques. Nos observations sont conformes à la majorité des données immunohistologiques de la littérature selon lesquelles les cellules chromaffines du rat adulte ne sont généralement pas enképhalinerigiques (SCHULTZBERG et coll., 1978 ; BOHN et coll., 1983 ; BLOCH et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Toutefois, selon d'autres auteurs, 15 % (HENION et LANDIS, 1990) voire 20 à 25% (KONDO et coll., 1984 ; KONDO, 1985) des cellules chromaffines présenteraient une immunoréactivité enképhalinerigique. Nos observations, comme celles d'autres auteurs, plaident en faveur d'une plasticité des cellules chromaffines pour l'expression des enképhalines. Nous avons de surcroît pu noter que l'innervation surrénalienne enképhalinerigique paraît être inversement proportionnelle au nombre de cellules chromaffines ENK(+). Ainsi, lorsque les fibres enképhalinerigiques sont abondantes, les rares cellules marquées appartiennent souvent à des ilôts de cellules noradrénergiques qui ne sont pas innervés par des fibres enképhalinerigiques, comme l'a aussi rapporté PELTO-HUIKKO (1989). Ces observations immunohistologiques pourraient être en faveur d'un rôle inhibiteur des enképhalines, libérées par les fibres nerveuses, sur leur propre synthèse par les cellules chromaffines (HENION et LANDIS, 1992). Toutefois, des fibres enképhalinerigiques établissant des synapses avec des cellules chromaffines également enképhalinerigiques ont été signalées par KONDO et coll. (1984). En fait, selon HENION et LANDIS (1992), l'expression des enképhalines dans les cellules chromaffines

pourrait dépendre d'interactions complexes entre des facteurs nerveux préganglionnaires (cholinergiques et enképhalinerigiques) et des facteurs hormonaux tels que les glucocorticoïdes. En accord avec SCHULTZBERG et coll. (1978), nous avons souvent détecté les enképhalines associées aux cellules noradrénergiques ; toutefois, le marquage anti-MERGL peut également être détecté dans des cellules adrénérigiques. Par contre, une localisation préférentielle (PELTO-HUIKKO, 1989) ou exclusive (HENION et LANDIS, 1990) des enképhalines dans les cellules adrénérigiques a été rapportée. La plupart des auteurs s'accordent néanmoins sur le fait que les enképhalines peuvent être exprimées par les deux types de cellules chromaffines (SCHULTZBERG et coll., 1978 ; KOBAYASHI et coll., 1983 ; KONDO et coll., 1984 ; KONDO, 1985 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Nous avons établi l'existence d'une possible colocalisation NPY/ENK dans des cellules adrénérigiques, en accord avec les observations de plusieurs auteurs (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990) mais nous n'avons pas pu établir de corrélation entre la présence de NPY et celle d'enképhalines dans les cellules chromaffines ; bien au contraire, la variation de l'intensité du marquage enképhalinerigique dans les cellules ne s'accompagne pas de variation parallèle du marquage NPYerigique. Cette observation est parfaitement en accord avec celle de HENION et LANDIS (1992) selon laquelle la suppression de l'innervation du splanchnique de la surrénale induit une forte augmentation du nombre de cellules enképhalinerigiques mais n'affecte pas l'expression du NPY. Ces observations sont conformes à celles de FISHER-COLBRIE et coll. (1988) selon lesquelles il existerait bien une régulation différente de ces deux neuropeptides dans les cellules chromaffines.

Les fibres enképhalinerigiques ne sont pas NPYerigiques ; elles constituent une partie de l'innervation préganglionnaire cholinergique (KONDO et coll., 1984 ; KONDO, 1985). Ces fibres n'ont pas été détectées au niveau de la vascularisation et sont rarement observées au niveau des neurones ganglionnaires NPYerigiques ; il n'en est pas de même pour les neurones NPYerigiques de certains ganglions périsurrénaliens. KONDO (1985) et PELTO-HUIKKO (1989) signalent que des neurones ganglionnaires seraient innervés par des fibres enképhalinerigiques. PELTO-HUIKKO (1989) rapporte, sans l'illustrer, que les fibres enképhalinerigiques sont associées aux neurones NPYerigiques, alors que les neurones à VIP sont innervés par des fibres à CGRP et à SP. Ainsi, les deux types de neurones pourraient être activés par des stimuli distincts

(PELTO-HUIKKO, 1989). Nos résultats sont en désaccord avec ces données puisque les fibres marquées par les immunsérums anti-CGRP, anti-SP et anti-GAL sont aussi abondantes, voire plus abondantes, à proximité des neurones NPYergiques, que les fibres enképhalinerigiques. Ces dernières sont beaucoup plus rares qu'au voisinage des neurones NPYergiques de certains ganglions péricurréaliens. Nous n'avons pas observé de fibres enképhalinerigiques dans le cortex surréalien, ce qui est en accord avec les observations de KONDO et coll. (1984).

### ***NPY et neurotensine (NT).***

Dans certaines surréales, de nombreuses cellules chromaffines contiennent du matériel neurotensine-like (NT-like). Les cellules intensément neurotensinerigiques sont parfois dépourvues de marquage anti-NPY et correspondent à des cellules noradrénerigiques. Néanmoins, cette immunoréactivité n'est pas spécifiquement associée à ces cellules, puisque elle est également détectée dans des cellules adrénerigiques dotées de NPY. Pour la NT, il existe d'importantes variations inter-individuelles, parfois très surprenantes, et l'intensité de la réaction immunohistologique est rarement forte, contrairement à celle du NPY. Selon PELTO-HUIKKO (1989), la NT est normalement présente dans seulement 1% environ des cellules chromaffines qui, par ailleurs, sont aussi adrénerigiques. Néanmoins, une dénervation de la surréale induit, 7 jours après l'opération, l'apparition d'une immunoréactivité pour la NT dans 30 à 40% des cellules ; la NT est alors présente dans les deux types de cellules chromaffines (PELTO-HUIKKO, 1989). La présence de ce peptide et de ses ARNm a été établie chez le rat (revue in TISCHLER et coll., 1991). Toutefois, TISCHLER et coll. (1991) n'ont pas détecté de cellules neurotensinerigiques dans la surréale de fœtus à terme (âgés de 21 jours) ou d'adulte ; cependant, *in vitro*, dans les mêmes conditions de fixation, jusqu'à 50% des cellules chromaffines expriment la NT lorsqu'elles sont cultivées en présence de divers facteurs (NGF, Dexaméthasone, Forskoline et Lithium). Ce fort pourcentage de cellules immunoréactives a surpris ces auteurs car il est bien supérieur à celui des cellules noradrénerigiques (20%) auxquelles est habituellement associée la NT dans d'autres espèces (TISCHLER et coll., 1991). Le fait que dans notre étude, le nombre de cellules NT(+) soit bien plus important que celui rapporté dans les études pré-citées peut être lié à l'emploi de fixateurs différents et/ou à des différences de sensibilité des immunsérums anti-NT utilisés. L'existence d'une très faible



immunoréactivité neurotensinergique n'est pas surprenante puisque, sur la base de dosages radioimmunologiques, la concentration de la surrénale en NT (GOEDERT et coll., 1983) serait au moins 10 fois (DE QUIDT et EMSON, 1986), voire 100 fois (ALLEN et coll., 1983), inférieure à celle du NPY. Nos résultats établissent clairement que, dans la médullosurrénale du rat adulte, la NT peut être exprimée, même faiblement, dans les deux types de cellules chromaffines, ce qui confirme, en partie, les observations de PELTO-HUIKKO (1989). L'expression de la NT présente d'étonnantes variations inter-individuelles, qui paraissent indépendantes de celles du NPY puisque ces deux types d'immunoréactivités ont été observés colocalisés (ou non) dans des cellules chromaffines pouvant être soit fortement NPYergiques et faiblement NTergiques, soit l'inverse. Chez le rat, les fibres nerveuses intrasurréaliennes sont NT(-), contrairement à celles du chat, de la souris et du hamster (PELTO-HUIKKO, 1989) ; les neurones ganglionnaires intramédullaires du rat sont également NT(-).

#### ***NPY et CGRP.***

Les cellules chromaffines marquées par l'immunsérum anti-CGRP sont bien plus rares que les cellules NPYergiques ; elles appartiennent aux îlots de cellules chromaffines adrénérgiques au sein desquels une colocalisation CGRP/NPY a pu être établie. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature qui font état de la présence de CGRP dans les cellules adrénérgiques et/ou NPYergiques (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1987 ; LASLOP et coll., 1989 ; PELTO-HUIKKO, 1989).

Par ailleurs, une innervation CGRPergique est détectée dans le cortex surrénalien et la médullosurrénale mais les fibres qui la constituent, étudiées en double marquage, ne sont pas de nature NPYergique ou catécholaminergique. Dans la zone capsulo-glomérulaire, les fibres à CGRP voisinent avec des fibres NPYergiques, mais elles ne sont pas aussi abondantes que ces dernières. Elles sont visibles à proximité des cellules de la zone glomérulée et s'orientent tangentiellement sous la capsule. Dans le cortex sous-jacent, des fibres à CGRP ont une orientation radiale et paraissent se diriger vers la médullosurrénale. Cette distribution de l'innervation à CGRP confirme celle rapportée au cours d'études antérieures (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1987 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Dans la médullosurrénale, de nombreuses fibres CGRPergiques sont présentes dans les troncs nerveux qui pénètrent cette structure, parfois associées à bien d'autres fibres

peptidergiques (MERGL, NPY/sTH, SP, VIP, GAL et CCK<sub>8</sub>). Au sein de la médullosurrénale, les fibres à CGRP se rencontrent aussi bien à proximité des cellules chromaffines que des neurones ganglionnaires. Une association préférentielle de ces fibres à tel ou tel type d'ilôt de cellules chromaffines n'a pas été établie. La présence de fibres à CGRP dans les troncs nerveux pénétrant la capsule d'une part, et l'absence de neurones CGRPergiques intramédullaires d'autre part, constituent des arguments neuroanatomiques en faveur d'une origine extrinsèque de ces fibres. Ces observations sont en accord avec celles de KURAMOTO et coll. (1987) qui attribuent par ailleurs à ces fibres une nature sensitive. Ces auteurs signalent de surcroît une colocalisation CGRP/SP. Il y aurait en fait deux contingents de fibres à CGRP, les unes essentiellement CGRPergiques et les autres à la fois CGRP(+) et SP(+). Selon nos observations, seul ce dernier contingent constituerait des plexus denses dans les îlots noradrénergiques.

#### *NPY et galanine (GAL).*

Nous rapportons la présence de galanine (GAL) dans de très rares cellules chromaffines adrénérgiques, bien moins abondantes que les cellules CGRPergiques. La présence de rares cellules galaninergiques a été aussi rapportée par PELTO-HUIKKO (1989), mais il ne les a pas associées à l'un ou l'autre type de cellules chromaffines. Par contre, ZENTEL et coll. (1990) n'ont pas détecté de cellules chromaffines GAL(+) chez le rat. Par la technique du double marquage, nous avons montré, pour la première fois chez le rat, une colocalisation NPY/GAL dans de rares cellules chromaffines adrénérgiques ; le marquage NPYergique est toujours très faible, voire à la limite de la détectabilité dans certaines cellules. Ces différences d'intensité de marquage pourraient être en relation avec une régulation complexe de l'expression de GAL et de NPY dans les cellules où ces deux peptides sont colocalisés. Une colocalisation NPY/GAL a aussi été rapportée dans la surrénale de cobaye (FRIED et coll., 1991), de chat et de souris (PELTO-HUIKKO, 1989). La présence de GAL est observée aussi bien dans des cellules adrénérgiques que noradrénérgiques chez plusieurs espèces de mammifères autres que le rat (revue in PELTO-HUIKKO, 1989). Des résultats préliminaires obtenus sur des surrénales d'animaux traités par la métopirone, un inhibiteur de la synthèse des glucocorticoïdes, montrent que ce traitement augmente considérablement le nombre de cellules marquées par l'immunsérum anti-GAL. Ces observations plaident en faveur d'une localisation



préférentielle de GAL dans les cellules adrénérgiques qui possèdent des récepteurs aux glucocorticoïdes (CECCATELLI et coll., 1989) et suggèrent aussi que les glucocorticoïdes sont susceptibles de réprimer la synthèse de GAL dans les cellules chromaffines. Cette hypothèse doit être soumise à une vérification expérimentale car il n'existe pas, à notre connaissance, de données de la littérature relatives à ce sujet. Néanmoins, cette observation immunohistologique n'est pas dénuée d'intérêt puisque la galanine contenue dans les cellules chromaffines pourrait être impliquée dans un contrôle paracrine (stimulant) de la stéroïdogénèse du cortex surrénalien (MAZZOCHI et coll., 1992). Le traitement à la métopirone ne semble pas avoir, par contre, modifié significativement l'expression du NPY détecté par immunohistologie ; des expériences sont néanmoins en cours pour confirmer ou non ce premier résultat par les techniques d'hybridation *in situ* et de Northern blot.

Dans la médullosurrénale, des fibres marquées par l'immunsérum anti-GAL ont été observées à proximité de cellules chromaffines, parfois galaninergiques, et plus rarement de neurones ganglionnaires NPYergiques. Les fibres galaninergiques empruntent les mêmes voies que les fibres à SP et à CGRP mais elles sont beaucoup moins abondantes que ces dernières. PELTO-HUIKKO (1989) a montré que toutes ces fibres (CGRP, SP, GAL) sont sensibles à la capsaïcine, une drogue spécifique des neurones sensitifs ; ceci suggère que les fibres galaninergiques constituent une sous-population de fibres sensibles. Des fibres GAL(+) sont aussi détectées dans le cortex surrénalien, non associées en apparence à la vascularisation ; leur distribution rappelle celle des fibres à CGRP, CCK<sub>8</sub> et SP (orientation tangentielle sous la capsule fibreuse et radiale dans le cortex sous-jacent). La distribution des fibres galaninergiques telle que nous l'avons décrite est conforme à celle rapportée dans la littérature (PELTO-HUIKKO, 1989 ; ZENTEL et coll., 1990).

#### ***NPY et substance P (SP).***

Chez le rat mâle, très peu de cellules chromaffines sont marquées par l'anti-substance P (SP) ; elles sont néanmoins présentes dans des îlots adrénérgiques, ce qui est en accord avec les observations antérieures de KONDO (1985) et KURAMOTO et coll. (1985). Une éventuelle colocalisation SP/NPY reste à démontrer ; elle n'a pas pu l'être avec notre anti-NPY de cobaye. Bien que la substance P soit exprimée dans peu de cellules chromaffines, la médulla de certaines surrénales est

dotée d'une riche innervation SPergique. Les fibres à SP, qui sont généralement plus discrètes que celles à CGRP, constitueraient une sous-population de fibres à CGRP (KURAMOTO et coll., 1987). Les fibres SPergiques forment souvent des plexus denses associés aux îlots noradrénergiques ; ce qui suggère une nouvelle fois l'existence d'une innervation différentielle des deux types de cellules chromaffines. Les fibres à SP sont aussi observées dans les troncs nerveux qui pénètrent la capsule fibreuse ; ceci est en accord avec les études antérieures (KONDO, 1985 ; KURAMOTO et coll., 1985). Dans le cortex surrénalien, nous avons détecté de rares fibres SPergiques possédant une distribution similaire à celle des fibres à CGRP, GAL et CCK<sub>8</sub>.

### *NPY et cholécystokinine (CCK).*

Dans notre étude, nous avons mis en évidence la présence de rares fibres marquées par l'immunsérum anti-CCK<sub>8</sub>. Une telle innervation n'a jamais été préalablement rapportée dans la surrénale du rat ni semble-t-il des mammifères. Ces fibres sont présentes aussi bien dans le cortex que dans la médullosurrénale, à proximité de cellules chromaffines et de neurones ganglionnaires NPYergiques. Nous n'avons pas établi si il existe une innervation préférentielle de l'un ou l'autre type de cellules chromaffines ; ces fibres, comme celles à GAL ou à VIP, innervent néanmoins des populations cellulaires restreintes au sein de certains îlots de cellules chromaffines. Paradoxalement, nous n'avons pas mis en évidence de fibres immnoréactives avec un autre immunsérum dirigé contre la forme sulfatée de la CCK<sub>8</sub> (anti-CCK<sub>8</sub>-S). Un "non-recouvrement" des marquages avec les deux anticorps utilisés a été également observé au sein d'une population de cellules NPYergiques du noyau arqué (CIOFI P., communication personnelle). Dans cette structure du système nerveux central, un recouvrement des marquages, pour des fibres et des corps cellulaires, est observé seulement après traitement protéolytique à la trypsine. Aucun des deux immunsérums anti-CCK<sub>8</sub> utilisés ne marque les cellules chromaffines. Dans le cortex, comme dans la médullosurrénale, les fibres marquées par l'anti-CCK<sub>8</sub> ont une distribution similaire à celles des fibres supposées sensibles (CGRP, SP et GAL). L'origine et la nature de ces fibres doivent être déterminées ; une nature sensible est vraisemblable, puisque de nombreux corps cellulaires CCK(+) sont présents dans les ganglions spinaux (JU et coll., 1987). Par ailleurs, l'aspect de ces fibres rappelle celui des fibres CGRPergiques, SPergiques ou galaninergiques.

*NPY et polypeptide intestinal vasoactif (VIP) :*

*\* Neurones intrasurréaliens.*

Nous n'avons pas mis en évidence de VIP ou de ppVIP dans les cellules chromaffines en utilisant deux immunsérums différents dirigés contre des parties distinctes du préproVIP. Nos résultats concordent avec ceux de HÖKFELT et coll. (1981) et de HOLZWARTH (1983, 1984) mais diffèrent de ceux de KONDO et coll., (1986) qui ont signalé la présence de rares cellules chromaffines VIPergiques chez le rat, après un traitement à la colchicine. Nous avons couramment détecté des neurones VIPergiques dans des ganglions péricurréaliens mais pas au sein de la médullosurréale, contrairement à d'autres auteurs (HÖKFELT et coll., 1981 ; HOLZWARTH, 1983 et 1984 ; KONDO et coll., 1986 ; PELTO-HUIKKO, 1989). Les "neurones" à VIP décrits dans la littérature ont une taille qui peut varier de 25 à 50  $\mu\text{m}$  (HÖKFELT et coll., 1981 ; KONDO et coll., 1986) ou de 15 à 25  $\mu\text{m}$  (PELTO-HUIKKO, 1989) ou pourrait être inférieure à celle des cellules chromaffines (HOLZWARTH, 1983, 1984). On peut néanmoins rappeler que de tels "neurones" ont été généralement décrits dans la surrénale suite à des traitements physiques (dénervation) ou chimiques (colchicine) (HÖKFELT et coll., 1981 ; HOLZWARTH, 1983, 1984 ; KONDO et coll., 1986). Les neurones VIPergiques et NPYergiques sont considérés comme différents (SCHALLING et coll., 1988b ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; DAGERLIND et coll., 1990). PELTO-HUIKKO (1989) signale que ces deux types de neurones diffèrent par leur taille et les fibres qui les innervent. Nous avons confirmé en particulier par la technique de double marquage que les neurones NPYergiques ne sont pas VIPergiques chez l'animal normal. AFEWORK et coll. (1992) ont décrit l'existence de deux populations de cellules ganglionnaires marquées spécifiquement par la réaction histochimique ou par un anticorps dirigé contre la NO-synthase. Des neurones ganglionnaires faiblement marqués par la réaction histochimique ou l'immunsérum anti-NO-synthase ne représenteraient que 5% des neurones médullaires (AFEWORK et coll., 1992). Bien que nous n'ayons pas fait d'examen exhaustif des cellules marquées par cette réaction dans la médullosurréale, nous pensons que les 5% de neurones décrits par le groupe d'AFEWORK pourraient correspondre à des neurones VIPergiques. Au cours de notre étude, seuls des neurones extrasurréaliens sont indubitablement VIPergiques. Toutefois, compte-tenu des données de la littérature, une petite population de neurones

pourrait exprimer le VIP en-dessous des seuils de détectabilité de nos immunsérums anti-VIP et anti-ppVIP. Il est généralement admis que les neurones intramédullaires du rat sont d'origine parasympathique (revues in SCHALLING et coll., 1988b ; HENION et LANDIS, 1990). Les neurones VIPergiques sont marqués par une réaction histochimique mettant en évidence des acétylcholinestérases (AChE) (KONDO, 1985) et les neurones NPYergiques ont été révélés par un immunsérum anti-AChE (SCHALLING et coll., 1988b ; DAGERLIND et coll., 1990). DAGERLIND et coll. (1990) suggèrent que les neurones NPYergiques seraient des neurones postganglionnaires sympathiques, puisqu'ils sont marqués par un anti-TH et possèdent les ARNm codant pour la dopamine  $\beta$ -hydroxylase (D $\beta$ H), mais sont dépourvus, comme les neurones VIPergiques, d'ARNm de la choline acétyltransférase (ChAT). L'utilisation d'IgG de mouton anti-TH, purifiées par affinité, nous a permis de confirmer que les neurones NPYergiques sont de nature catécholaminergique. Ces résultats vont à l'encontre d'autres études qui n'ont pas attribué un phénotype catécholaminergique aux neurones ganglionnaires NPYergiques (SCHALLING et coll., 1988b ; PELTO-HUIKKO, 1989 ; HENION et LANDIS, 1990). L'utilisation d'un immunsérum anti-TH commercialisé par l'institut Jacques Boy (Reims), ne nous a pas permis d'attribuer une nature catécholaminergique aux neurones NPYergiques lors de notre D.E.A. De même, OOMORI et coll. (1989) n'ont pas détecté de neurones catécholaminergiques dans la médullosurrénale alors qu'ils en ont détecté quelques années plus tard (OOMORI et coll., 1991). Les observations immunohistologiques contradictoires, concernant la nature catécholaminergique des neurones NPYergiques, pourraient provenir de différences de reconnaissance antigénique, de sensibilité des immunsérums ou des techniques immunohistologiques utilisés. On peut souligner que différentes formes de TH sont présentes dans la surrénale humaine (HAYCOCK, 1991), par suite d'épissage alternatif, et que nos IgG anti-TH révèlent ces quatre formes (HAYCOCK, 1991). A ce propos, nous pouvons envisager que l'intense marquage anti-TH détecté dans les cellules noradrénergiques pourrait résulter d'une forme particulière de TH exprimée dans ces cellules et détectée par nos IgG. La nature catécholaminergique des neurones NPYergiques chez l'adulte (DAGERLIND et coll., 1990) et nos observations chez le fœtus plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle les neurones NPYergiques sont des neurones postganglionnaires sympathiques. L'origine des neurones VIPergiques n'est pas encore

établie mais, selon notre étude ontogénétique, il est fort probable que tous les neurones intrasurrénaux dérivent de la lignée sympathosurrénale. Nous envisageons de traiter des rats à la colchicine pour faciliter la détection immunohistologique des neurones VIPergiques chez l'adulte (KONDO et coll., 1986).

\* *Innervation capsulo-glomérulaire.*

A l'aide de deux techniques immunohistologiques différentes, nous avons établi que la majorité des fibres corticales VIPergiques sont aussi NPYergiques (MAUBERT et coll., 1990). De plus, la technique de double marquage nous a permis d'établir que les fibres VIPergiques ou NPYergiques sont souvent de nature catécholaminergique (MAUBERT et coll., 1991a). Le marquage anti-TH est toujours plus discret que celui des neuropeptides et il n'y a pas toujours recouvrement parfait des signaux immunohistochimiques. Ces différences pourraient résulter du fait que dans un cas, nous détectons une enzyme (TH) intervenant dans la biosynthèse de messagers chimiques alors que dans l'autre cas, nous mettons directement en évidence la présence de messagers chimiques peptidergiques stockés. Par ailleurs, toutes ces molécules antigéniques ne possèdent certainement pas la même localisation subcellulaire et ne sont probablement pas en quantités équivalentes dans ces fibres. Ces résultats suggèrent néanmoins que chez le rat, la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale est abondamment innervée par des fibres où sont colocalisés le NPY, le VIP et la TH. Ceci n'exclut pas le fait que des sous-populations de fibres NPYergiques, VIPergiques ou catécholaminergiques peuvent exister, puisqu'un recouvrement des immunoréactivités n'a pas toujours été observé quelles que soient la technique utilisée et la colocalisation recherchée. Les fibres VIPergiques, NPYergiques et catécholaminergiques observées en microscopie électronique sont associées aux cellules glomérulaires, aux muscles lisses et aux péricytes des vaisseaux ainsi qu'à des capillaires fenêtrés (KURAMOTO et coll., 1986 ; KONDO et coll., 1986 ; OOMORI et coll., 1991). Une colocalisation VIP/NPY/TH n'était pas envisageable il y a encore quelques années ; en effet, on a longtemps considéré que le NPY et la TH caractérisaient les neurones sympathiques, alors que le VIP était plutôt considéré comme un marqueur parasympathique de neurones cholinergiques. Une étude récente de HARDEBO et coll. (1992) suggère que la présence de NPY et de TH ou de D $\beta$ H n'est pas une caractéristique essentielle du système sympathique, car ces immunoréactivités peuvent



aussi être détectées dans le système parasympathique. Des colocalisations VIP/TH (HARDEBO et coll., 1992) ou VIP/NPY (GIBBINS, 1990 ; SUZUKI et coll., 1990 ; KEAST, 1991 ; HARDEBO et coll., 1992) sont bien établies dans des neurones parasympathiques. Chez le rat traité à la colchicine, une colocalisation NPY/VIP/TH peut être envisagée dans certains neurones du ganglion ciliaire puisque 28% et 65% des neurones de ce ganglion sont respectivement NPY/VIP(+) et TH/VIP(+), et la population totale des neurones NPYergique étant de 34% (HARDEBO et coll., 1992). La présence de corps cellulaires à VIP dans des neurones sympathiques de la CPV et des PPV est bien établie (revue in CHEVENDRA et WEAVER, 1992). Chez le rat, une colocalisation VIP/NPY a été mise en évidence dans des fibres sympathiques innervant le rein (KNIGHT et coll., 1989). Des neurones VIPergiques et catécholaminergiques ont été observés dans les neurones du ganglion cervical supérieur après axotomie (HYATT-SACHS et coll., 1993) et au cours de notre étude ontogénétique, dans de rares cellules de la chaîne paravertébrale. Néanmoins, une colocalisation VIP/TH ou VIP/NPY n'a pas été décrite, à notre connaissance, dans des neurones sympathiques chez le rat adulte normal.

La détection de neurones NPYergiques, catécholaminergiques et VIPergiques dans les deux subdivisions du système nerveux périphérique et dans la médullosurrénale, ainsi que l'existence d'une population de fibres à NPY, VIP et TH dans le cortex surrénalien posent le problème complexe de l'origine de cette innervation. Des neurones VIPergiques ont été impliqués dans l'innervation capsulo-glomérulaire (HÖKFELT et coll., 1981 ; HOLZWARTH, 1984 ; HOLZWARTH et coll., 1987). Une telle implication est également envisagée par OOMORI et coll. (1991) pour des neurones intramédullaires catécholaminergiques et par PELTO-HUIKKO (1989) pour ceux de nature NPYergique. Les données de la littérature à ce propos sont fort contradictoires. L'innervation VIPergique capsulo-glomérulaire n'est pas affectée par une dénervation de la surrénale (HÖKFELT et coll., 1981) mais elle l'est, paradoxalement, par une ligature du splanchnique (HOLZWARTH, 1984 ; HOLZWARTH et coll., 1987). L'innervation VIPergique du cortex surrénalien aurait une origine intrinsèque (HÖKFELT et coll., 1981), extrinsèque (KONDO et coll., 1986) ou double (HOLZWARTH, 1984 ; HOLZWARTH et coll., 1987). L'innervation catécholaminergique de la zone capsulo-glomérulaire pourrait également avoir une double origine (OOMORI et coll., 1991) mais serait majoritairement d'origine extrinsèque (VARNDELL et coll.,



1984 ; OOMORI et coll., 1989, 1991). L'innervation NPYergique est considérée comme sympathique, donc à priori d'origine extrinsèque (VARNDELL et coll., 1984 ; KURAMOTO et coll., 1986 ; KONDO, 1985) ; elle serait majoritairement d'origine intrinsèque pour PELTO-HUIKKO (1989). L'effet d'une démyélinisation surrénalienne sur le contenu de la zone capsulo-glomérulaire en NPY et sur l'abondance des fibres NPYergiques révélées en immunohistologie suggère une double origine de cette innervation (extrinsèque et intrinsèque) (cf. chapitre 2). La présence de fibres VIPergiques et NPYergiques dans la zone capsulo-glomérulaire de surrénales démyélinisées depuis plusieurs semaines est compatible avec une origine en partie extrinsèque de ces fibres (résultats inédits). Chez les fœtus, la détection de faisceaux de fibres radiales paraissant provenir d'îlots de neurones intrasurrénaux et semblant se diriger vers la capsule fibreuse serait en faveur d'une origine intrinsèque pour au moins une partie de l'innervation capsulo-glomérulaire. KONDO et coll. (1986) envisagent, quant à eux, que les fibres capsulo-glomérulaires à VIP pourraient provenir de neurones entériques. Une colocalisation NPY/VIP est observée dans de nombreux neurones entériques, mais ces neurones ne seraient pas catécholaminergiques (revue in BAETGE et coll., 1990). Par ailleurs, aucune donnée neuroanatomique ne plaide en faveur de cette hypothèse. Une origine parasympathique paraît peu probable puisqu'il n'existe pas, à notre connaissance, de données de la littérature décrivant des relations neuroanatomiques entre la surrénale et des ganglions parasympathiques. Une origine sympathique paraît plus probable bien que les études neuroanatomiques ne soient pas toutes en accord sur l'origine des fibres sympathiques surrénales. Des résultats préliminaires nous ont permis de détecter des neurones NPY(+) et ppVIP(+) dans un ganglion périssurrénal (MAUBERT et coll., 1990) mais, l'étude de deux ganglions périssurrénaux à l'aide de la technique de double marquage (NPY/VIP ou ppVIP) ne nous a pas permis de confirmer ce résultat. Nous ne disposons pas de données de la littérature relatives à l'existence de corps cellulaires pouvant être NPY/VIP et TH(+) parmi les neurones sympathiques de la chaîne paravertébrale (CPV) ou parmi ceux des plexus prévertébraux. Néanmoins, chez l'adulte, la détection immunohistologique de TH ou de NPY dans des corps cellulaires VIPergiques ou celle de VIP dans des neurones catécholaminergiques et NPYergiques pourrait nécessiter une accumulation préalable des peptides ou de l'enzyme dans les corps

cellulaires. Rappelons à ce propos que la détection de la TH (OOMORI et coll., 1991) dans des neurones intrasurréaliens et celle du VIP (KONDO et coll., 1986) est largement favorisée par un traitement préalable des animaux à la colchicine. L'existence de corps cellulaires NPYergiques, VIPergiques et catécholaminergiques dans des neurones sympathiques doit être recherchée. A la lumière de ce qui a été proposé pour l'innervation catécholaminergique surrénalienne (OOMORI et coll., 1989), les fibres NPY/VIP/TH pourraient pénétrer la glande surrénale, associées à des faisceaux de fibres ou bien isolées, en suivant le trajet des vaisseaux ou celui du nerf splanchnique et/ou de ses ramifications. Nos résultats seraient plutôt en faveur de fibres isolées car, malgré de nombreuses observations, nous n'avons jamais détecté la présence d'un nombre "suffisant" de fibres VIPergiques pour assurer que l'innervation corticale à VIP/NPY et TH emprunte le trajet des troncs nerveux et/ou du nerf splanchnique. En effet, contrairement aux fibres NPYergiques et catécholaminergiques, les fibres VIPergiques n'ont été que très rarement observées dans ces structures. Ces faisceaux sont généralement retrouvés au sein de la médullosurrénale, où des fibres NPYergiques (KURAMOTO et coll., 1986), VIPergiques (KONDO, 1985 ; KONDO et coll., 1986) et catécholaminergiques (OOMORI et coll., 1991) peuvent établir des synapses avec des cellules chromaffines. Les rares fibres VIPergiques détectées dans ces troncs nerveux pourraient être au moins en partie, à l'origine des fibres intramédullaires dans lesquelles une colocalisation VIP/NPY n'a pas été révélée ; l'éventualité que des fibres VIP(+)/NPY(-) puissent provenir de neurones intramédullaires (KONDO et coll., 1986) ne peut pas être exclue. De rares fibres VIP/NPY et VIP/TH ont été détectées dans la capsule fibreuse ; elles pourraient néanmoins constituer un plexus parfois très dense dans la zone capsulo-glomérulaire. Une contribution, plus discrète, de fibres VIPergiques ou NPYergiques d'origine intrinsèque ne peut cependant pas être exclue. La connaissance précise de l'innervation capsulo-glomérulaire nécessite des études complémentaires. Nous envisageons la réalisation de traitements physiques (dénervation, démyélinisations à long terme) ou chimiques (colchicine, 6-OH dopamine...) puis la détection simultanée de la TH, du VIP et du NPY pour établir précisément l'origine des fibres majeures et/ou mineures de la zone capsulo-glomérulaire. Dans deux surrénales humaine, nos résultats préliminaires font état d'une colocalisation NPY/VIP également dans des fibres de la zone capsulo-glomérulaire.

### *NPY et somatostatine (SRIF).*

Les études immunohistologiques ne nous ont pas permis de mettre en évidence la présence de SRIF dans les cellules médullosurréaliennes ou corticales du rat adulte. Dans la mesure où, par hybridation *in situ*, des ARNm codant pour la somatostatine n'ont pas été révélés dans les cellules de la médullosurrénale ou de la zone glomérulée (MOREL et coll., 1990), il est très vraisemblable que la somatostatine ne soit pas synthétisée dans la surrénale. Néanmoins, de la somatostatine a été dosée par dosage radioimmunologique dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale de rat (AGUILERA et coll., 1981). Par ailleurs, MOREL et coll. (1990) signalent la présence de matériel immunoréactif SRIF-like à l'échelle ultrastructurale dans les cellules du cortex surrénalien (principalement dans celles de la zone glomérulée et plus discrètement dans celles des zones corticales sous-jacentes) ainsi que dans les cellules médullaires adrénnergiques et noradrénnergiques. Des récepteurs à la somatostatine existent dans la zone glomérulée et dans la médullosurrénale mais non dans la zone fasciculo-réticulée (MAURER et REUBI, 1986 a, b ; MOREL et coll., 1990). Nos propres observations, réalisées en collaboration avec A. SLAMA et J. EPELBAUM (Unité INSERM U 159, Paris), confirment la présence de nombreux sites de liaison de la somatostatine dans la zone glomérulée et dans la médullosurrénale et leur absence dans la zone fasciculo-réticulée. Ces observations suggèrent donc que la zone glomérulée et la médullosurrénale constituent des tissus-cible pour la somatostatine, vraisemblablement d'origine extrasurrénalienne.

### *Système corticotrope intrasurrénalien.*

Nous n'avons pas détecté, par immunohistologie, de CRF dans la glande surrénale de rat. Ce résultat négatif a été obtenu avec un immunsérum dirigé contre le CRF ovin, capable néanmoins de marquer spécifiquement dans l'hypothalamus de rat les neurones à CRF du noyau paraventriculaire. Chez le rat, d'autres systèmes à CRF ne sont pas reconnus par cet immunsérum (CIOFI P., communication personnelle). La médullosurrénale de rat contient du matériel "CRF-like" (HASHIMOTO et coll., 1984) dans les cellules chromaffines (LIM, 1985) qui possèdent également des sites de liaison de haute affinité pour le CRF (DAVE et coll., 1985 ; UDELSMAN et coll., 1986 ; AGUILERA et coll., 1987). Du matériel CRF-like est sécrété en réponse à une hémorragie ou à une stimulation du splanchnique respectivement chez le chien (BRUHN et

coll., 1987) et le veau (EDWARDS et JONES, 1988). De plus, une innervation CRF(+) et des cellules immunoréactives ont été observées dans le cortex surrénalien du mouton par RUNDLE et coll. (1988). Des études complémentaires à l'aide d'anticorps anti-CRF de rat, devraient permettre de confirmer, ou pas, l'absence de CRF surrénalien chez le rat. Nous avons testé trois immunosérums qui reconnaissent des dérivés de la POMC (ACTH<sub>1-24</sub>, ACTH<sub>18-39</sub> et  $\alpha$ MSH). Ces immunosérums qui marquent les cellules des lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse de rat (un marquage intense n'est observé qu'avec les anti-ACTH dans les cellules antéhypophysaires), ne marquent pas les cellules chromaffines. Nous ne sommes donc pas en mesure d'étayer, par l'immunohistologie, l'hypothèse d'une production intrasurrénalienne d'ACTH stimuable par le CRF (ANDREIS et coll., 1991, 1992). Chez le rat, l'existence d'un système corticotrope endogène à CRF/ACTH (CHARLTON, 1990) ne peut donc pas être tenue pour acquise à la lumière de nos observations. Par contre, il existe de très sérieux arguments en faveur de l'existence d'un système rénine/angiotensine intrasurrénalien particulièrement au niveau de la zone glomérulée (GUPTA et coll., 1992 ; MULROW, 1992) ; ce système paraît impliqué dans le contrôle local de la production d'aldostérone.

#### *Arginine vasopressine (AVP) et Ocytocine (OT).*

Nous n'avons pas observé d'immunoréactivité spécifique relative à l'AVP, à l'OT ou à leurs neurophysines associées dans les cellules chromaffines du rat Wistar. Néanmoins ces neuropeptides, et plus particulièrement la vasopressine, ont été identifiés dans la surrénale humaine (NICHOLSON et coll., 1984) et dans celle du rat de souche Long Evans ou de la souche Brattleboro, atteinte de diabète insipide à l'état homozygote en raison de l'absence de vasopressine hypophysaire (NUSSEY et coll., 1984).

#### *Réaction histochimique de deshydrogénation : activité NADPH-diaphorase.*

Le produit de la réaction histoenzymatique mettant en évidence une activité NADPH-diaphorase a été observé dans des fibres nerveuses (médullaires et corticales) et dans des cellules médullosurréaliennes. Les neurones ganglionnaires et les fibres nerveuses sont également révélés par des immunosérums dirigés contre la NO-synthase, l'enzyme

de synthèse des monoxydes d'azote ou oxydes nitriques (NO) (BREDT et coll., 1990 ; AFEWORK et coll., 1992). Dans les surrénales de rats comme dans celles de l'homme, nous avons remarqué l'apparition rapide et intense du produit de la réaction histoenzymatique dans les cellules de la corticosurrénale. Le marquage des fibres nerveuses qui apparaît après celui des cellules corticales, limite l'utilisation de cette technique pour l'étude de l'innervation surrénalienne, au moins dans le cortex surrénalien. Nous avons observé que le marquage était toujours plus intense dans les zones fasciculée et réticulée que dans la zone glomérulée. AFEWORK et coll. (1992) ont émis l'hypothèse que le marquage des cellules corticales pourrait être en relation avec la stéroïdogénèse, ou avec la présence d'une isoforme de la NO-synthase qui ne serait pas reconnue par les anticorps utilisés dans leur étude ou dans celle de BREDT et coll. (1990). Nous avons testé cette hypothèse et recherché si cette activité NADPH-diaphorase pouvait être corrélée avec l'apparition des capacités stéroïdogéniques dans le cortex surrénalien. Les différences dans l'intensité des marquages dans la zone glomérulée et dans les zones sous-jacentes suggèrent une utilisation différentielle du NADPH par les différentes zones corticales. Ces différences, qui sont indépendantes de la fixation (elles sont visibles sur des surrénales post-fixées ou non), n'ont pas été rapportées par AFEWORK et coll. (1992). Des différences dans l'équipement enzymatique (la présence ou l'absence de certains cytochromes) pourraient être responsables des différences de marquage. Dans la mesure où seules les zones fasciculées et réticulées possèdent un marquage intense, on peut considérer que ce marquage pourrait résulter, au moins partiellement, de réactions enzymatiques impliquant soit le cytochrome P 450 17 $\alpha$ , soit le P450 11 $\beta$ , qui seraient spécifiques de ces deux zones (revue in HANUKOGLU, 1992). Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure une autre possibilité, à savoir que l'isoforme de la NO-synthase soit moins représentée dans la zone glomérulée. Des expériences utilisant la N-monométhyl-arginine, un inhibiteur des isoformes de NO-synthases (LACAZE-MASMONTEIL, 1992), sont envisagées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Il faut noter que la réaction histochimique marque aussi quelques cellules corticales intramédullaires, également décrites par AFEWORK et coll. (1992) ; ceci témoigne d'un certain enchevêtrement du tissu stéroïdien et du tissu chromaffine. Aucune corrélation évidente n'a été observée entre le marquage de ces cellules et/ou la présence des marquages anti-NPY et anti-PNMT dans les cellules chromaffines situées à leur

proximité. Chez le fœtus, cette réaction peut être détectée dès le 15<sup>ème</sup> jour de gestation. A ce stade, on observe un faible marquage dans les cellules corticales qui possèdent, pour certaines d'entre elles, de rares gouttelettes lipidiques. Un jour plus tard, le marquage s'intensifie et devient hétérogène ; certaines cellules apparaissent plus fortement marquées que d'autres. Entre E 16 et E 18, le nombre de cellules fortement marquées augmente et le marquage s'uniformise dans toutes les cellules corticales. Très tôt, la zone glomérulée paraît présenter un marquage plus faible que les zones sous-jacentes, suggérant l'acquisition précoce des caractéristiques des cellules de l'adulte. A ce propos, les cellules de la zone glomérulée se différencient précocement car nous avons détecté des sites de liaison pour la somatostatine entre E 16 et E 18. Dans la zone glomérulée, la détection de ces sites de liaison pour la somatostatine chez le fœtus et l'adulte d'une part, et la présence de contacts synaptiques (KONDO et coll., 1986 ; OOMORI et coll., 1991) avec les cellules corticales d'autre part, ne constituent pas des arguments en faveur de la théorie de la différenciation centripète (McNICOL et DUFFY, 1987). L'apparition du produit de la réaction histochimique dans les cellules corticales est temporellement corrélée avec la détection par hybridation *in situ* et immunohistochimie de la 3  $\beta$  hydroxystéroïde/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomérase (3 $\beta$ -HSD) (DUPONT et coll., 1991) et la détection de microquantités de corticostérone (revue in ANDERSON et coll., 1991). De plus, la forte augmentation de l'intensité du marquage est synchronisée avec l'augmentation de la synthèse de corticostérone dans la glande surrénale fœtale (KAMOUN et coll., 1970 ; SEIDL et UNSICKER, 1989). Dans les cellules du cortex surrénalien, l'apparition du produit de la réaction histoenzymatique mettant en évidence une activité NADPH-diaphorase paraît donc parfaitement corrélée avec l'acquisition des capacités stéroïdogéniques du cortex au cours du développement embryonnaire. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus chez l'homme suggèrent que cette réaction histoenzymatique pourrait permettre le marquage de tumeurs intra- et péricorticales sécrétant des stéroïdes. Concernant l'ontogenèse corticale, nous avons observé que, dès la naissance, des fibres capsulo-glomérulaires à NPY/TH, à CGRP et, plus rarement, à VIP/TH sont présentes au niveau de la zone glomérulée. Les cellules et/ou la vascularisation de cette zone pourrai(en)t recevoir des stimulations nécessaires à l'activation et/ou à



la mise en place du contrôle neuroendocrinien de l'équilibre hydrominéral et/ou de la vasomotricité corticale chez le nouveau-né.

**Distribution de messagers chimiques dans la  
surrénale au cours du développement embryonnaire.  
Caractérisation des dérivés Sympathosurrénaliens**

Au cours du développement embryonnaire, la caractérisation des dérivés sympathosurrénaliens (neurones sympathiques, cellules SIF, paraganglions et cellules chromaffines) peut être réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre le neuropeptide Y (NPY), la somatostatine (SRIF) et la tyrosine hydroxylase (TH).

***Expression du neuropeptide Y (NPY).***

Les cellules précurseurs de la lignée sympathosurrénalienne (LSS) migrent et colonisent la chaîne paravertébrale (CPV) autour du douzième jour de gestation ; ceci est en accord avec la plupart des données antérieures (DE CHAMPLAIN et coll., 1970 ; COCHARD et coll., 1978, 1979 ; TEITELMAN et coll., 1979 ; AHONEN et coll., 1987 ; SOINILA et coll., 1988 ; JONAKAIT et coll., 1989 ; ANDERSON et coll., 1991). Dans la région thoraco-lombaire, à E 12,5, la quasi totalité des cellules, fortement TH(+), présente un marquage anti-C-PON diffus et de faible intensité, alors que seules de rares cellules sont marquées par notre anti-NPY (12) (MAUBERT et coll., 1991b ; 1992b). A des stades ultérieurs (E 14,5/15,5), la majorité des sympathoblastes est intensément marquée par l'anti-NPY ou l'anti-C-PON. Selon, RAO et LANDIS (1993), le NPY apparaîtrait un jour après la TH et serait détecté dans la plupart sinon dans tous les neurones du ganglion cervical supérieur (GCS) au moment où la neurogénèse est la plus intense c.a.d. au voisinage de E 14,5/15,5 (LANDIS et DAMBOISSE, 1986). L'existence précoce de NPY dans la majorité des cellules de la CPV est en accord avec nos observations, mais, selon nous, un délai inférieur à 24 heures permet la détection de NPY dans les (ou des) cellules de la CPV. Des divergences similaires quant à la date d'apparition du NPY ont été aussi rapportées pour le système nerveux entérique (SNE) à propos des cellules transitoirement catécholaminergiques (cellules TC) (BAETGE et coll., 1990 ; CARNAHAN et coll., 1991). BAETGE et coll. (1990) rapportent que, dès E 11, toutes les cellules TC sont NPYergiques alors que CARNAHAN et coll. (1991) quant à eux, n'en décrivent que de rares à ce stade. Nous avons fait des observations similaires avec nos immunsérums anti-NPY (12) et anti-C-PON dans ces neurones TC et dans

ceux de la CPV. Ces différences nous ont amené à considérer qu'une structure était vraiment NPYergique que lorsque les deux marquages (anti-NPY et anti-C-PON) pouvaient y être clairement détectés. L'aspect des sympathoblastes "dépourvus de NPY" chez la grenouille taureau (STOFER et HORN, 1990) rappelle fortement le marquage initial que nous observons avec l'anti-C-PON ; ceci témoigne de la difficulté que l'on peut éprouver pour attribuer très précocement une nature NPYergique à des cellules qui, ultérieurement, présenteront un marquage beaucoup plus intense et caractéristique. Chez le rat, l'ensemble de ces observations suggère que, dès leur apparition, des cellules précurseurs de la CPV ou du SNE ont la capacité de synthétiser du préproNPY. Un clivage de ce précurseur et/ou une augmentation de sa synthèse permettrait la détection de NPY à l'aide d'anticorps moins sensibles ou ne reconnaissant le NPY qu'après sa genèse par suite du clivage protéolytique de son précurseur. Compte-tenu de nos résultats, de ceux de CARNAHAN et coll. (1991) pour le SNE et de ceux de RAO et LANDIS (1993) pour les cellules paravertébrales, l'expression du NPY par les cellules précurseurs ne serait pas suffisante pour permettre sa détection immunohistochimique à l'aide de tous les anticorps dirigés contre ce peptide ou une partie de son précurseur. Les techniques de biologie moléculaire devraient permettre d'établir indubitablement si l'expression du gène du NPY est temporellement corrélée avec l'apparition des cellules sympathoprécursors. Aucun des autres immunsérums dirigés contre des neuropeptides pouvant être exprimés dans des neurones sympathiques du rat adulte tels que enképhalines, somatostatine, VIP et SP (ARIANO et KENNY, 1985 ; CHEVENDRA et WEAVER, 1992 ; RAO et LANDIS, 1993), CGRP (revues in HÖKFELT et coll., 1992) ou galanine (LONGLEY et WEAVER, 1993 ; RAO et LANDIS, 1993) ne marque les cellules précurseurs de la LSS. Il est donc clair que le NPY, contrairement aux autres neuropeptides testés, apparaît dans des cellules précurseurs catécholaminergiques quelques heures seulement après leur identification première (marquage anti-TH).

La détection du marquage NPYergique paraît corrélée avec deux événements importants ; d'une part, la transition phénotypique décrite *in vivo* par ANDERSON et coll. (1991) et d'autre part la diminution de l'intensité du marquage anti-TH que nous avons observée dans les sympathoblastes. ANDERSON et coll. (1991) rapportent que, dès E 12,5, certaines cellules précurseurs passeraient d'un phénotype SA1(+)/B2(-) à un phénotype SA1(-)/B2(+) (cf. Introduction A-4°). Cette transition

phénotypique SA1->B2, a également été décrite dans les cellules précurseurs du SNE par CARNAHAN et coll. (1991). Selon ces auteurs, le marquage NPYergique surviendrait dans des cellules qui perdent le marquage SA1(+) et le NPY pourrait être "up-régulé" par la disparition du SA1 dans les cellules TC. CARNAHAN et PATTERSON (1991a) suggèrent que les épitopes reconnus par leurs anticorps anti-SA pourraient jouer un rôle dans la synthèse, la compartimentation, la dégradation ou la libération des catécholamines. En règle générale, nous n'avons pas détecté de NPY dans les structures extrasurréaliennes fortement TH(+) et marquées par l'anti SA1 (ANDERSON et coll., 1991). Par ailleurs, rappelons que chez l'adulte, le NPY est principalement détecté dans les cellules chromaffines adrénergiques qui sont généralement plus faiblement TH(+) que les cellules noradrénergiques. Néanmoins, chez l'adulte, les cellules chromaffines sont fortement TH(+) et SA1(+) contrairement aux neurones sympathiques (ANDERSON et coll., 1991). Ces dernières observations suggèrent que le SA1 et TH ne sont pas toujours étroitement liés au NPY. Au cours de la différenciation des neurones sympathiques de la grenouille taureau (STOFER et HORN, 1990) et des sympathoblastes du poulet (GARCIA-ARRARAS et coll., 1992), le NPY apparait plus tardivement que chez le rat. Dans des dérivés sympathosurréaliens de ces espèces, une relation inverse entre l'expression de TH et celle de NPY a également été décrite (STOFER et HORN, 1990 ; GARCIA-ARRARAS et coll., 1992). Chez le rat, l'expression du NPY semble aller de pair avec la détection d'un faible marquage anti-TH dans les neurones de la CPV, des plexus prévertébraux (PPV) et dans ceux de la surrénale ; réciproquement, les structures extrasurréaliennes fortement TH(+) sont généralement dépourvues de NPY. Ces dernières sont marquées par l'anti-SA1 (ANDERSON et coll., 1991). Ces observations suggèrent donc que la diminution du marquage anti-TH dans les neurones et/ou la disparition du SA1 (ANDERSON et coll., 1991) induirai(en)t une augmentation du marquage anti-NPY dans les neurones sympathiques. La majorité des cellules extrasurréaliennes SA1 (+) (ANDERSON et coll., 1991) et fortement TH(+) (paraganglions, cellules SIF), n'exprimerait pas le NPY. A notre connaissance, il n'existe pas de donnée de la littérature confirmant l'existence d'une régulation inverse de ces phénotypes (TH et/ou SA1 d'une part et NPY d'autre part) dans les neurones sympathiques de l'adulte ou du fœtus.

***Expression de sérotonine (5-HT).***



Chez le rat, un marquage anti-sérotonine est absent des cellules sympathoprécurseurs mais il apparaît tardivement dans des cellules bien différenciées de la LSS et dans des mastocytes (MAUBERT et coll., 1992b). Par contre, d'après SOINILA et coll. (1988), les cellules sympathoprécurseurs fortement TH(+) seraient aussi sérotoninergiques et la disparition de ce marquage irait de pair avec la diminution du marquage pour la TH. Dans la surrenale, les îlots de cellules noradrénergiques (NA) décrits par ces auteurs seraient faiblement TH(+) mais 5-HT(-) et bien entendu PNMT(-) ; ces cellules correspondraient en fait à celles que nous avons clairement identifiées en tant que neurones intrasurrénaliens. La distribution du marquage anti-5-HT que nous observons dans les surrénales de nouveau-nés ou d'adultes est en accord avec celle rapportée par d'autres auteurs (VERHOFSTAD et JONSSON, 1983 ; HOLZWARTH et SAWETAWAN, 1985). L'immunsérum anti-5-HT, utilisé par SOINILA et coll. (1988), pourrait reconnaître un métabolite catécholaminergique qui serait abondamment synthétisé dans toutes les cellules fortement TH(+). Les cellules TC, initialement dépourvues de sérotonine (BAETGE et coll., 1990), pourraient dériver de la LSS car elles partagent des caractéristiques communes avec les précurseurs sympathosurrénaliens typiques (CARNAHAN et coll., 1991). A ce propos, nos résultats suggèrent que la détection de NPY pourrait être une caractéristique commune supplémentaire. L'hypothèse que les cellules du SNE et celles de la LSS proviennent d'un même précurseur (CARNAHAN et coll., 1991) est en cours d'étude (GERSHON et coll., 1993) ; si elle se vérifie, elle serait en faveur de l'existence de réactions croisées dans l'étude de SOINILA et coll. (1988). La confirmation que la sérotonine n'est pas détectée dans les précurseurs sympathosurrénaliens doit être établie avec la recherche de la tryptophane hydroxylase et/ou d'un mécanisme de capture spécifique pour ce neurotransmetteur.

### *Expression de somatostatine (SRIF).*

Les cellules sympathoprécurseurs de la CPV sont initialement dépourvues de marquage anti-somatostatine (SRIF), néanmoins ce marquage apparaît très peu de temps après le marquage anti-NPY. KATZ et coll. (1992) ont étudié la distribution d'un marquage anti-SRIF dans les neurones sympathiques du ganglion cervical supérieur (GCS) du fœtus de rat (12<sup>ème</sup> et 16<sup>ème</sup> jours), du nouveau-né et de l'adulte. Ils n'ont pas décrit de fibres somatostatinergergiques à E 12,5 mais signalent

occasionnellement un marquage discret sous forme de ponctuations. Dans notre étude, ces ponctuations sont indubitablement associées à des fibres nerveuses somatostatinerigiques, dont l'apparition devance d'une journée celle des fibres préganglionnaires cholinergiques rapportée par PHELPS et coll. (1991). L'origine de ces fibres somatostatinerigiques reste à établir mais nous pouvons envisager qu'elles correspondent à des fibres préganglionnaires et/ou sensibles. En effet, des corps cellulaires somatostatinerigiques sont présents à ce stade dans les ganglions spinaux et la corne ventrale de la moelle (HO, 1988 ; MAUBERT et coll., 1992a). La somatostatine et/ou d'autres molécules présentes dans ces fibres pourrai(en)t être responsable(s) des modifications phénotypiques que nous avons observées ou qui ont été rapportées (ANDERSON et coll., 1991) dans la CPV dès ce stade ou peu de temps après ce stade (marquage NPYergique et somatostatinerigique, diminution de l'intensité du marquage TH et transition SA1->B2). En faveur de cette hypothèse, signalons que c'est autour de E 12/13, que nous avons détecté des sites de liaison pour un analogue marqué de la somatostatine au niveau de cellules qui, compte tenu de leur localisation, correspondraient à des sympathoblastes (MAUBERT et coll., 1993c). Dans le SNE, nous avons aussi détecté un intense marquage anti-SRIF dans les fibres vagues, aux stades (E 12-13) où les cellules TC perdent, d'après plusieurs auteurs, leur phénotype catécholaminergique (COCHARD et coll., 1978, 1979 ; JONAKAIT et coll., 1979 ; BAETGE et coll., 1990 ; CARNAHAN et coll., 1991). Des facteurs environnementaux sont supposés être impliqués dans la perte de ce phénotype (BAETGE et coll., 1990 ; CARNAHAN et coll., 1991 ; GERSHON et coll., 1993) ; une intervention de la somatostatine n'a encore jamais été envisagée mais elle pourrait l'être à la lumière de nos observations. A ces stades, sur la course du nerf vague, de rares cellules TC paraissent somatostatinerigiques. Plus tardivement, les fibres du vague et les cellules entériques examinées sont toujours SRIF(-). Ces dernières pouvaient néanmoins exprimer d'autres immunoréactivités (NPY, VIP, MERGL...). A notre connaissance, des cellules enképhalinerigiques n'ont jamais été décrites dans le SNE du fœtus ; des cellules de ce type ont été détectées autour de E 16,5 dans la paroi stomacale. Un marquage anti-SRIF pourrait être exprimée dans de rares cellules TC situées sur le trajet du nerf vague. Nos observations diffèrent de celles de KATZ et coll. (1992) pour qui les cellules précurseurs du SNE n'exprimeraient pas la somatostatine. Il faut noter que ces auteurs ne signalent pas les fibres somatostatinerigiques du nerf



vague. On ne peut pas écarter l'éventualité que les cellules que nous avons qualifiées de somatostatinerigiques ne seraient en fait que des cellules densément innervées par des fibres de ce type, donnant ainsi l'impression d'un marquage cellulaire. On peut rappeler qu'à ces stades, les cellules possèdent un gros noyau (toujours dépourvu d'immunoréactivité) et un cytoplasme très réduit.

Dans la CPV, c'est au voisinage de E 13,5, soit peu de temps après la détection des fibres somatostatinerigiques et des cellules NPYergiques, qu'apparaissent les premières cellules fortement marquées par l'immunsérum anti-SRIF. Dans la région du tronc, quelque soit le stade de la gestation, un marquage anti-SRIF a été détecté dans les dérivés sympathosurréaliens faiblement TH(+) mais jamais dans les cellules fortement catécholaminergiques. Dans les dérivés sympathosurréaliens typiques (neurones sympathiques, cellules chromaffines, cellules SIF et paraganglions), la distribution de ce marquage somatostatinergique est similaire à celle décrite pour l'immunomarquage anti-B2 (ANDERSON et coll., 1991). Chez le fœtus et le nouveau-né, aucune des structures SA1(+)/B2(-), décrites par ANDERSON et coll. (1991), n'est marquée par notre anti-SRIF. Le phénotype B2 caractérise la différenciation en neurones des dérivés sympathosurréaliens (ANDERSON et coll., 1991 ; CARNAHAN et PATTERSON, 1991a et b ; CARNAHAN et coll., 1991). Dans la CPV, l'apparition de ce phénotype pourrait dépendre de l'axe rostro-caudal, contrairement à la disparition du marquage anti-SA1 (ANDERSON et coll., 1991). Ces derniers résultats ont été obtenus en comparant la distribution des marquages anti-SA1 et anti-B2 à deux niveaux différents de la CPV dans la région du tronc d'un fœtus de 13,5 jours. Ces résultats n'ont pas été discutés mais ils suggèrent que la transition SA1->B2, décrite *in vivo* par ANDERSON et coll. (1991), pourrait relever de mécanismes au moins en partie indépendants. D'après nos propres observations, l'apparition du marquage somatostatinerigique est manifestement tributaire de l'organisation rostro-caudale de la CPV mais cela semble moins évident pour celle du NPY. Par ailleurs, chez la grenouille taureau, l'apparition du marquage anti-NPY serait indépendante de l'organisation rostro-caudale de la CPV (STOFER et HORN, 1990). L'ensemble de ces observations renforce les liens entre la disparition du marquage anti-SA1 et l'apparition du marquage anti-NPY d'une part et entre les marquages anti-B2 et anti-SRIF d'autre part. Le nombre de sympathoblastes marqués par l'anti-SRIF augmente considérablement entre E 13,5 et E 16,5 puis diminue fortement à partir

du 17<sup>ème</sup> jour de gestation, à tel point que chez le nouveau-né, rares sont les cellules marquées. Ces observations suggèrent donc que la somatostatine est transitoirement exprimée dans les neurones sympathiques de la chaîne paravertébrale. A la naissance, les neurones NPYergiques sont toujours abondants ; ils constituent chez l'adulte la majorité des neurones sympathiques alors que de rares neurones somatostatinerigiques seront présents dans la CPV (CHEVENDRA et WEAVER, 1992). Ces observations confirment l'expression transitoire de somatostatine dans les neurones sympathiques de la chaîne paravertébrale. Il en est de même pour les neurones intrasurréaliens et pour de nombreux neurones des plexus prévertébraux (PPV). Une expression transitoire de somatostatine a aussi été signalée par KATZ et coll. (1992) pour les neurones sympathiques du ganglion cervical supérieur. Chez le rat, les neurones de la CPV, des PPV et de la surrénale sont, dans leur majorité, transitoirement somatostatinerigiques ; néanmoins nous n'avons pas pu déterminer si tous les neurones sympathiques expriment transitoirement ce marquage au cours du développement. KATZ et coll. (1992) soulèvent le même problème et suggèrent, par analogie avec les neurones transitoirement catécholaminergiques de divers ganglions sensitifs (nouveaux, pétreux et géniculés), que les neurones transitoirement somatostatinerigiques du fœtus pourraient être différents de ceux détectés chez l'adulte.

Chez le rat, le phénotype B2 ne serait plus détecté à la naissance dans les neurones sympathiques (CARNAHAN et PATTERSON, 1991a et b ; CARNAHAN et coll., 1991). Bien que, *in vivo*, l'expression dynamique de ce marquage n'ait pas été suivie et décrite avec précision (ANDERSON et coll., 1991), l'apparition puis la disparition plus ou moins synchronisées de ces deux types d'immunoréactivités peut renforcer l'hypothèse d'un lien avec un (ou des) processus neurogénétique(s) commun(s) dans les neurones sympathiques. Contrairement au B2 (ANDERSON et coll., 1991 ; CARNAHAN et PATTERSON, 1991a et b ; ANDERSON 1993a), la somatostatine n'est pas un marqueur spécifique des dérivés sympathosurréaliens puisque, chez le rat, elle est exprimée transitoirement dans beaucoup d'autres neurones au cours de la neurogenèse (SHIOSAKA et coll., 1981, 1982 ; FERRIERO et SAGAR, 1987 ; CAVANAGH et PARNAVELAS, 1988 ; HO, 1988 ; FELDMAN et coll., 1990 ; FERRIERO et coll., 1990 ; COULOMBE et NISHI, 1991 ; KATZ et coll., 1992 ; MAUBERT et coll., 1992a et c ; SHIOSAKA, 1992). Néanmoins, le marquage anti-SRIF, comme le marquage anti-B2 (ANDERSON et coll.,



1991 ; CARNAHAN et PATTERSON, 1991a et b ; ANDERSON 1993a), caractérise une différenciation en neurones dans la quasi totalité des dérivés sympathosurrénaux typiques. Dans tous les cas, la détection du marquage anti-SRIF est corrélée avec une (ou des) période(s) critique(s) du développement des neurones. A titre d'exemple, on peut rappeler que, dans les neurones sensitifs, comme dans les neurones sympathiques, la somatostatine est détectée approximativement à l'apogée de la neurogenèse et/ou quand les neurones pourraient établir des connections avec leur(s) cible(s) (revues in KATZ et coll., 1992 ; MAUBERT et coll., 1992a). Par analogie avec les phénomènes rencontrés dans le tube neural (TN), il est fort probable que la somatostatine ne soit détectée que dans des neurones en phase postmitotique. En effet, la somatostatine apparaît dans les neurones de la corne ventrale du TN après qu'ils aient quitté la zone épendymaire ou proliférative (HO, 1988 ; MAUBERT et coll., 1992a). Dans la CPV, il pourrait en être de même. Ainsi, les dernières divisions des sympathoblastes de la CPV surviendraient entre E 13,5 et E 15,5 bien que, pour de rares neurones, ces divisions pourraient se poursuivre jusque dans la période périnatale (HENDRY, 1977 ; LANDIS et DAMBROISE, 1986). S'il en est bien ainsi, puisque la majorité des neurones sympathiques est somatostinergique autour de E 16,5, ces neurones doivent être pour la plupart en phase postmitotique. L'expression de somatostatine pourrait donc être en relation avec la maturation du neurone mais également avec l'établissement de connections. A ce propos, dans un travail en collaboration avec A. SLAMA et J. EPELBAUM (Unité INSERM U 159, Paris), nous avons recherché la présence de sites de liaison (SL) pour la somatostatine au cours du développement embryonnaire précoce (MAUBERT et coll., 1992c ; 1993c). A ce jour, nous ne disposons pas encore d'un nombre suffisant de données concernant la présence de tels sites dans la LSS mais, dès à présent nous pouvons affirmer que, très tôt au cours du développement, des SL sont transitoirement exprimés dans le tube neural, les ganglions sensitifs et semble-t-il dans la CPV. Par ailleurs, à partir d'ARNm extraits de fragments tissulaires contenant le TN et les neurones sensitifs d'embryons de 13 jours, nous avons mis en évidence la présence potentielle d'au moins cinq sous-types de récepteurs à la somatostatine, de plus d'après une étude pharmacologique il apparaît qu'un sous-type de récepteurs est majoritairement exprimé de manière transitoire dans ces structures embryonnaires (MAUBERT et coll., 1993c). Ces observations plaident en

faveur d'un rôle de la somatostatine dans la neurogenèse. Les SL n'ont jamais été détectés dans les dérivés musculaires et épidermiques qui sont des tissus cibles pour certains neurones transitoirement somatostinergiques tels que les neurones de la corne ventrale et ceux des ganglions spinaux (HO, 1988 ; KATZ et coll., 1992 ; MAUBERT et coll., 1992a). L'ensemble de nos résultats suggère que la somatostatine pourrait être plus particulièrement impliquée dans des interactions neuro-neurales et/ou neuro-gliales et qu'elle pourrait jouer un rôle fondamental dans l'organisation précoce du tube neural, des neurones sensitifs et probablement des sympathoblastes de la CPV (MAUBERT et coll., 1993c). Parallèlement, nous avons confirmé que le NPY (MARTI et coll., 1992) et la TH (FOSTER et coll., 1985) sont exprimés transitoirement dans des neurones du tube neural et, en ce qui concerne plus particulièrement la TH, dans des neurones sensitifs appartenant aux nerfs crâniens (revue in KATZ et coll., 1992). Contrairement à la somatostatine, les immunoréactivités NPY et TH ne sont détectées, au cours de la neurogenèse, que dans des populations restreintes de neurones.

*Expression de VIP dans des neurones de la chaîne paravertébrale.*

Les marquages anti-NPY et TH sont, de toute évidence, également exprimés transitoirement dans de rares neurones de la CPV. Au cours de la période de différenciation, nous avons détecté la présence de rares cellules marquées par l'anti-VIP (dès E 14,5/15,5) (MAUBERT et coll., 1992b). Ce marquage VIPergique apparaît après les marquages NPYergique et somatostatinergique mais avant ceux d'autres neuropeptides présents dans des neurones sympathiques de l'adulte (MERGL, GAL, CGRP et SP). Dans la période périnatale, des essais de double marquage (TH/VIP) montrent que le VIP est principalement associé aux neurones dépourvus de TH. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par RAO et LANDIS (1993). Selon ces auteurs, le VIP apparaît très tôt dans la CPV alors que le CGRP et les enképhalines n'apparaissent qu'après la naissance. Une perte du phénotype catécholaminergique, liée à l'établissement de l'innervation, a été rapportée à propos de l'innervation sympathique des glandes salivaires (LANDIS et coll., 1988 ; LANDIS, 1990 ; RAO et LANDIS, 1993). Ainsi, une partie de l'innervation de ces glandes serait initialement catécholaminergique et, dans la période postnatale, perdrait ce



phénotype pour devenir cholinergique puis VIPergique. Au cours de l'ontogenèse, l'établissement de connexions de fibres nerveuses avec leur cible peut être envisagée dès le 14<sup>ème</sup> jour de gestation (revue in KATZ et coll., 1992) et la mise en évidence de trajets nerveux de nature NPYergique, catécholaminergique ou somatostatinerigique, quittant la CPV à ce stade, est en faveur de cette hypothèse. Ainsi des modifications phénotypiques, similaires à celles qui concernent l'innervation des glandes salivaires, pourraient être envisagées à un stade beaucoup plus précoce du développement. Dans la période périnatale, les rares neurones distinctement marqués par les IgG anti-TH et l'immunsérum anti-VIP pourraient être des neurones en cours de maturation puisque les dernières divisions des sympathoblastes peuvent encore se produire dans de rares neurones peu de temps avant ce stade du développement (HENDRY, 1977 ; LANDIS et DAMBROISE, 1986). L'étude précise des colocalisations VIP/TH et VIP/NPY au cours du développement embryonnaire (dès E 14,5-E 15,5) devrait nous renseigner sur les particularités de la différenciation et de la maturation des neurones sympathiques VIPergiques. Il est intéressant de noter qu'en ce qui concerne l'expression du VIP dans les ganglions sympathiques du fœtus ou de l'adulte, des différences importantes semblent exister selon le ganglion considéré (RAO et LANDIS, 1993).

#### *Ontogenèse des cellules SIF (Small intensely fluorescent cells).*

Dans la CPV, tout au long de la gestation, des cellules restent fortement TH(+), elles sont toujours dépourvues de SRIF et, sauf exception, de NPY. En fin de gestation, des cellules fortement catécholaminergiques constituent des îlots caractéristiques, espacés tout au long de la CPV. Ces îlots correspondraient aux cellules SIF embryonnaires et constitueraient chez l'adulte, les cellules SIF de type II ; les cellules de type I seraient quant à elles isolées dans les ganglions (revue in NIEL et JULE, 1990). On pourrait s'interroger sur l'origine des cellules SIF décrites dans les ganglions parasympathiques de l'adulte ; ces cellules, comme celles des ganglions sympathiques (HALL et LANDIS, 1991), se différencient tardivement (LEBLANC et LANDIS, 1989). LEBLANC et LANDIS (1989) et HALL et LANDIS (1991) ont montré que, contrairement aux conclusions établies à partir de données *in vitro*, les cellules SIF ne peuvent pas, *in vivo*, être à l'origine des neurones sympathiques ou parasympathiques. Nous n'avons pas été en mesure de différencier les cellules SIF des

cellules sympathoprécursors avec les IgG anti-TH et les immunosérums anti-SRIF et anti-NPY. Au cours du développement embryonnaire, ces cellules, comme les cellules sympathoprécursors, apparaissent toujours NPY(-) et SRIF(-). Une petite population de cellules SIF pourrait être NPYergique chez le rat adulte (JARVI et coll., 1986) mais non chez l'homme (BAFFI et coll., 1992). Les cellules SIF atteindraient leur maturité dans la période postnatale, se diviseraient activement et perdraient leur phénotype SA1 (CARNAHAN et PATTERSON, 1991a et b ; CARNAHAN et coll., 1991 ; HALL et LANDIS, 1991). Il est possible que la perte de ce phénotype, s'accompagne de l'expression du NPY dans de rares cellules (JARVI et coll., 1986). Une caractérisation plus précise de ces cellules doit être réalisée. A ce propos, on peut signaler que la présence d'enképhalines (KARHULA et coll., 1993), de galanine (KEAST, 1991), de sérotonine et de PNMT (revue in BOHN, 1987) a été signalée dans des cellules SIF de l'adulte. Des résultats préliminaires avec notre immunosérum anti-5-HT suggèrent que la sérotonine, contrairement au MERGL, à la GAL ou à la PNMT, pourrait être utilisée pour caractériser des cellules SIF et des cellules paraganglionnaires chez le fœtus dès E 16,5.

### **Plexus prévertébraux.**

Autour du 13<sup>ème</sup> jour de gestation, des cellules vont quitter la CPV pour coloniser le cortex fœtal ou constituer les plexus prévertébraux (PPV). Au niveau du plexus prévertébral qui constituera le plexus solaire de l'adulte (CHEVENDRA et WEAVER, 1992), différents ganglions vont s'individualiser : d'une part les paraganglions (revue in AHONEN et coll., 1987) et d'autre part des ganglions sympathiques. Dans les ganglions sympathiques prévertébraux, on détecte l'apparition des même types d'immunoréactivité (TH, NPY, SRIF) avec la même chronologie, que dans les neurones de la CPV. Dans ces ganglions, l'intensité du marquage somatostatinergique apparaît toujours plus faible que dans la CPV ou dans les ganglions péricurréaliens. Les différences d'intensité de marquage pourraient être liées aux relations neuroanatomiques établies par ces structures et/ou au fait que, chez l'adulte, les neurones somatostatinerghes sont plus nombreux dans les PPV que dans la CPV ou dans les ganglions péricurréaliens (CHEVENDRA et WEAVER, 1992). Toutefois, la faible intensité du marquage anti-SRIF des neurones des îlots intracurréaliens ne serait pas en faveur de cette dernière hypothèse, puisque ces neurones ne sont jamais somatostatinerghes



chez l'adulte. Chez ce dernier, les neurones des PPV et de la CPV pourraient différer par leurs afférences et/ou efférences, leurs messagers chimiques et leurs propriétés électrophysiologiques (revues in CHEVENDRA et WEAVER, 1992 ; KARHULA et coll., 1993). Jusqu'au 19<sup>ème</sup> jour de la gestation, les cellules paraganglionnaires sont SRIF(-) et NPY(-) ; elles possèdent les caractéristiques majeures décrites pour les cellules SIF embryonnaires ou les cellules précurseurs. Ces structures, qui interviennent à la naissance en libérant d'importantes quantités de catécholamines (revues in FRIED et coll., 1989 ; PADBURY, 1989), sont amenées à dégénérer dans la période postnatale (revue in AHONEN et coll., 1987). Des cellules enchevêtrées au sein de ganglions nerveux, décrits en tant que paraganglions, par référence aux travaux de AHONEN et coll. (1987), pourraient être à l'origine de cellules SIF, comme celles décrites dans le ganglion pelvien majeur (ganglion mixte, sympathique et parasympathique) (KARHULA et coll., 1993). Cette hypothèse doit être confirmée. Les cellules paraganglionnaires que nous avons décrites correspondent vraisemblablement aux cellules marquées par l'anti-SA1 dont la localisation est "inattendue et inappropriée" dans l'embryon selon l'expression de ANDERSON et coll. (1991). Les paraganglions ne sont pas constitués d'une population homogène de cellules ; dès E 16,5, de rares cellules sont marquées par l'anti-MERGL. Nos résultats sont en accord avec ceux de HENION et LANDIS (1990) qui décrivent, au sein du complexe ganglionnaire extrasurrénalien (CGES), la présence de cellules enképhalinergiques dans des structures fortement catécholaminergiques mais dépourvues de NPY. Chez l'homme, un fœtus proche du terme que nous avons eu l'occasion d'examiner avait des cellules paraganglionnaires fortement catécholaminergiques mais dépourvues de NPY, contrairement aux neurones situés à leur périphérie. Peu de temps avant la naissance chez le cobaye et chez le nouveau-né de porc, des sous-populations de cellules galaninergiques, enképhalinergiques et NPYergiques (chez le cobaye essentiellement), ont été décrites dans les paraganglions (FRIED et coll., 1989). Bien que nous n'ayons pas étudié de façon exhaustive ces structures dans la période périnatale, nous avons détecté de rares cellules NPYergiques qui pourraient correspondre aux cellules adrénérgiques [PNMT(+)] décrites au voisinage de la naissance par AHONEN et coll. (1987). Néanmoins la PNMT n'est pas détectée, comme le NPY, aux stades où des cellules sont marquées par l'anti-MERGL, ceci est en accord avec les observations de

HENION et LANDIS (1990). Une étude plus précise des paraganglions doit être réalisée dans la période périnatale.

### *Colonisation surrénalienne.*

Les cellules de la LSS vont coloniser le cortex surrénalien fœtal entre le 14<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour de la gestation ; cette colonisation s'effectue en deux étapes à partir de la CPV. Les cellules qui migrent constituent tout d'abord, en bordure de la surrénale, un blastème à partir duquel d'autres cellules vont coloniser le cortex surrénalien (TEITELMAN et coll., 1979, 1982 ; VERHOFSTAD et coll., 1979 ; SOINILA et coll., 1988). Autour du 15<sup>ème</sup> jour de la gestation, des cellules constituant le blastème possèdent les caractéristiques de cellules différenciées en neurones à savoir qu'elles sont faiblement TH(+) ; elles sont aussi marquées par les anti-NPY (NPY et C-PON) et, pour quelques unes d'entre elles, par l'anti-SRIF. Dans leur étude ultrastructurale, ELMAGHRABY et LEVER (1980) ont mis en évidence dès ce stade plusieurs types cellulaires en bordure de la surrénale. Selon plusieurs auteurs, ces cellules pourraient avoir colonisé ou coloniseraient le cortex (ANDERSON et AXEL, 1986 ; HENION et LANDIS, 1990 ; ANDERSON et coll., 1991). Ainsi, ANDERSON et AXEL, (1986) considèrent que la migration et la colonisation se font en une seule étape à partir de la CPV. Au stade E 14,5/15,5 des cellules précurseurs, localisées au pôle aortique de la surrénale, possèdent des caractéristiques neuronales (elles sont marquées par le SCG 10, un marqueur neuronal) qu'elles perdraient en colonisant le cortex. Dans une étude plus récente, ANDERSON et coll. (1991) ne décrivent pas plus clairement que dans leur publication antérieure les événements intervenant lors de la colonisation ; ils rapportent (sans support iconographique) que les cellules surrénaliennes colonisant le cortex sont toutes marquées par l'anti-SA1 ; néanmoins, à E 14,5, ils signalent l'existence, sur certaines coupes, d'un intense marquage avec l'anti-B2 à "l'intérieur de l'ébauche surrénalienne". Ces cellules "se dissocieraient de la surrénale pour constituer le CGES et éventuellement dégénéreraient en fin de gestation" (ANDERSON et coll., 1991). Leur description des cellules du CGES concerne parfois des cellules différenciées en neurones [B2(+)] et des cellules qui gardent les caractéristiques de précurseurs [SA1(+)] (ANDERSON et coll., 1991). Nos résultats suggèrent que dans le CGES, seules les cellules extrasurrénaliennes qui gardent le phénotype SA1 doivent dégénérer ; elles constituent les paraganglions que nous avons

décrits. Il est fort probable, en accord avec l'étude de SOINILA et coll. (1988), que les cellules différenciées en neurone dans le blastème constituent un ganglion péricrénal de l'adulte tel que, selon nous, le ganglion suprarenal (BALJET et DRUCKER, 1979).

### *Neurones intrasurréniens.*

D'après nos propres observations, différents types cellulaires peuvent être détectés au cours de la colonisation du cortex surrénalien : des cellules fortement TH(+) mais NPY(-) et de plus rares cellules NPY(+). Ces observations ne plaident pas en faveur de l'hypothèse selon laquelle un seul type cellulaire pourrait coloniser la surrénale et perdrait ses caractéristiques neuronales en se différenciant en cellules chromaffines (ANDERSON et AXEL, 1986). Les travaux de ces derniers auteurs, réalisés *in vivo* et *in vitro*, ont largement contribué à l'élaboration du schéma classique de différenciation des cellules de la LSS. Selon ce schéma, les cellules précurseurs de la LSS se différencieraient au sein de la surrénale, en cellules chromaffines dans un environnement riche en glucocorticoïdes et, à l'extérieur de la surrénale en neurones sympathiques sous l'influence d'autres facteurs (revue in ANDERSON, 1993a et b). Nos observations vont à l'encontre de cette hypothèse. En effet, dans la surrénale, des cellules s'associent très tôt, en îlots, se différencient et acquièrent les caractéristiques immunohistologiques des neurones de la CPV ou des PPV. La détection d'un marquage anti-SRIF atteste d'une différenciation en neurones pour des cellules qui constituent ces îlots. La taille de ces îlots de neurones augmente fortement dans la période prénatale en dépit d'un environnement riche en glucocorticoïdes. Les cellules qui constituent ces îlots sont toujours dépourvues d'autres types testés d'immunoréactivités (PNMT, MERGL, 5-HT, NT, CGRP, SP et GAL). L'absence de PNMT ou de 5-HT dans ces neurones a amené certains auteurs à les considérer comme des cellules noradrénergiques différenciées (SOINILA et coll., 1988) ou tout au moins comme leurs précurseurs (LEON et coll., 1992b). Dans la période périnatale, la taille et le nombre de ces îlots diminuent de telle sorte que chez l'adulte, seuls quelques uns subsistent. Nos observations sont en accord avec les résultats de HENION et LANDIS (1990). Ces auteurs ont en effet étudié l'apparition du NPY dans la surrénale ; ils rapportent que, dès E 15, 50% des cellules chromaffines sont NPYergiques et que ce pourcentage atteindrait 80% au 20<sup>ème</sup> jour de gestation. Durant cette période, l'augmentation du nombre de cellules NPYergiques porte

fondamentalement sur des cellules en îlots faiblement TH(+) (HENION et LANDIS, 1990). Leurs observations suggèrent donc une forte augmentation du nombre de neurone intrasurréaliens. Elles contredisent par contre d'autres études qui ne font pas état d'une prolifération de neurones dans le cortex fœtal (ANDERSON et AXEL, 1986 ; ANDERSON et coll., 1991). ANDERSON et coll. (1991) décrivent la présence de cellules "occasionnellement" marquées par le B2 au 18<sup>ème</sup> jour de la gestation. *In vivo*, la distribution du marquage anti-B2 n'a jamais été décrite entre la période de colonisation et le 18<sup>ème</sup> jour de gestation (ANDERSON et AXEL, 1986 ; ANDERSON et coll., 1991), ce qui nous étonne vivement. Bien que le nombre et la taille des îlots soit variable d'une surrénale à l'autre, il est surprenant que ANDERSON et coll. (1991), pour qui les cellules B2 pourraient correspondre aux cellules NPYergiques organisées en îlots (décrites par HENION et LANDIS, 1990), n'aient observé que de manière "occasionnelle" la présence de ces îlots de neurones à un stade où ils sont pourtant très abondants. Les cellules possédant des caractéristiques neuronales sont toujours censées dégénérer dans un environnement riche en glucocorticoïdes (ANDERSON et AXEL, 1986 ; ANDERSON et coll., 1991). HENION et LANDIS (1990) émettent l'hypothèse que les cellules NPYergiques organisées en îlot sont des neurones qui dégénéreraient en fin de gestation. Compte tenu des similitudes que nous avons rapporté entre le marquage B2 et le marquage SRIF dans les structures extrasurréaliennes, il est vraisemblable que les îlots de cellules NPYergiques et somatostatinerigiques que nous avons observés correspondent bien aux "rares cellules B2(+)" décrites à E 18,5 par ANDERSON et coll. (1991). Notre étude *in vivo* va donc à l'encontre des observations et des conclusions initiales de ANDERSON et AXEL (1986) ; elle suggère, que, malgré un environnement riche en glucocorticoïdes, de nombreux neurones peuvent se différencier dans la glande surrénale fœtale.

LEON et coll. (1992b) ont étudié la distribution de deux molécules d'adhésion, le L1 et la NCAM, dans la surrénale adulte et au cours du développement embryonnaire. La molécule d'adhésion L1 est un marqueur spécifique des neurones mais également des cellules noradrénergiques de l'adulte (LEON et coll., 1992a et b). Ces auteurs suggèrent que les îlots faiblement TH(+), marqués par leur anti-L1, pourraient être préassemblés au sein du blastème et coloniseraient le cortex sous cette forme à partir du 16<sup>ème</sup> jour de gestation. Nos observations ne sont pas en faveur de cette hypothèse puisque, dès ce

stade, des cellules en îlot sont détectées au pôle opposé à celui du blastème. Selon ANDERSON et coll. (1991), la présence "occasionnelle" de cellules B2 au 18<sup>ème</sup> jour de gestation pourrait s'expliquer à la lumière de résultats obtenus *in vitro* : ces cellules auraient perdu la faculté de répondre aux glucocorticoïdes. Ces cellules se seraient prédifférenciées soit avant, soit peu de temps après la colonisation (ANDERSON et coll., 1991). L'hypothèse d'une prédifférenciation des cellules B2(+) lors de la colonisation est tout à fait compatible avec la présence de rares cellules NPYergiques (également décrites par HENION et LANDIS 1990) parmi les cellules colonisant le cortex. Nous pouvons néanmoins envisager que ces cellules pourraient correspondre à des cellules chromaffines puisque de rares cellules de ce type sont observées, peu de temps après la colonisation (E 16,5). Une autre hypothèse, non exclusive de la première, pourrait être envisagée ; dès la colonisation, les fibres somatostatinerigiques situées à proximité des cellules sympathoprécursus colonisant le cortex, pourraient favoriser une différenciation de ces cellules en neurones comme nous l'avons envisagé pour la CPV. En faveur de cette hypothèse, on peut signaler que dès ces stades précoces, des fibres décrites à l'échelle ultrastructurale ont été détectées à proximité des cellules colonisant le cortex (EL-MAGHRABY et LEVER, 1980 ; MILLARD et UNSICKER, 1981).

Les facteurs permettant à des neurones de proliférer dans un environnement riche en glucocorticoïdes (ce qui doit être le cas de la surrénale) doivent être caractérisés. Comme l'ont signalé HENION et LANDIS (1990), l'augmentation de la taille des îlots de cellules NPYergiques pourrait résulter de la division de ces cellules ou de l'adjonction de nouvelles cellules fortement TH(+). Un des points les plus importants serait d'établir si, comme pour les cellules sympathoprécursus qui expriment la TH (ROTHMAN et coll., 1980), les neurones qui expriment le NPY ont la capacité de se diviser. L'éventualité que les cellules fortement TH(+), observées en bordure des îlots, puissent se différencier en neurones nous paraît plus probable. L'établissement de contacts intercellulaires et/ou l'émission de molécules par les neurones (somatostatine ?), pourrai(en)t contribuer à la différenciation de ces cellules fortement catécholaminergiques. Selon HENION et LANDIS (1990), l'établissement de contacts entre les cellules des îlots pourrait être responsable d'une forte expression du NPY dans ces cellules. Nos observations suggèrent que c'est une différenciation en neurones, associée à une diminution de la TH et/ou probablement une

perte du phénotype SA1, qui est responsable d'une forte expression du NPY.

A E 20, HENION et LANDIS (1990) signalent la présence de neurones NPYergiques dépourvus de marquage anti-TH ; ces neurones seraient distincts des cellules en îlot car ils sont encore observés, contrairement à ces dernières, 7 jours après la naissance. Pour ces auteurs, ces neurones correspondraient aux neurones NPYergiques de l'adulte et auraient une origine parasympathique. Les neurones NPYergiques que nous avons détectés chez les nouveau-nés et l'adulte sont toujours, bien que très faiblement, TH(+). Par ailleurs, LEON et coll. (1992b) ont également signalé des neurones catécholaminergiques chez des nouveau-nés de 7 jours (P7) et, selon eux, ces neurones pourraient provenir des îlots de cellules faiblement catécholaminergiques et L1(+) détectés chez le fœtus. Ces travaux et nos observations suggèrent que les neurones NPYergiques détectés à E 20 ou P7 par HENION et LANDIS (1990) proviennent des îlots de neurones et sont donc d'origine sympathique comme l'ont préalablement rapporté DAGERLIND et coll. (1990) pour les neurones NPYergiques de l'adulte. Les neurones détectés à E 20 par HENION et LANDIS (1990) pourraient s'être différenciés précocement. En effet, certains neurones des îlots présentent très tôt (E 16,5/17,5) un marquage anti-SRIF, alors que d'autres ne sont marqués que plus tardivement, autour de E 19,5, voire pour de rares neurones seulement au voisinage du 21<sup>ème</sup> jour de gestation. Des neurones des îlots pourraient établir des connections particulières (comme nous l'avons envisagé pour la CPV) et être à l'origine des rares neurones VIPergiques détectés par certains auteurs chez l'adulte.

Selon LEON et coll. (1992b), la plupart des cellules constituant les îlots ne dégèrent pas mais se différencient en cellules noradrénergiques tandis que d'autres, bien plus rares, deviennent des neurones ganglionnaires. Chez le fœtus, la détection de nombreuses fibres NPYergiques ou somatostatinerigiques associées à ces îlots et l'expression de phénotypes détectés dans les neurones extrasurrénaux, ne plaident pas en faveur d'une dédifférenciation ultérieure de ces neurones en cellules noradrénergiques. Compte tenu de la rareté relative des neurones chez l'adulte, il est fort probable, en accord avec d'autres études (revue in HENION et LANDIS, 1990), qu'une mort neuronale survient au cours de la période périnatale plutôt qu'une dédifférenciation aboutissant à la transformation d'un phénotype neuronal en un phénotype de cellule chromaffine. Nous ne pouvons pas



exclure que les rares cellules en îlot, dans lesquelles nous n'avons pas détecté de SRIF, puissent donner des cellules chromaffines noradrénergiques bien que ces dernières, contrairement au neurones, expriment peu, voire pas du tout, le NPY mais expriment fortement la TH chez l'adulte. Néanmoins, d'après ANDERSON et coll. (1991), les cellules qui expriment le B2 et, selon nous, celles qui expriment le SRIF, n'auraient pas la capacité de se différencier. Les facteurs capables d'induire la disparition ou au contraire le maintien d'îlots de neurones dans la période périnatale sont encore inconnus.

### *Les cellules chromaffines.*

Entre E 14,5 et E 15,5, les cellules précurseurs qui colonisent le cortex fœtal sont dépourvues de PNMT, 5-HT, NT, CGRP, GAL, SP et SRIF. En cours de colonisation, les rares cellules NPYergiques détectées au sein du cortex fœtal pourraient être des cellules prédifférenciées à l'origine des îlots de neurones intrasurrénaux. Les premières cellules NPYergiques identifiables en tant que cellules chromaffines sont détectées à partir de E 16,5 ; elles ne sont pas associées en îlots et l'intensité de leur marquage NPYergique est plus faible que dans les neurones insulaires. Leur nombre ne cesse cependant d'augmenter, principalement en fin de gestation, à tel point que, chez le fœtus à terme et principalement chez le nouveau-né, les cellules chromaffines sont majoritairement NPYergiques. HENION et LANDIS (1990) estiment que la proportion de cellules chromaffines NPYergiques passe de 50% à E 15 à 80% à E 20 puis stagne jusqu'à la naissance. A E 15, les 50% de cellules chromaffines NPYergiques (décrites et illustrées) correspondent aux neurones du blastème. Ces auteurs décrivent en position plus latérale de rares cellules NPYergiques qui, selon nous, appartiennent vraiment au cortex surrénal fœtal et pourraient correspondre à des cellules prédifférenciées en neurones. L'augmentation de la population de cellules chromaffines NPY(+), rapportée par HENION et LANDIS (1990) entre E 15 et E 20, concerne principalement celles qui sont associées en îlots puisque les cellules extra-insulaires sont peu, voire pas, NPYergiques. Du 18<sup>ème</sup> jour de gestation à la naissance, le nombre de cellules NPYergiques resterait constant puis diminuerait ensuite pour atteindre, dès le 10<sup>ème</sup> jour post-natal, les proportions observées chez l'adulte. Nos observations suggèrent tout de même une forte augmentation du marquage NPYergique des cellules chromaffines dans la période périnatale (entre E 18,5/19,5 et la naissance). De plus, nous

avons toujours noté que les cellules chromaffines de surrénales de nouveau-nés (sauf à de rares exceptions le jour de la naissance) sont plus intensément marquées que celles des fœtus, même à terme. Ces observations confortent celles de HÖLGERT et coll. (1991) qui, par hybridation *in situ* à l'échelle macroradioautographique, signalent une forte augmentation des ARNm codant pour le NPY entre E 21 et 1 jour postpartum, suivie d'une baisse après le deuxième jour de vie extra-utérine. Ces auteurs envisagent que cette augmentation de synthèse pourrait intervenir pour compenser une libération de NPY lors de la parturition. A la naissance, nos observations selon lesquelles des surrénales possèdent des cellules chromaffines peu immunoréactives pour nos immunsérums anti-neuropeptides seraient en faveur d'une libération des antigènes recherchés. HENION et LANDIS (1990) ne signalent pas d'augmentation périnatale du nombre de cellules médullaires NPYergiques mais ils envisagent que les cellules en îlots pourraient être remplacées par une nouvelle population de cellules NPYergiques issues de la division des cellules extra-insulaires ; cette hypothèse est en accord avec l'augmentation prénatale du nombre de cellules chromaffines NPYergiques que nous avons observée.

HENION et LANDIS (1990) suggèrent que l'induction de l'expression du NPY dans les cellules chromaffines serait indépendante des glucocorticoïdes puisque selon eux, il y a 50% de cellules chromaffines NPYergiques à E 15, avant même qu'une forte augmentation de synthèse et de sécrétion des glucocorticoïdes ne survienne entre E 16 et E 18 (SEIDL et UNSICKER, 1989). Nos observations selon lesquelles le NPY est associé aux cellules chromaffines à partir de E 16,5 seraient au contraire en faveur d'un rôle des glucocorticoïdes dans l'induction et/ou dans la régulation du gène du NPY dans les cellules chromaffines. A l'appui de cette dernière hypothèse, on peut rappeler, que d'une part le NPY apparaît dans les cellules chromaffines postérieurement à la détection d'une activité NADPH-diaphorase dans les cellules corticales, et que d'autre part, l'augmentation prénatale du nombre de cellules NPYergiques est synchrone d'une activation de la corticosurrénale dont l'apogée se situe autour de E 18/19 ; enfin, on peut rappeler que le NPY est préférentiellement localisé dans les cellules chromaffines adrénérgiques de l'adulte qui possèdent indubitablement des récepteurs aux glucocorticoïdes (CECCATELLI et coll., 1989). Cette hypothèse est actuellement soumise à une vérification expérimentale (hybridation *in situ* et Northern Blot), chez des adultes dont l'activité

corticosurrénaliennne est expérimentalement modifiée et contrôlée. Dans la période périnatale, le NPY est, parmi les peptides testés, celui qui est le plus fortement exprimé dans la médullosurrénale tant par le nombre de cellules marquées que par l'intensité du marquage.

Des cellules marquées par l'anti-MERGL sont détectées dès E 16,5 dans des cellules chromaffines ; leur nombre augmente par la suite mais demeure modeste par rapport à celui des cellules chromaffines NPYergiques. Toutes les surrénales de nouveau-nés contiennent davantage de cellules marquées par l'anti-MERGL que celles d'adultes qui en sont généralement dépourvues. L'apparition des cellules enképhalinerigiques à E 16,5 et leur forte représentation à la naissance confirment les observations de HENION et LANDIS (1990), mais infirment celles de BOHN et coll. (1983) pour qui les cellules chromaffines seraient dépourvues d'immunoréactivité anti-Met- et Leu-ENK à la naissance. HENION et LANDIS (1990, 1992) suggèrent que, contrairement au NPY, l'expression des enképhalines pourrait être induite par les glucocorticoïdes fœtaux. Le fait que l'apparition de ces cellules (comme celle des cellules chromaffines NPYergiques) soit postérieure à la détection d'une activité NADPH diaphorase dans le cortex pourrait être un argument en faveur de cette hypothèse, qui reste néanmoins à vérifier. Nous n'avons pas été en mesure, pas plus que HENION et LANDIS (1990), de détecter des fibres enképhalinerigiques avant la naissance. La diminution du nombre de cellules enképhalinerigiques après la naissance coïncide avec l'apparition postnatale d'enképhalines et d'acétylcholine dans l'innervation préganglionnaire (HENION et LANDIS, 1990, 1992).

Dans les cellules chromaffines, l'apparition de neurotensine (NT) et de CGRP est postérieure à celle de NPY et de MERGL mais antérieure à celle de GAL et de SP. Un faible marquage anti-NT est présent dans des cellules chromaffines autour du 17<sup>ème</sup> jour de gestation, ce qui confirme en partie les observations de TISCHLER et coll. (1991) faites *in vitro* dans certaines conditions expérimentales. Toutefois, ces auteurs n'ont pas obtenu de marquage *in vivo* chez le fœtus de 21 jours ou chez l'adulte. L'intensité du marquage augmente par la suite mais demeure faible, quand on la compare à celle des marquages du NPY, du MERGL ou du CGRP. Chez les nouveau-nés, la majorité des cellules chromaffines sont NT(+), ce qui n'est pas toujours le cas chez l'adulte. Dans la mesure où il existe un bon parallélisme entre la détection du marquage neurotensinerigique et l'augmentation de la production de

glucocorticoïdes (SEIDL et UNSICKER, 1989), un rôle éventuel de ces hormones sur l'expression du gène de la NT pourrait être envisagé.

Le CGRP apparaît dans de rares cellules autour du 19<sup>ème</sup> jour de gestation ; le nombre de cellules immunoréactives s'accroît ensuite et devient important chez le fœtus à terme et chez le nouveau-né, ce qui n'est pas le cas chez l'adulte. L'apparition et le développement de CGRP dans un nombre restreint de cellules chromaffines pourrait être lié à l'augmentation de la production de glucocorticoïdes et/ou à la mise en place d'une innervation par des fibres à CGRP et/ou à NPY.

Contrairement au CGRP, les cellules chromaffines des surrénales fœtales et néonatales sont dépourvues de GAL et de SP, deux autres peptides mineurs de la médullosurrénale de l'adulte. L'apparition tardive de GAL et de SP pourrait être en relation avec le développement postnatal de certains types de fibres médullosurrénaliennes (GAL, CCK8, VIP) et/ou avec la maturation de l'innervation préganglionnaire (revues in STOTKIN et SEIDLER, 1989 ; HENION et LANDIS, 1992).

Un immunomarquage anti-PNMT apparaît au même stade que celui anti-5-HT, dès E 15,5 dans quelques cellules chromaffines de certaines surrénales et systématiquement à E 16,5 dans toutes les surrénales examinées. L'existence précoce de PNMT confirme certaines observations antérieures (TEITELMAN et coll., 1979, 1982 ; SOINILA et coll., 1988 ; HENION et LANDIS, 1990 ; EHRlich et coll., 1989) mais infirme celles d'autres auteurs (COCHARD et coll., 1979 ; VERHOFSTAD et coll., 1979, 1985 ; BOHN et coll., 1981 ; SEIDL et UNSICKER, 1989). Il est probable que ces différences chronologiques parfois mineures soient dues à des différences de sensibilité des immunsérums utilisés au cours de ces études et/ou à l'incertitude de  $\pm 8$  heures avec laquelle on peut déterminer le stade de la gestation. L'apparition simultanée et la distribution des marquages anti-5-HT et anti-PNMT dans les cellules chromaffines suggèrent que ces phénotypes pourraient être colocalisés chez le fœtus (comme ils le sont chez l'adulte) et induits par des mécanismes similaires. Ces conclusions sont en accord avec celles de HOLZWARTH et SAWETAWAN (1984), mais en désaccord avec celles de SOINILA et coll. (1988) pour qui les cellules précurseurs sont sérotoninergiques.

L'apparition de la PNMT dans les cellules chromaffines est généralement postérieure à celle d'une activité NADPH-diaphorase et de gouttelettes lipidiques dans des cellules corticales ; ce décalage temporel suggère l'éventualité d'une intervention des stéroïdes fœtaux dans



l'induction du gène de la PNMT. A cet égard, les avis sont très partagés. Selon EHRLICH et coll. (1989), l'expression initiale de PNMT serait indépendante des stéroïdes de type glucocorticoïdes. Néanmoins, à un stade ultérieur du développement intra-utérin, l'intervention de ces stéroïdes est unanimement admise (revue in WONG et coll., 1992). Par contre, selon SEIDL et UNSICKER (1989), les glucocorticoïdes doivent intervenir dans l'expression initiale de la PNMT dans les cellules chromaffines. Leurs résultats suggèrent que les corticostéroïdes sont présents chez le fœtus en quantité non négligeable, dès E 16, peu de temps avant l'apparition de la PNMT et des récepteurs spécifiques aux glucocorticoïdes (E 17 pour ces auteurs). Les travaux de l'équipe de ANDERSON renforcent aussi cette hypothèse, puisque les glucocorticoïdes seraient présents à E 14,5 et leurs récepteurs (ARNm), à E 15,5 (ANDERSON et coll., 1991). Pour ces auteurs, ces observations pourraient rendre compte du fait que les cellules colonisant le cortex gardent leur phénotype SA1 et seraient dans l'incapacité d'exprimer le phénotype B2. Ces quelques données extraites d'une abondante littérature soulignent l'existence de contradictions quant aux effets potentiels des glucocorticoïdes sur la différenciation des cellules de la LSS d'une part, et sur l'induction de la PNMT d'autre part. La confirmation de la présence (ou de l'absence) de récepteurs aux glucocorticoïdes dans les cellules qui colonisent le cortex devrait permettre d'apporter des arguments supplémentaires en faveur (ou défaveur) d'une action des glucocorticoïdes sur la différenciation fonctionnelle de ces cellules.

Après E 16,5, le nombre de cellules marquées par l'anti-PNMT ne cesse de croître bien qu'il existe toujours des cellules fortement TH(+) dépourvues de PNMT. A la naissance, la majorité des cellules sont adrénergiques, tandis qu'un nombre restreint de cellules doivent être noradrénergiques. Certains auteurs prétendent que ces deux types de cellules chromaffines ne sont pas encore individualisés à la naissance (VERHOFSTAD et coll., 1979 ; 1985) ; d'autres auteurs, plus nombreux, suggèrent au contraire que des cellules noradrénergiques sont présentes à ce stade (EL-MAGHRABY et LEVER, 1980 ; MILLARD et UNSICKER, 1981 ; HOLZWARTH et SAWETAWAN, 1985 ; SOINILA et coll., 1988). Les premières cellules noradrénergiques apparaîtraient entre E 20 et la naissance (LEON et coll., 1992b). Nous avons détecté, dès la période périnatale, différents sous-types de cellules chromaffines pouvant être caractérisés par la présence (ou l'absence) de marquage anti-PNMT, anti-5-HT, anti-NPY, anti-NT, anti-ENK ou anti-CGRP mais nous n'avons

pas établi de manière formelle la discrimination entre cellules adrénérgiques et noradrénérgiques. En effet, il n'y a pas à ce stade de différences intercellulaires dans l'intensité du marquage anti-TH et par ailleurs nous ne pouvons pas certifier que les cellules dépourvues de PNMT ne correspondent pas à des cellules qui viennent de se diviser. LEON et coll. (1992b) pensent d'une part que la PNMT serait réprimée dans des cellules faiblement catécholaminérgiques et L1(+), associées en îlots, et que d'autre part ces cellules donneraient les cellules noradrénérgiques de l'adulte. Leurs hypothèses sont basées sur le fait qu'à la naissance, la diminution de la taille des îlots de cellules faiblement TH(+) et L1(+) s'accompagne de l'apparition de petits îlots de cellules fortement TH(+), marquées par l'anti-L1, qui possèdent les caractéristiques phénotypiques des cellules chromaffines noradrénérgiques de l'adulte (LEON et coll., 1992a). Ces auteurs ne précisent pas si ces cellules apparaissent à proximité des îlots faiblement catécholaminérgiques que nous avons caractérisés en tant que neurones. Comme nous l'avons déjà envisagé, il est peu probable que les îlots de neurones, qui de toute évidence sont marqués par au moins deux marqueurs neuronaux, le B2 (ANDERSON et coll., 1991) et le SRIF, puissent donner les cellules noradrénérgiques de l'adulte. Néanmoins on ne peut pas exclure que les cellules noradrénérgiques puissent dériver de certaines cellules des îlots n'exprimant pas ces marqueurs.

On ne connaît pas les facteurs impliqués dans la différenciation des cellules chromaffines noradrénérgiques. On peut toutefois signaler que les premières cellules noradrénérgiques apparaissent entre E 20 et la naissance (LEON et coll., 1992b), alors même que sont détectées des fibres à CGRP et/ou à NPY/sTH dans la médullosurrénale. Au voisinage de la naissance, des fibres à CGRP(+) et NPY(+) ont été clairement localisées à proximité des îlots de neurones et de cellules chromaffines. Ces innervations neuropeptidérgiques pourraient bien être impliquées dans la différenciation des cellules noradrénérgiques. En faveur de cette hypothèse, on peut rappeler, d'une part que le CGRP a été impliqué dans la différenciation de la paroi des vaisseaux (THIEVENT et CONNANT, 1993) et que, d'autre part les cellules noradrénérgiques de l'adulte sont plus richement innervées que les cellules adrénérgiques (revue in KACHI et coll., 1993). Paradoxalement, TOMLINSON et COUPLAND, (1990) ont montré à l'échelle ultrastructurale que les cellules noradrénérgiques du nouveau-né sont moins densément innervées que



les cellules adrénérgiques, ce qui n'est pas le cas chez l'adulte. Ces données suggèrent néanmoins que l'innervation qui s'installe dans la période périnatale pourrait jouer un rôle dans le processus de différenciation des cellules noradrénergiques.

### *Innervation médulosurrénalienne.*

Au voisinage immédiat de la naissance, nous avons détecté des fibres immunoréactives NPY(+), TH(+) et CGRP(+) paraissant se diriger vers la médulosurrénale ou localisées en son sein. De telles fibres ont également été mises en évidence autour des cellules chromaffines de l'adulte (KURAMOTO et coll., 1987 ; OOMORI et coll., 1991). A l'échelle ultrastructurale, TOMLINSON et COUPLAND, (1990) ont décrit, chez des nouveau-nés de 1 jour, 3 types de fibres à proximité des cellules chromaffines. Ils ont signalé des fibres possédant des caractéristiques ultrastructurales de fibres catécholaminérgiques et ont envisagé que les fibres préganglionnaires pourraient être transitoirement catécholaminérgiques. Compte tenu de nos propres observations, deux des trois types de fibres pourraient être de nature NPYérgique (et catécholaminérgique) et CGRPérgique. Le troisième type de fibres pourrait correspondre à l'innervation préganglionnaire des cellules chromaffines, bien que celle-ci soit totalement immature à ce stade. Il n'en demeure pas moins vrai qu'une libération de catécholamines survient à la naissance, et que tous les éléments permettant l'exocytose des granules chromaffines sont présents à ce stade du développement (revue in SLOTKIN et SEIDLER, 1989). La non-réponse de la médulla à une stimulation insulinique n'impliquerait qu'une déficience dans les connexions établies par le splanchnique (revue in SLOTKIN et SEIDLER, 1989). Une implication des fibres NPYérgiques et/ou celle des fibres à CGRP dans le contrôle nerveux de la libération néonatale des catécholamines lors de la parturition n'a, à notre connaissance, jamais été envisagée, d'autant plus que l'existence de telles fibres dans la surrénale du fœtus à terme n'avait pas encore été décrite.

*En conclusion, nous avons établi que le NPY est présent dans trois compartiments de la surrénale du rat adulte : des fibres nerveuses (capsulo-glomérulaires et médullaires) dans lesquelles nous avons détecté le neuropeptide mais non ses ARNm, des neurones*

ganglionnaires et des cellules chromaffines qui contiennent à la fois le NPY et ses ARNm.

Le NPY est, en règle générale, le plus abondant des neuropeptides recherchés dans la surrenale adulte. Les cellules chromaffines peuvent également présenter une immunoréactivité pour la neurotensine (généralement de faible intensité), la Met-ENK-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> et plus rarement le CGRP, la galanine et la substance P. Une colocalisation avec le NPY n'a pas été clairement établie pour ce dernier neuropeptide.

Il existe une importante variabilité inter-individuelle quant à la nature et à l'abondance des neuropeptides présents dans les cellules chromaffines et dans les différentes fibres qui les innervent. Cette variabilité est susceptible de rendre compte de données divergentes de la littérature quant à la présence et à l'abondance de neuropeptides surrenaliens. La médullosurrenale reçoit par ailleurs un abondant contingent de fibres enképhalinergiques, CGRPergiques, SPergiques et NPY/sTH, ainsi qu'un contingent plus discret de fibres à GAL, CCK<sub>8</sub> et VIP. Nous avons mis pour la première fois en évidence chez le rat, une innervation cholécystokininergique (CCK<sub>8</sub>) de la surrenale intéressant la médulla et le cortex superficiel. L'innervation peptidergique de la médullosurrenale n'est pas homogène ; il existe manifestement une innervation préférentielle des cellules chromaffines noradrénergiques et adrénérgiques par certains types de fibres. Ainsi, les îlots de cellules noradrénergiques sont préférentiellement innervés par des fibres à substance P et ne sont pas innervés par des fibres enképhalinergiques alors que les îlots de cellules adrénérgiques reçoivent préférentiellement une innervation enképhalinergique et ne reçoivent pas de dense innervation à SP. Sur la base de ces données histologiques, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que cette innervation peptidergique, particulièrement diversifiée par la nature des peptides

*exprimés, la densité et la distribution des fibres, pourrait intervenir dans le contrôle multifactoriel local de l'activité du tissu chromaffine. On peut aussi envisager que l'expression de certains phénotypes peptidergiques au sein des cellules chromaffines soit corrélée avec tel ou tel type d'innervation.*

*La zone capsulo-glomérulaire reçoit un important contingent de fibres NPYergiques, VIPergiques et catécholaminergiques. D'autres fibres, plus rares, à CGRP, CCK<sub>8</sub>, GAL et SP sont également présentes dans cette zone. Ces observations immunohistologiques suggèrent que de nombreux peptides associés à des fibres nerveuses pourraient participer localement au contrôle multifactoriel de la production d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée et/ou au contrôle de la circulation locale dans cette zone du cortex. Les neuropeptides libérés dans la zone corticale superficielle pourraient également agir, via la vascularisation de la glande, sur les zones corticales sous-jacentes. Nous rapportons également qu'une réaction histoenzymatique utilisant le NADPH comme cofacteur est parfaitement corrélée avec l'acquisition des capacités stéroïdogéniques du cortex. Cette réaction paraît être un outil intéressant pour l'étude du tissu stéroïdogénique du cortex surrénalien.*

*Notre étude ontogénétique nous a permis d'entamer la caractérisation des dérivés sympathosurrénaux au cours du développement embryonnaire. Chez le rat, parmi les neuropeptides testés, présents dans les neurones sympathiques de l'adulte, le NPY est le premier neuropeptide à apparaître au cours de l'ontogenèse dans les neurones sympathiques ; son expression semble corrélée à la diminution de l'intensité du marquage anti-TH et/ou à la disparition du marquage anti-SAI rapportée par ANDERSON et coll., (1991). Notre étude suggère par ailleurs l'implication de la somatostatine dans la neurogénèse de la*

*lignée sympathosurrénaliennne (LSS). En effet, dès (ou peu de temps après) l'apparition des cellules précurseurs de la CPV, du SNE ou de la surrénale, des fibres somatostatinerigiques sont détectées à leur voisinage alors que ces (ou certaines) cellules subissent d'importants bouleversements phénotypiques. Dans la LSS, la somatostatine apparaît peu après le NPY dans les neurones sympathiques ; sa distribution, comparée à celle d'un autre marqueur des neurones sympathiques, le B2 (ANDERSON et coll., 1991), suggère que ce peptide pourrait être utile pour caractériser une différenciation en neurones pour la majorité des dérivés sympathosurréaliens typiques (neurones sympathiques de la CPV, des plexus prévertébraux (PPV) et de la surrénale). Contrairement au NPY, la somatostine n'a jamais été détectée dans les dérivés sympathosurréaliens qui ne se différencient pas en neurones (cellules SIF, cellules paraganglionnaires et cellules chromaffines). Au cours du développement embryonnaire précoce la somatostatine est transitoirement exprimée dans les neurones sympathosurréaliens, des neurones de la mælle épinière et des neurones sensitifs. Nos observations suggèrent que ce peptide pourrait jouer un rôle majeur dans l'organisation et/ou la différenciation de ces populations neuronales. Cette hypothèse doit néanmoins être soumise à une vérification expérimentale.*

*La différenciation des neurones de la LSS est marquée par une diminution de l'immunoréactivité TH, une expression de NPY puis une expression transitoire de somatostatine.*

*Dans la CPV du tronc, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) est détecté dans de rares neurones autour du 15<sup>ème</sup> jour de gestation, plus tardivement que le NPY et la somatostatine mais avant d'autres neuropeptides présents ou décrits dans des neurones sympathiques de l'adulte (galanine, enképhaline, CGRP, substance P).*

*La colonisation de la surrénale s'opère en deux étapes à partir de la CPV. Elle passe par la formation d'un blastème au pôle aortique de cette glande ; des cellules de ce blastème se différencient en neurones et sont probablement à l'origine du ganglion suprarrénal de l'adulte. Compte tenu de l'abondance des neurones intrasurrénaliens détectés chez le fœtus (et parfois chez l'adulte), la différenciation des cellules de la LSS ne doit pas être réduite à une différenciation en cellules chromaffines sous l'effet des glucocorticoïdes surrénaliens. Ces neurones intrasurrénaliens pourraient provenir de cellules prédifférenciées ou se différencieraient dans la surrénale sous à l'influence de facteurs nerveux (innervation somatostatinergique par exemple). Ultérieurement, malgré un environnement riche en glucocorticoïdes, les îlots formés par ces neurones deviennent très importants. Dans la période périnatale, une intense mort neuronale pourrait rendre compte du nombre habituellement modeste (sauf exception) de neurones intrasurrénaliens détectés chez l'adulte.*

*Entre le 15<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour de la gestation, le NPY, les enképhalines, la PNMT et la sérotonine font leur apparition dans des cellules chromaffines. La détection simultanée d'une activité NADPH-diaphorase et de gouttelettes lipidiques dans les cellules corticales voisines pourrait constituer un argument nouveau, ou supplémentaire, en faveur d'une intervention des corticostéroïdes dans l'induction de ces phénotypes au sein des cellules chromaffines. La neurotensine et le CGRP sont détectés avant la naissance, contrairement à la GAL et à la SP. Dès la naissance, différents types de cellules chromaffines peuvent être individualisés d'après la présence (ou l'absence) de divers marqueurs (NPY, enképhalines, CGRP, NT, PNMT et sérotonine). Dans la surrénale du fœtus à terme, nous avons mis en évidence la présence de fibres peptidergiques à NPY et CGRP ; ces neuropeptides pourraient être*

*impliqués dans la différenciation des cellules noradrénergiques et/ou dans la libération du contenu des cellules chromaffines au moment de la naissance.*



## CHAPITRE II

## Chapitre 2

**Effets de la démyélinisation surrénalienne *in vivo* sur les catécholamines et le NPY de la zone capsulo-glomérulaire**

## Chapitre 2

### Effets de la démyélinisation surrénalienne *in vivo* sur les catécholamines et le NPY de la zone capsulo-glomérulaire

<b>I - INTRODUCTION</b>	p 124
<b>II - MATERIEL ET METHODES</b>	p 126
A - Animaux	p 126
B - Expériences de démyélinisation	p 126
C - Dosages des catécholamines, du NPY, de la corticostérone et de l'aldostérone	p 126
1°) Catécholamines	p 126
2°) NPY	p 127
a) Extraction	—
b) Réactifs du dosage	—
c) Séparation	p 128
d) Caractéristiques du dosage	—
3°) Corticostérone	p 128
a) Extraction	—
b) Réactifs du dosage	p 129
c) Séparation	—
d) Caractéristiques	p 130
4°) Aldostérone	p 130
a) Extraction	—
b) Réactifs du dosage	—
c) Séparation	p 131
d) Caractéristiques du dosage	—
<b>III - RESULTATS</b>	p 132
A - Stéroïdes surrénaliens et plasmatiques	p 132
B - Catécholamines (CA) surrénaliennes et plasmatiques	p 132
1°) Effets de la démyélinisation unilatérale	—
2°) Effets de la démyélinisation bilatérale	p 133
C - NPY surrénalien	p 134
<b>IV - DISCUSSION</b>	p 135

## Chapitre 2

# Effets de la démyélinisation surrénalienne *in vivo* sur les catécholamines et le NPY de la zone capsulo-glomérulaire.

### I - INTRODUCTION

L'existence d'interactions fonctionnelles entre le cortex surrénalien et la médulla est bien démontrée. On sait en particulier, depuis les travaux de WURTMAN et AXELROD (1966) chez le rat adulte, de MARGOLIS et coll. (1966) chez le fœtus, que le développement de l'activité phényléthanolamine-N-méthyl transférase (PNMT), qui permet la synthèse d'adrénaline (A) à partir de noradrénaline (NA), est contrôlée par les glucocorticoïdes. D'autres expériences ont mis en évidence le rôle des hormones corticosurréaliennes dans la modulation de la synthèse et de la dégradation des enzymes impliquées dans la formation des catécholamines (CA) (revues in THOENEN et OTTEN, 1978 ; UNGAR et PHILLIPS, 1983). Réciproquement, l'adrénaline et la noradrénaline peuvent stimuler la sécrétion d'aldostérone (HORIUCHI et coll., 1987) mais non la dopamine (DA) qui paraît inhiber directement la sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée (Mc CARTY et coll., 1984).

La zone glomérulée de la corticosurrénale de rat reçoit une innervation catécholaminergique (KLEITMAN et HOLZWARTH, 1985a) mais les techniques d'histofluorescence utilisées par ces auteurs ne permettent pas d'identifier l'amine biogène présente dans les fibres. Toutefois, la PNMT n'ayant pas été révélée par immunohistologie dans le cortex surrénalien (HOLZWARTH et BROWNFIELD, 1983), il est peu vraisemblable que les fibres histofluorescentes contiennent de l'adrénaline endogène. BUU et LUSSIER (1990) ont montré indirectement l'absence d'activité tyrosine hydroxylase (TH) dans le cortex surrénalien alors que OOMORI et coll. (1989) signalent la présence de fibres nerveuses immunoréactives à TH dans la capsule isolée de la surrénale de rat. La NA pourrait être un neurotransmetteur dans la zone glomérulée comme le suggèrent des observations immunocytologiques

(VARNDELL et coll., 1984) et des études de liaison à des sites spécifiques (SHIMA et coll., 1984). Les fibres catécholaminergiques ont été impliquées dans le processus de prolifération cellulaire qui contribue à la croissance surrénalienne compensatrice en réponse à la surrénalectomie unilatérale (KLEITMAN et HOLZWARTH, 1985b).

Le but des expériences rapportées dans ce chapitre est :

1°) d'examiner la répartition de l'adrénaline, de la noradrénaline et du NPY entre la zone capsulo-glomérulaire et le reste de la surrénale dont la médulla.

2°) d'étudier les effets in vivo d'une démyélinisation surrénalienne uni- et bilatérale, sur le contenu de la zone capsulo-glomérulaire en catécholamines et NPY afin de préciser quelle est l'origine des fibres catécholaminergiques et/ou NPYergiques présentes dans cette zone.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec F. BERNET, les résultats ont été publiés (F. BERNET, E. MAUBERT et coll., 1991 ; E. MAUBERT et coll., 1993).

## II - MATERIEL ET METHODES

### A - Animaux

Les expériences ont été réalisées sur des rates de souche Wistar (250-300g), non gestantes.

### B - Expériences de démyélinisation

La démyélinisation surrénalienne uni- ou bilatérale, a été pratiquée sous anesthésie à l'éther. La capsule de la glande in situ est incisée, les lèvres de l'incision sont écartées avec des pinces afin d'extirper la médullosurrénale et la couche interne du cortex comprenant les zones fasciculée et réticulée. Une semaine plus tard, ces femelles opérées sont sacrifiées par décapitation ; leur sang est collecté. Les surrénales intactes ou démyélinisées sont prélevées et dégraissées. Les surrénales intactes sont alors démyélinisées pour séparer la zone capsulo-glomérulaire du reste de la glande. Ces deux parties de la surrénale sont pesées, congelées et stockées à -20°C.

### C - Dosages des catécholamines, du NPY, de la corticostérone et de l'aldostérone

#### 1°) Catécholamines

Les tissus décongelés ont été soniqués dans 0,5 à 1 ml de HClO<sub>4</sub> 0,2 M. Les homogénats ont été centrifugés à 22.000 g et à 4°C pendant 20 minutes. Les catécholamines (CA) ont été dosées sur une fraction aliquote des surnageants.

Pour les échantillons plasmatiques, une extraction sur alumine a été réalisée pour purifier et concentrer les catécholamines selon la méthode de MEFFORD et coll. (1983).

Les dosages de CA ont été réalisés par HPLC par Jacqueline BERNARD, technicienne CNRS.

Le protocole exact du dosage a été décrit en détail in F. BERNET, E. MAUBERT et coll. (1991).



## 2°) NPY

### a) Extraction

Pour l'extraction du NPY, les tissus surrénaliens sont broyés au potter Elvehsem dans un volume approprié d'acide acétique 0,5 M maintenu à 0°C dans un bain de glace fondante. Les enzymes protéolytiques sont inactivées en plaçant le broyat tissulaire dans un bain-marie à 70°C pendant 15 min. ; les extraits sont enfin centrifugés 15 min. à 14.000 tours/min. (centrifugeuse Sigma 202 MK). Le surnageant est réparti en fractions aliquotes conservées à -20°C. Le jour du dosage, une fraction est diluée de moitié avec du tampon contenant 1 % de rouge phénol puis neutralisée par NaOH 1N.

### b) Réactifs du dosage

Le NPY a été quantifié par dosage radioimmunologique. Le tampon de dosage est du tampon phosphates 50 mM (solution A :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  : 0,71 g/100 ml ; solution B :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhydre : 0,68 g/100 ml ; mélangées dans les proportions 80 A/20 B) pH 7,4, additionné de BSA (0,3 %) et d'EDTA (10 mM).

Le standard de référence est du NPY<sub>1-36</sub> de rat (Neosystem) ; pour l'établissement de la courbe standard, on a utilisé des quantités croissantes de NPY, de 7,8 à 2000 fmoles (volume final d'incubation : 600  $\mu\text{l}$ ).

Le traceur est du NPY porcin, marqué à l'<sup>125</sup>I (NEX 222, NEN ; Du Pont de Nemours ; radioactivité spécifique 2000 Ci/mmol). La radioactivité totale introduite dans chaque tube est d'environ 10.000 cpm.

L'immunsérum spécifique, gracieusement fourni par le Professeur G. TRAMU (Bordeaux), est fabriqué par le lapin ; il est dirigé contre le NPY porcin couplé à la sérum albumine humaine (HSA) ; il a été couramment utilisé à la dilution finale de 1/4000<sup>ème</sup>. La veille du dosage, les anticorps dilués au 1/10<sup>ème</sup> sont saturés avec de la HSA (0,3 % dans du tampon de dosage).

Les incubations sont réalisées dans des tubes en plastique à fond conique de 5 ml, pendant 72 heures à 4°C.

### c) Séparation

La séparation des complexes NPY/anticorps et du NPY libre, est réalisée dans du tampon phosphates 50 mM, pH 7,4 contenant du charbon activé/Dextran (1,6 g/100 ml, Norit Charcoal, Sigma), de la gélatine (0,2 %) et de l'EDTA (10 mM). On introduit 250 µl de cette suspension maintenue à 4°C sous agitation permanente, dans chaque tube de dosage. Le contenu des tubes est homogénéisé au Vortex puis centrifugé à 3500 tours/min. pendant 10 minutes à 4°C. (Centrifugeuse Jouan K 110 SX). Une fraction du surnageant est prélevée et sa radioactivité mesurée au compteur gamma LKB.

### d) Caractéristiques du dosage

La liaison du Ligand, en absence de compétition, est généralement de l'ordre de 30 %.

Le pourcentage de réaction croisée est de 100 % avec le NPY (rat/homme), de 0,040 % avec la  $\beta$  endorphine, de 0,022 % avec le PHI de rat et de 0,008 % avec la substance P. Par contre le C-PON (humain), le VIP, le peptide YY (porc), le polypeptide pancréatique (rat), la Met-enképhaline, la somatostatine, l'ACTH<sub>1-39</sub> et l'ACTH<sub>1-24</sub>, l'AVP, l'ocytocine et l'angiotensine II n'entrent pas en compétition avec le NPY marqué pour la fixation sur l'anticorps.

La variabilité intra-dosage est de 3,1 % (n=12) et inter-dosage de 12 % (n=17).

## 3°) Corticostérone

### a) extraction

Les tissus surrénaux sont broyés à 4°C, dans un volume approprié de NaCl 0,9 % ; le dosage de la corticostérone s'effectue sur une fraction aliquote, sans extraction préalable, après dilution.

Le dosage de la corticostérone plasmatique a été réalisé après délipidation à l'isooctane et extraction à l'acétate d'éthyle. Ces opérations ont été réalisées dans des tubes de verre de 5 ml, à usage unique.

Pour la délipidation, 50 µl de plasma (dilués de moitié avec 50 µl d'eau distillée) sont mélangés avec 500 µl d'isooctane (Merck). Après agitation vigoureuse, l'ensemble est centrifugé puis placé quelques

minutes à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour mieux séparer les deux phases. La phase inférieure aqueuse étant congelée, la phase supérieure, toujours liquide, est éliminée par aspiration. Après décongélation, la phase aqueuse est soumise à une extraction par 2 ml d'acétate d'éthyle ; après agitation vigoureuse puis centrifugation, le surnageant est recueilli et soumis à une évaporation complète sous courant d'air ou d'azote, à  $37^{\circ}\text{C}$ .

Le résidu sec est remis en suspension dans 150  $\mu\text{l}$  de tampon de dosage.

Le pourcentage de récupération d'une quantité connue d'hormone est supérieur à 95 %.

### b) Réactifs du dosage

Le dosage de la corticostérone s'effectue par radiocompétition.

Le tampon de dosage est du tampon phosphates 0,1 M (solution A :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$  : 1,42 g/100 ml ; solution B :  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhydre : 1,36 g/100 ml ; mélangées dans les proportions 80 A/20 B), pH 7,40, additionné de BSA (0,1 %).

Le standard de référence est de la corticostérone (Sigma) ; pour l'établissement de la courbe standard on a utilisé des quantités croissantes de corticostérone, de 0,25 à 4 ng par tube (volume final d'incubation : 300  $\mu\text{l}$ ).

Le traceur est de la  $[1,2,6,7]^3\text{H}$  corticostérone (Amersham ; radioactivité spécifique : 103 Ci/mmol) stockée à  $-20^{\circ}\text{C}$  dans de l'éthanol absolu. La radioactivité totale introduite dans les tubes est de l'ordre de 10.000 cpm.

La protéine spécifique de liaison de la corticostérone est de la transcortine (CBG) produite au laboratoire. Le plasma de rate surrénalectomisée depuis 8 à 10 jours a été utilisé comme source de CBG. Chaque nouveau lot de plasma est préalablement testé pour déterminer à quelle dilution il doit être utilisé, afin d'obtenir, dans les conditions du dosage, un pourcentage de fixation de l'ordre de 30 %.

Les incubations sont réalisées dans des tubes en plastique à fond conique de 5 ml, pendant 20 minutes à  $37^{\circ}\text{C}$  puis 4 heures à  $4^{\circ}\text{C}$ .

### c) Séparation

La séparation des complexes corticostérone/CBG de la corticostérone libre est réalisée par addition à tous les tubes, de 250  $\mu\text{l}$

de milieu de séparation [tampon de dosage contenant 1 % de Dextran T 70 (Sigma) et 1 % de charbon activé (Norit charcoal, Sigma), homogénéisé toute une nuit à 4°C]. Après agitation au Vortex, décantation 10 minutes à 4°C, les tubes sont centrifugés 30 minutes à 4000 tours/minute (centrifugeuse Jouan K110 SX). On prélève ensuite 300 µl de surnageant (contenant les complexes corticostérone/CBG) que l'on introduit dans des tubes pour le comptage avec 4 ml de liquide scintillant. La radioactivité est mesurée au compteur β (LKB).

#### d) Caractéristiques du dosage

La liaison du ligand en absence de compétition a toujours été supérieure à 30 %.

Le pourcentage de réaction croisée est de 100 % avec la corticostérone, de 23 % avec l'hydrocortisone, de 8 % avec la désoxycorticostérone, de 2,5 % avec la progestérone, de 1,6 % avec la 11 deoxy-17 hydroxycorticostérone, de 1 % avec la 17α hydroxyprogestérone, de 0,5 % avec la 18 hydroxy-deoxycorticostérone et de 0,3 % avec l'aldostérone et la testostérone. Il n'y a pas de réaction croisée avec la pregnénolone, le 17 β oestradiol et la déhydroépiandrostérone (CHATELAIN et CHEONG, 1987).

La variation intra-dosage est de 8,47 % (n = 6) et la variation inter-dosage de 9,48 % (n = 7).

#### 4°) Aldostérone

##### a) Extraction

Le protocole d'extraction de l'aldostérone tissulaire et plasmatique est identique à celui décrit ci-dessus pour la corticostérone.

##### b) Réactifs du dosage

L'aldostérone a été quantifiée par dosage radioimmunologique.

Le tampon de dosage est du tampon borate 0,05 M, pH 7,8, additionné de BSA (0,1 %).

Le tampon borate est préparé en mélangeant 45,75 ml d'une solution d'HCl à 0,05 M [417 µl de HCl à 37 %, d = 1,19 (Prolabo) dans 100 ml d'eau distillée] et 54,25 ml d'une solution de borate de sodium à

0,05 M [1,91 g de disodium tétraborate  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (Prolabo) dans 100 ml d'eau distillée]. Le pH est ajusté à 7,8 au pHmètre avec quelques gouttes de HCl 1 N.

Le standard de référence est de l'aldostérone (Sigma) ; pour l'établissement de la courbe standard, on a utilisé des quantités croissantes d'aldostérone de 4 à 1000 pg par tube (volume final d'incubation : 500  $\mu\text{l}$ ).

Le traceur est de l'aldostérone  $[1,2,6,7]^3\text{H}$  (Amersham ; radioactivité spécifique : 7,8 Ci/mmol), stockée à  $-20^\circ\text{C}$  dans de l'éthanol absolu.

L'immunsérum utilisé est un immunsérum de lapin, anti-aldostérone conjuguée à la BSA (UCB-bioproducts).

Les incubations sont réalisées dans des tubes en plastique à fond conique de 5 ml, pendant 18 heures à  $4^\circ\text{C}$ .

### c) Séparation

La séparation des complexes aldostérone/anticorps de l'aldostérone libre est réalisée selon un protocole identique à celui décrit pour la corticostérone, à ceci près que le tampon utilisé pour la préparation du milieu de séparation est différent.

### d) Caractéristiques du dosage

Le pourcentage de liaison du ligand en absence de compétition est de 29 % (n=25).

Le pourcentage de réaction croisée est de 100 % avec de l'aldostérone, de 0,03 % avec la  $11 \alpha$  hydroxy-progestérone, de 0,0017 % avec la 18 hydroxy-corticostérone, de 0,0002 % avec la deoxycorticostérone, la corticostérone, l'hydrocortisone, le 21 deoxycortisol, la progestérone, la testostérone, de 0,00007 % avec le 11 deoxycortisol et moins de 0,00001 % avec la pregnénolone, la 17 hydroxyprogestérone et la dehydroépiandrosterone.

La variabilité intra-dosage est de 5,06 % (n = 11) et inter-dosage de 10,26 % (n = 7).

### III - RESULTATS

#### A - Stéroïdes surrénaliens et plasmatiques

Dans la surrénale intacte, plus de 73 % du contenu total en *aldostérone* ( $19,60 \pm 1,91$  ng/glande) sont présents dans la partie capsulo-glomérulaire tandis que plus de 70 % du contenu total en *corticostérone* ( $1,24 \pm 0,24$  µg/glande) sont localisés dans le reste de la glande (figure 2-1).

Dans la zone capsulo-glomérulaire d'une surrénale déméduillée in situ depuis une semaine, les taux d'*aldostérone* et de *corticostérone* sont significativement réduits par rapport à ceux observés dans la zone correspondante de la surrénale contralatérale intacte ( $p < 0,001$ ) (figure 2-1).

L'aldostéronémie et la corticostéronémie ne varient pas significativement au cours du cycle oestrien (F. BERNET, E. MAUBERT et coll., 1991) aussi le sang des rates a-t-il été prélevé indépendamment du stade du cycle oestrien.

Chez les animaux qui ont subi une démédullation bilatérale, l'*aldostéronémie* et la *corticostéronémie* sont légèrement mais non significativement réduites par rapport aux témoins ( $P > 0,05$ ) (figure 2-2).

#### B - Catécholamines (CA) surrénaliennes et plasmatiques

##### 1°) Effets de la démédullation unilatérale

Le contenu en A et NA de la zone capsulo-glomérulaire et de la médulla ne variant pas significativement au cours du cycle oestrien des rates (F. BERNET, E. MAUBERT et coll., 1991), les résultats présentés concernent des échantillons poolés sans tenir compte du stade du cycle oestrien au moment de l'opération et/ou du sacrifice.

Dans la surrénale intacte des rates opérées, le contenu de la zone capsulo-glomérulaire en CA (figure 2-3A) et la concentration en CA (figure 2-3B) ne sont pas significativement différents de ceux observés dans cette même région de la surrénale de témoins (rates non opérées) ( $p > 0,05$ ). Par ailleurs, le poids de la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale de rates opérées, n'est pas significativement différent de celui des témoins ( $13,96 \pm 1,31$  mg,  $n = 13$  versus  $11,50 \pm 0,66$  mg,  $n = 24$  ;  $p > 0,05$ ).



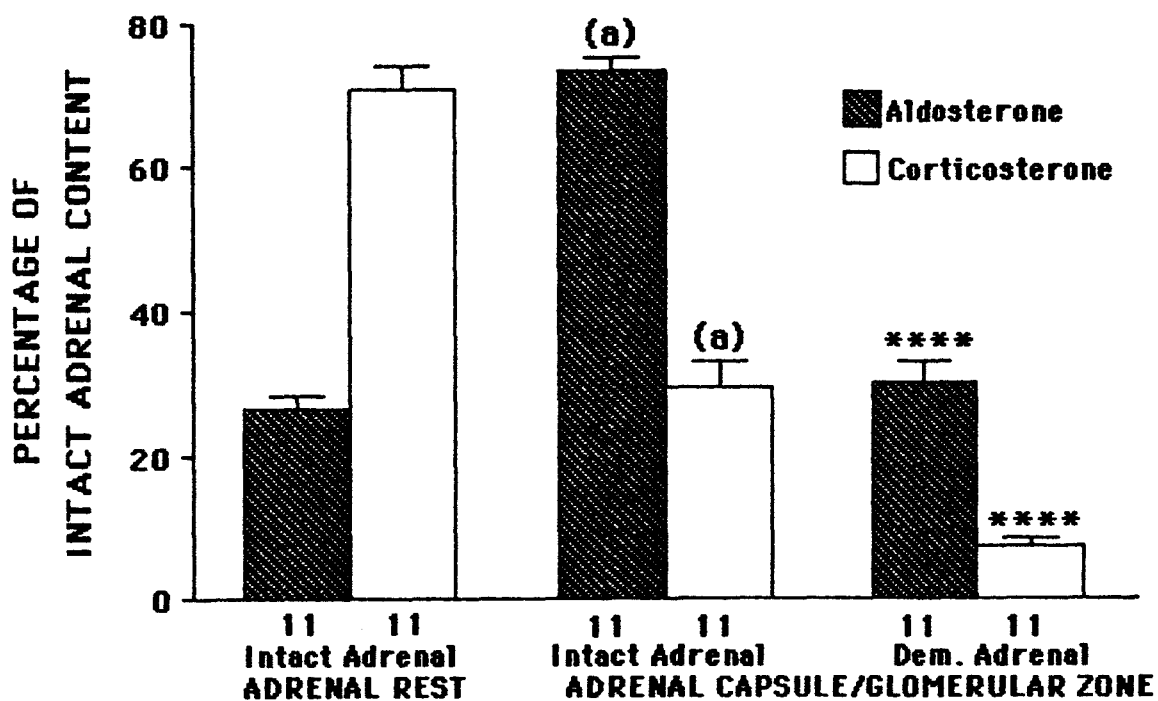


Figure 2-1

Répartition, en pourcentage, de l'aldostérone et de la corticostérone entre la zone capsulo-glomérulaire (*adrenal capsule/glomerular zone*) et le reste de la surrénale (*adrenal rest*) comprenant la médulla et la zone fasciculo-réticulée ; on a pris comme référence (100 %) le contenu hormonal de la surrénale intacte (*Intact adrenal*) de la femelle unidémédullée.

*Dem. adrenal* = surrénale contralatérale déméduillée.

- Moyennes  $\pm$  SEM.
- Nombre de cas indiqué à la base de chaque colonne.
- Comparaison des moyennes.

(a) :  $p < 0,001$  zone capsulo/glomérulaire versus reste de la surrénale.

\*\*\*\* :  $p < 0,001$  surrénale déméduillée versus surrénale intacte.

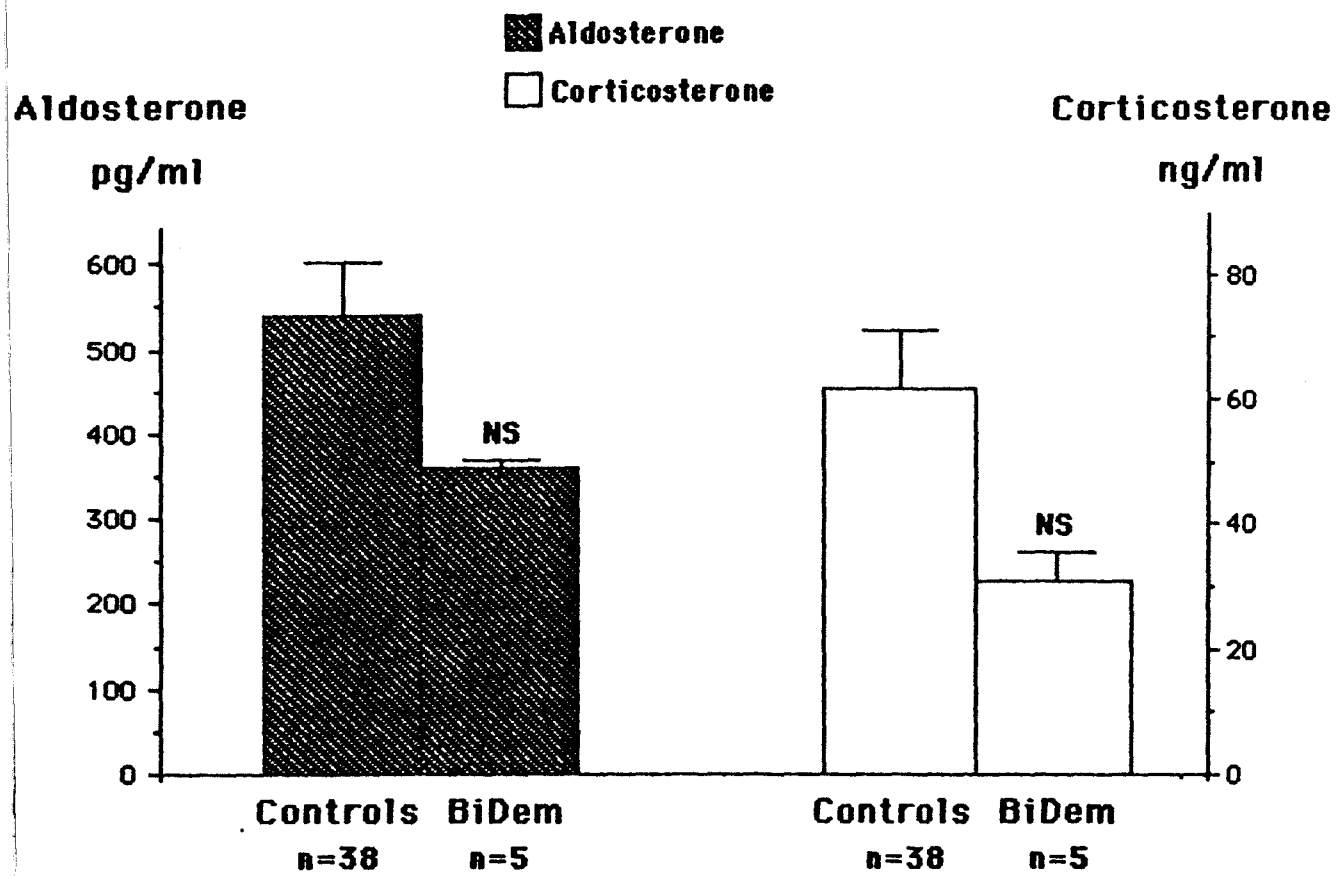


Figure 2-2

Aldostéronémie et corticostéronémie chez les rates indemnes (*controls*) et les rates ayant subi une démyélinisation bilatérale (*Bi Dem*).

- Moyennes  $\pm$  SEM.
- NS :  $p > 0,05$  femelles bidémédullées versus femelles indemnes.

Dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale déméduillée, le contenu en A (figure 2-3A) et la concentration (figure 2-3B) sont significativement réduits par rapport à ce qu'ils sont dans cette même région de la surrénale contralatérale intacte. Le contenu en NA n'est pas significativement affecté par la déméduillation (figure 2-3A) ; par contre la concentration en NA est significativement diminuée (figure 2-3B).

Le poids de cette partie de la surrénale est significativement plus élevé pour la glande déméduillée que pour la glande contralatérale intacte ( $27,31 \pm 3,21$  mg ;  $n = 12$  versus  $13,96 \pm 1,31$  mg,  $n = 13$  ;  $p < 0,02$ ).

Dans le reste de la surrénale intacte comprenant en particulier la médulla, les contenus en A et NA sont semblables à ce qu'ils sont chez les témoins (rates non opérées) (figure 2-4A). Les concentrations en A et NA sont néanmoins réduites (différence significative seulement pour l'adrénaline) (figure 2-4B).

Le poids de cette partie de la surrénale est significativement plus élevé pour la glande intacte de femelles opérées que pour celle des témoins (rates non opérées) ( $39,23 \pm 3,24$  mg,  $n = 14$  versus  $27,06 \pm 0,83$  mg,  $n = 24$  ;  $p < 0,001$ ).

Les taux plasmatiques de catécholamines ne sont pas significativement affectés par la déméduillation unilatérale (figure 2-5).

## 2°) Effets de la déméduillation bilatérale

Les contenus en A et NA (figure 2-3A) aussi bien que les concentrations (figure 2-3B) de la zone capsulo-glomérulaire des surrénales déméduillées bilatéralement, ne diffèrent pas significativement de ce qu'ils sont dans le cas d'une déméduillation unilatérale.

Nous n'avons pas remarqué de différence quant à l'adrénaline et la noradrénaline en fonction de la position (droite ou gauche) de la surrénale déméduillée.

Le poids de la zone capsulo-glomérulaire de surrénales déméduillées bilatéralement, est semblable à celui de la zone correspondante de surrénales déméduillées unilatéralement ( $29,98 \pm 1,66$  mg,  $n = 16$  versus  $27,31 \pm 3,21$  mg,  $n = 12$  ;  $p > 0,05$ ).

La déméduillation bilatérale s'accompagne d'une disparition presque complète de l'adrénaline dans la circulation et d'une réduction significative, de l'ordre de 50 % de la noradrénaline circulante (figure 2-5).

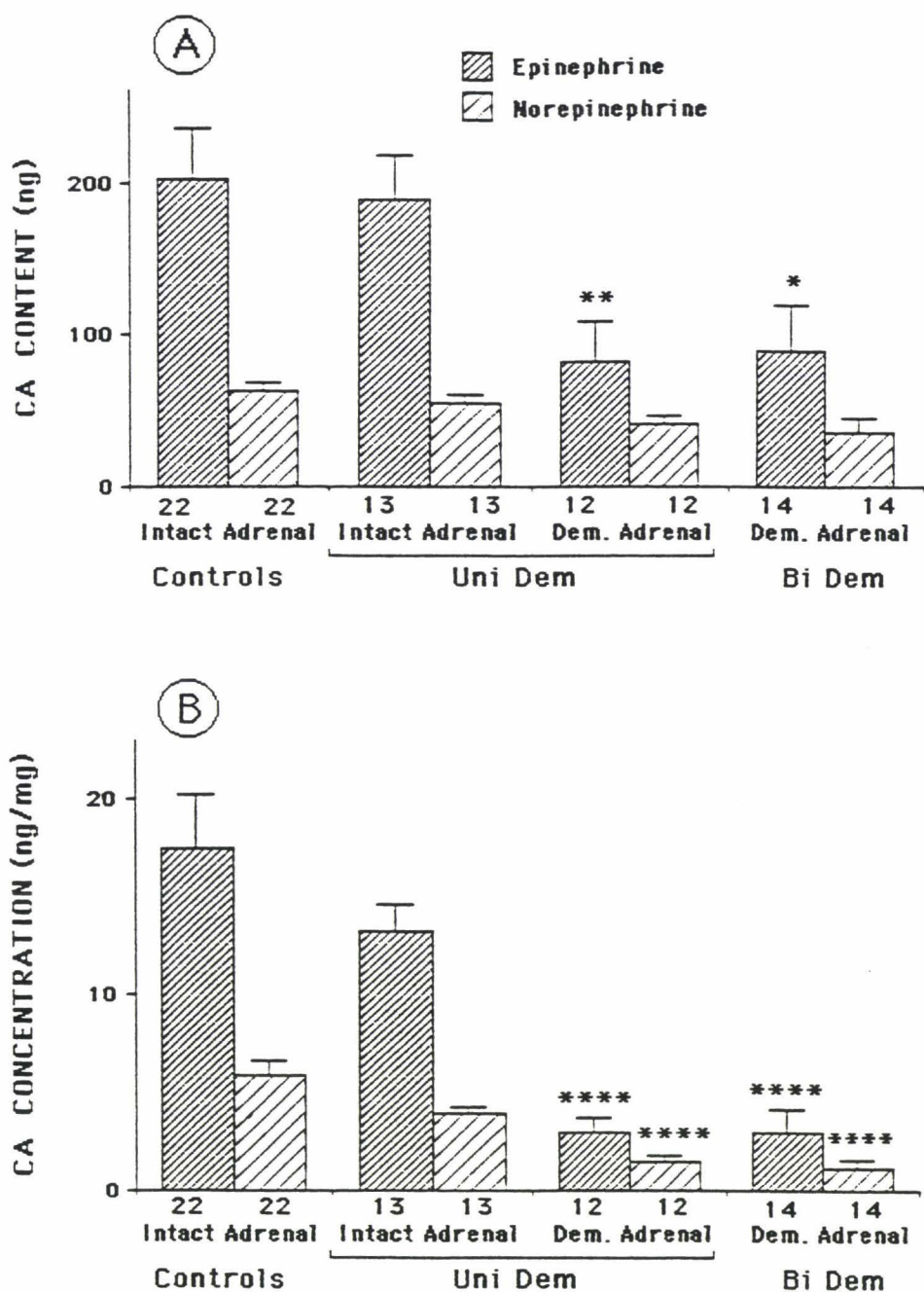


Figure 2-3

Contenu (A) et concentration (B) en catécholamines (CA ; adrénaline = *epinephrine* ; noradrénaline : *norépinéphrine*) dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale de rates indemnes (*controls*) et de rates opérées ayant subi une démyélinisation unilatérale (*Uni Dem*) ou bilatérale (*Bi Dem*).

- *Intact adrenal* = surrénale intacte.
- *Dem. adrenal* = surrénale contralatérale démyélinisée.
- Moyennes  $\pm$  SEM.
- Nombre de cas indiqué à la base de chaque colonne.

Comparaison des moyennes :

Surrénale démyélinisée versus surrénale intacte : \*  $p < 0,05$

\*\*  $p < 0,02$  \*\*\*\*  $p < 0,001$ .

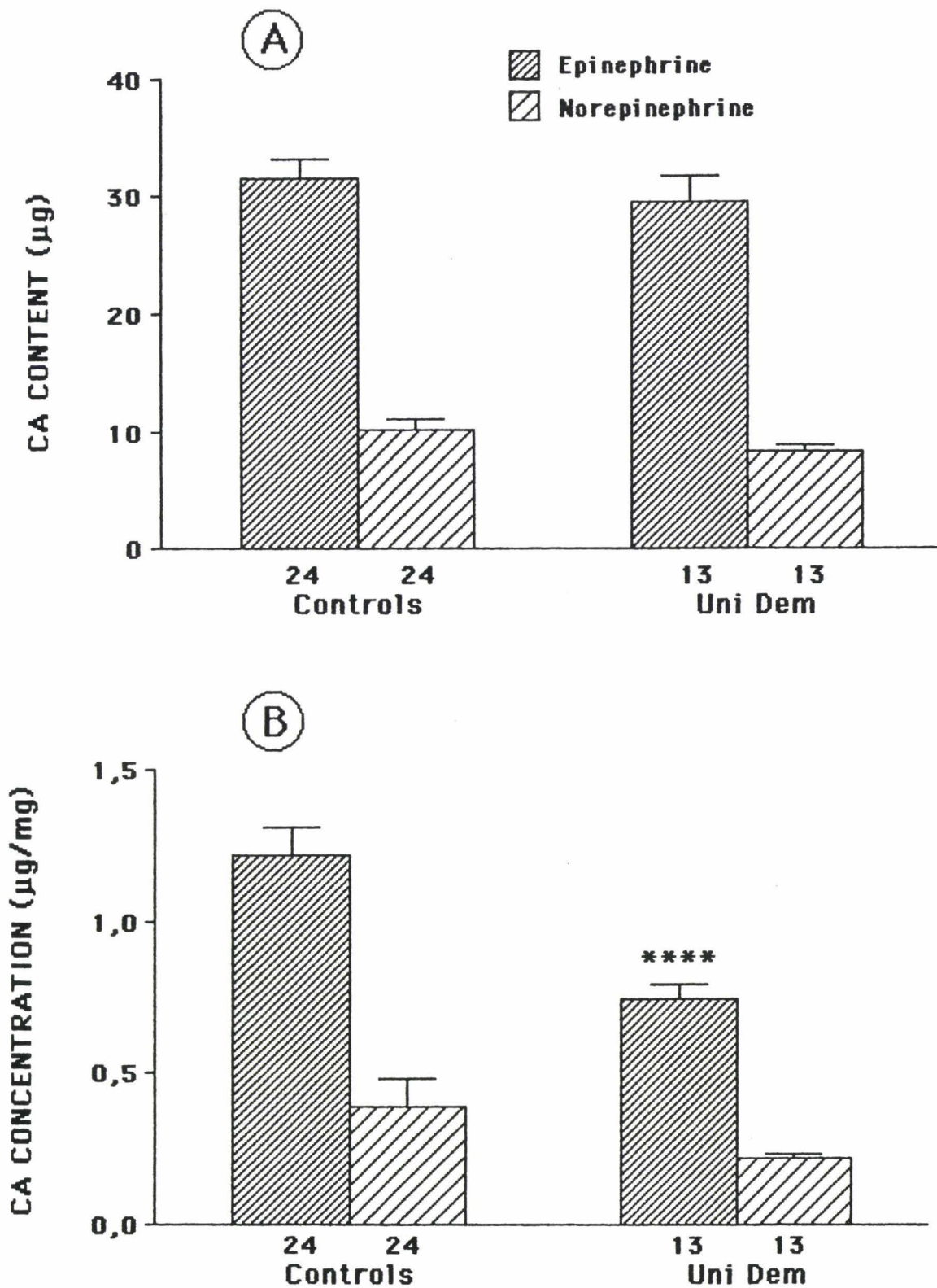


Figure 2-4

Contenu (A) et concentration (B) en catécholamines (CA ; adrénaline = *epinephrine* ; noradrénaline : *norepinephrine*) dans le reste de la surrénale (médulla + cortex interne comprenant la zone fasciculoréticulée) chez les rates, indemnes (*controls*) et les rates ayant subi une démyélination unilatérale (*Uni Dem*).

- Moyennes  $\pm$  SEM.

- Nombre de cas indiqué à la base de chaque colonne.

- Comparaison des moyennes :

\*\*\*\*  $p < 0,001$  femelles opérées versus femelles indemnes.

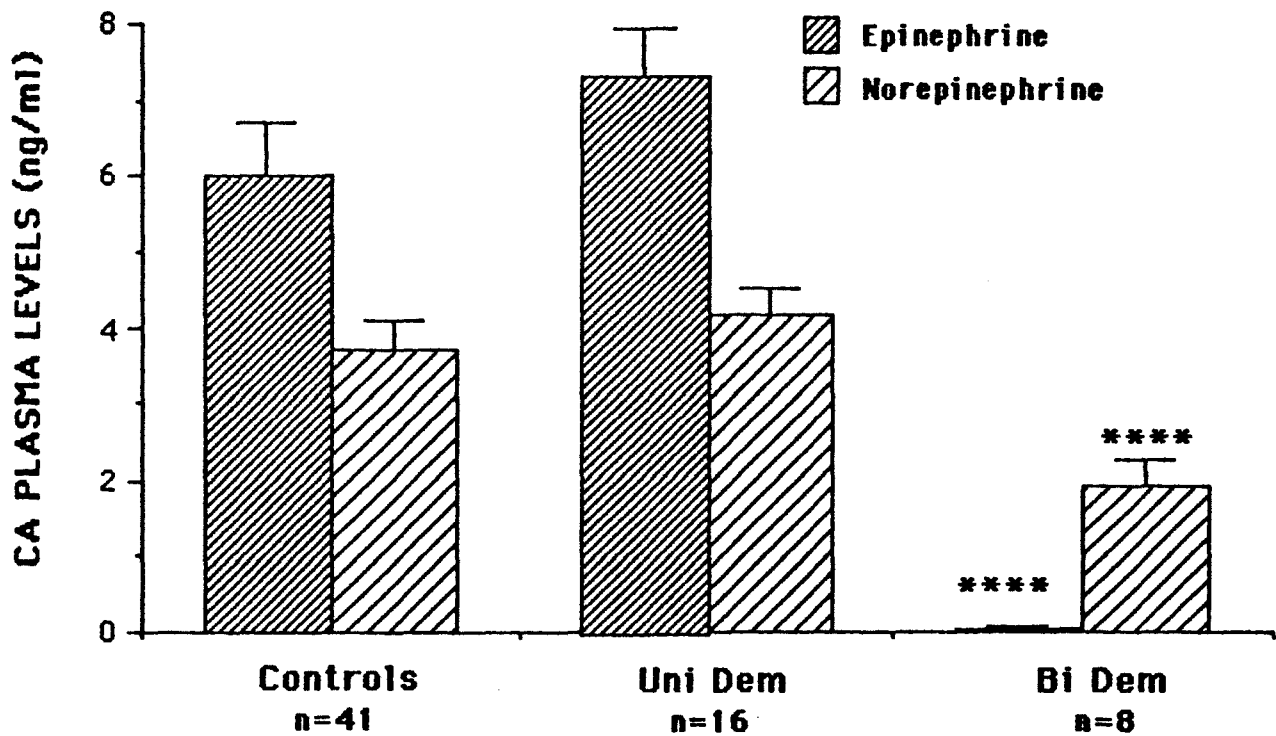


Figure 2-5

Teneur du plasma en catécholamines (CA ; adrénaline : *epinephrine* ; noradrénaline : *norepinephrine*) chez les rates indemnes (*controls*) et les rates opérées (démédullation unilatérale : *Uni Dem*, ou bilatérale : *Bi Dem*).

- Moyennes  $\pm$  SEM.
- Nombre de cas indiqué à la base de chaque colonne.
- Comparaison des moyennes :  
 \*\*\*\*  $p < 0,001$  femelles démédullées versus femelles unidémédullées ou indemnes.



### C - NPY surrénalien

Chez les femelles indemnes, la zone "capsulo-glomérulaire" contient environ, en valeur absolue, 6 à 7 fois moins de NPY que la zone "médullaire" ou en concentration environ 3 fois moins (figure 2-6A,B).

Dans la surrénale intacte de femelles opérées (unilatéralement déméduillées), la répartition du NPY n'est pas significativement différente ( $p > 0,05$ ) de celle observée dans la surrénale de femelles indemnes, pour la zone "capsulo-glomérulaire". En ce qui concerne la zone "médullaire" qui comprend, outre la médulla proprement dite, la zone fasciculo-réticulée, le contenu en NPY mais non la concentration (en raison d'un accroissement pondéral) est augmenté pour la surrénale contralatérale non opérée (figure 2-6A).

Le contenu et la concentration en NPY de la zone capsulo-glomérulaire de surrénales déméduillées in situ, sont significativement réduits par rapport à ceux de la même zone de surrénales intactes contralatérales (figure 2-6A, B).

Cette observation est confortée par les données immunohistologiques. En effet, la distribution des fibres NPYergiques de la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale intacte de femelle opérée (figure 2-7A) est semblable à celle observée dans la partie correspondante à la surrénale de femelle intacte (non montré). Dans la surrénale déméduillée, les fibres NPYergiques ne sont pas aussi régulièrement réparties ; elles sont observées dans certaines régions mais pas dans d'autres (figure 2-7B). Par ailleurs, les fibres NPYergiques paraissent plus fines dans la surrénale déméduillée.

L'examen de quelques surrénales déméduillées depuis plus longtemps (1 mois et 4 mois) montre toujours l'existence de fibres NPYergiques dans la zone capsulo-glomérulaire. Ces fibres sont par ailleurs plus nombreuses et distribuées plus uniformément qu'après une semaine post-opératoire.

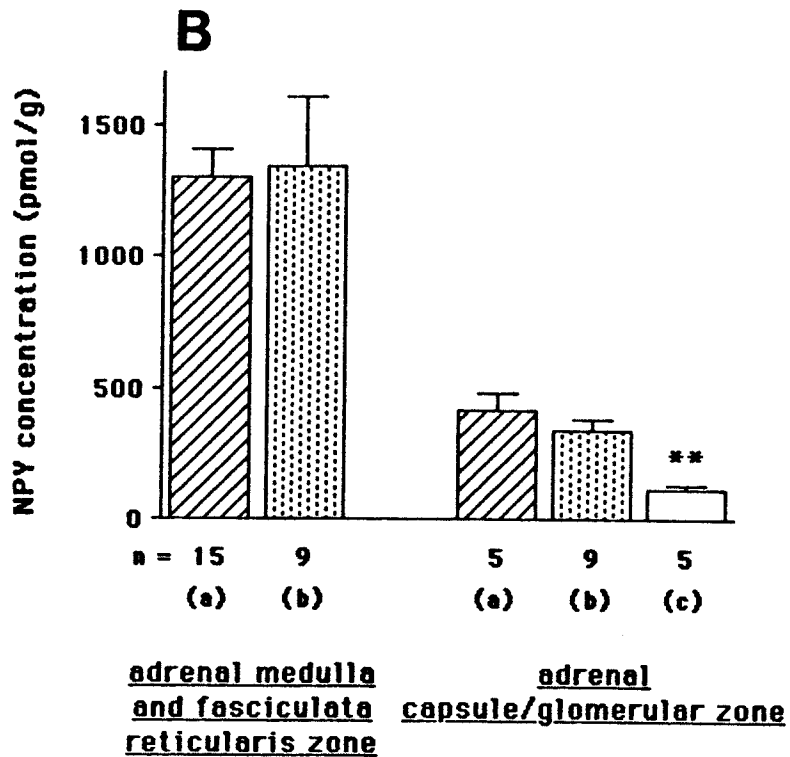
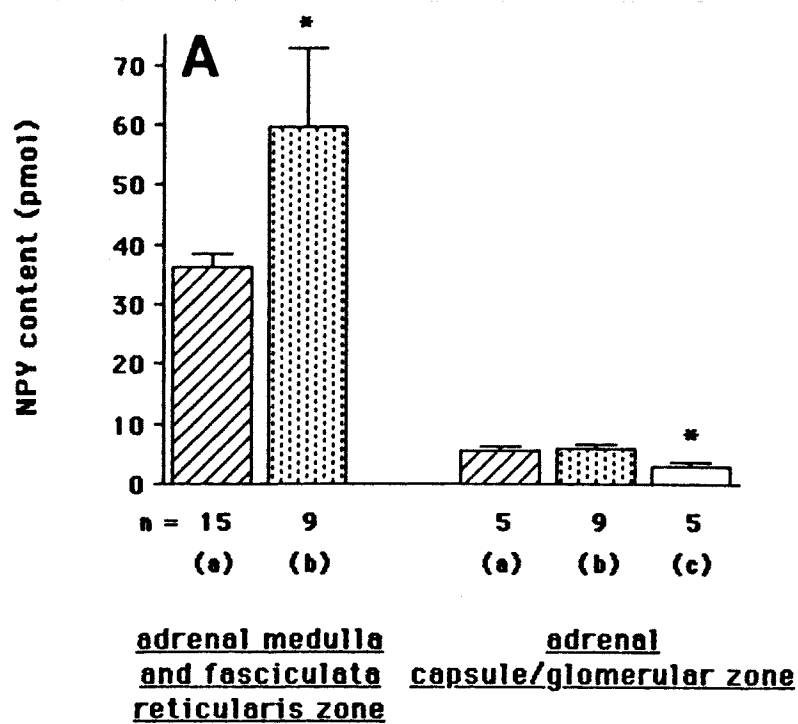


Figure 2-6

Contenus (A) et concentrations (B) en NPY dans la zone médullaire et la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale de rates indemnes ou opérées

- (a) femelle indemne
- (b) femelle opérée, surrénale intacte
- (c) femelle opérée, surrénale démédullée.

- Moyennes  $\pm$  SEM.

- n = nombre de cas

- Comparaison des moyennes : (c) versus (b) pour la zone capsulo-glomérulaire (\*  $p < 0,05$ ) (\*\*  $p < 0,01$ ).

(b) versus (a) pour la zone médullaire (\*  $p < 0,05$ ).

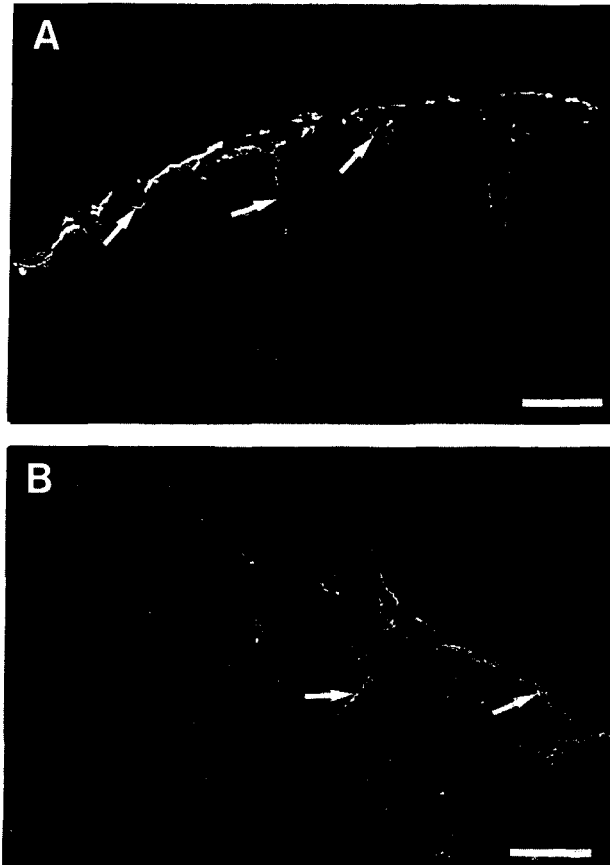


Figure 2-7

Distribution des fibres immunoréactives NPY-ergiques (flèches) dans la zone capsulo-glomérulaire d'une surrénale intacte de rate opérée (A) et dans la partie correspondante d'une surrénale démyélinisée depuis une semaine (B).

A-les fibres NPY-ergiques s'étendent horizontalement dans la région sub-capsulaire et radialement dans la zone plus profonde du cortex, étroitement associées avec la vascularisation.

B-les fibres NPY-ergiques sont présentes à la fois dans la zone sub-capsulaire et dans la zone plus profonde du cortex en régénération.

La barre horizontale de calibrage = 50  $\mu\text{m}$ .

#### IV - DISCUSSION

La partie la plus externe de la surrénale intacte, fraîchement déméduillée, contient plus de 70 % du contenu total de la glande en aldostérone ; on peut donc en conclure qu'elle comprend principalement la capsule et la majeure partie de la zone glomérulée où s'effectue la biosynthèse de ce minéralocorticoïde.

La zone capsulo-glomérulaire contient à la fois de l'adrénaline (A) et de la noradrénaline (NA) à des concentrations comparables à celles signalées par PRATT et coll. (1987), également chez des rates.

Chez le mâle adulte, de souche Sprague-Dawley, les concentrations en A et NA rapportées par Mc CARTY et coll. (1984) sont plus élevées que celles publiées par BUU et LUSSIER (1990) pour des animaux pourtant de même souche. Nos valeurs sont intermédiaires entre celles rapportées par ces deux derniers groupes d'auteurs.

L'existence de catécholamines dans le cortex surrénalien a aussi été signalée chez les bovins (RACZ et coll., 1983). Nos observations suggèrent que l'histofluorescence catécholaminergique qui se manifeste dans la zone glomérulée du cortex surrénalien de rat (KLEITMAN et HOLZWARTH, 1985a) doit être attribuée à la présence d'adrénaline et de noradrénaline. Ces données sont également compatibles avec l'existence d'un réseau de fibres nerveuses catécholaminergiques associées à la vascularisation de la région superficielle de la surrénale de rat (KLEITMAN et HOLZWARTH, 1985a). Toujours dans cette région, les fibres nerveuses variqueuses, révélées par immunohistologie grâce à des anticorps anti-tyrosine hydroxylase, sont souvent étroitement associées avec des cellules corticales (OOMORI et coll., 1989).

BUU et LUSSIER (1990) sont néanmoins d'un avis différent ; selon eux l'activité tyrosine-hydroxylase est probablement absente du cortex surrénalien puisque, après administration de tyrosine, une augmentation de dopamine (DA) n'est observée que dans la médulla.

De leur côté, GALLO-PAYET et coll. (1987) ont décrit, en microscopie photonique et électronique, des rangées de cellules "chromaffines" s'étendant à travers tout le cortex, jusque dans la zone capsulaire, chez des rats de trois souches (Sprague-Dawley, Fisher et Long Evans).

Des contacts entre cellules corticales et cellules chromaffines en situation ectopique ont été également décrits par BORNSTEIN et coll. (1991).



Dans la surrénale de nos animaux de souche Wistar, il paraît exister une nette ligne de démarcation entre la médulla et le cortex, conforme à la description faite par TISCHLER et DE LELLIS (1988). Toutefois, à d'assez rares occasions, nous avons effectivement observé dans le cortex, quelques cellules chromaffines dûment identifiées par immunocytochimie. Nous n'avons pas fait d'étude exhaustive pour rechercher avec quelle fréquence du tissu chromaffine s'immisce parmi les cellules du tissu stéroïdogénique.

Sur la base de ces données histologiques, la présence d'adrénaline et de noradrénaline dans la zone capsulo-glomérulaire peut être en partie attribuée à une colonisation de cette zone corticale par quelques cellules chromaffines mais aussi à une authentique innervation catécholaminergique de cette région externe de la surrénale.

Dans les (ou certaines) veines de la surrénale, le flux sanguin pourrait être dirigé dans un sens centrifuge c.à.d. de la médulla vers le cortex périphérique ; s'il en est bien ainsi, la circulation du sang pourrait permettre aux catécholamines, donc à l'adrénaline, d'atteindre le parenchyme cortical (GONZALO-SANZ et INSAUSTI, 1976).

A l'appui de cette hypothèse on peut mentionner l'existence, dans le cortex surrénalien, d'un gradient de concentration pour les catécholamines qui pourrait être le signe d'une diffusion centrifuge à partir de la médulla (in LÉBOULENGER et coll., 1984, d'après une communication personnelle de De LEAN).

Selon nos propres observations, la déméduation unilatérale tout comme la déméduation bilatérale réduit significativement le contenu et la concentration d'adrénaline dans la zone externe de la surrénale. La diminution de la concentration en A doit être amplifiée par la forte augmentation du poids de la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale déméduée.

Cet accroissement pondéral doit être lié, en partie, au développement du tissu fibreux en période post-opératoire et, en partie, à une régénération du cortex surrénalien, amputé d'une grande quantité des cellules stéroïdiennes lors de l'exérèse de la médulla. Suite à ces observations, on peut émettre l'hypothèse qu'une partie de l'adrénaline présente dans la zone externe de la surrénale pourrait avoir une origine médullaire via la circulation centrifuge et/ou la colonisation corticale par des cellules chromaffines. Par ailleurs, la déméduation bilatérale, qui entraîne la disparition quasi totale de l'adrénaline circulante, n'affecte pas davantage que la déméduation unilatérale, le contenu en A de la

zone externe de la corticosurrénale. Ceci suggère que l'adrénaline encore présente dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale déméduillée ne doit pas provenir d'une capture d'adrénaline circulante dans le plasma périphérique mais doit être associée à des terminaisons nerveuses d'origine extra-surrénalienne. Cette hypothèse n'a pas encore pu être étayée par des observations immunohistologiques dans la mesure où une activité PNMT n'a pas été mise en évidence dans le cortex surrénalien du rat (HOLZWARTH et BROWNFELD, 1983), à moins que cette activité soit trop faible localement pour être décelable.

La déméduillation unilatérale ou bilatérale ne réduit pas le contenu de la zone capsulo-glomérulaire en noradrénaline. Toutefois, la réduction de la concentration en NA est artificiellement amplifiée et à mettre en relation avec l'augmentation pondérale de cette partie de la glande opérée. Ces observations sont en accord avec celles de HOLZWARTH et coll. rapportées par KLEITMAN et HOLZWARTH (1985b) relatives à la présence de fibres catécholaminergiques malgré l'absence de médulla, dans le cortex surrénalien en régénération.

La chute du contenu en aldostérone et en corticostérone dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale déméduillée, même si elle n'est pas significative, pourrait être liée à une déficience locale d'hormones trophiques et stéroïdogéniques, induite par le traumatisme chirurgical et la perturbation vraisemblable de la circulation locale. Il existe toutefois une autre alternative susceptible de rendre compte de la réduction du contenu de la zone capsulo-glomérulaire en aldostérone et en corticostérone, ainsi que de la chute légère de l'aldostéronémie et de la corticostéronémie après déméduillation. En effet, ces conséquences hormonales de l'exérèse médullosurrénalienne pourraient être dues au fait que la production de stéroïdes corticaux et, à un degré moindre leur sécrétion, sont tributaires d'une régulation multifactorielle à laquelle peuvent participer des substances originaires de la médulla. Il existe en effet des arguments expérimentaux en faveur d'une influence de la médullosurrénale sur la sécrétion de glucocorticoïdes et de minéralocorticoïdes (revues in HINSON, 1990, CHARLTON, 1990) ; par ailleurs le nerf splanchnique pourrait moduler la libération de corticostéroïdes par le biais d'effets paracrines exercés par les cellules chromaffines et/ou peut-être, par le biais de fibres nerveuses intra-surrénaliennes (BORNSTEIN et coll., 1990).

La médulla de la surrénale intacte de rats qui ont subi une déméduillation unilatérale, contient autant d'adrénaline que celle des



animaux indemnes. Puisque la démyélinisation bilatérale ne réduit pas significativement la corticostéronémie, on peut penser qu'il en est de même chez les femelles ayant subi une démyélinisation unilatérale ; dans la mesure où l'activité PNMT est étroitement dépendante de la présence de glucocorticoïdes (WURTMAN et AXELROD, 1966 ; MARGOLIS et coll., 1966), l'activité PNMT doit être normale dans la médulla de la surrénale contralatérale de la rate opérée. Il n'est donc pas étonnant d'observer un contenu normal en adrénaline dans cette partie de la surrénale non démyélinisée. Par contre, la réduction des concentrations en A et NA dans cette médulla peut n'être que la conséquence directe et passive de l'accroissement pondéral.

Nos données expérimentales suggèrent une origine extra-surrénalienne de l'innervation noradrénergique du cortex surrénalien ; quant à l'adrénaline présente dans la zone capsulo-surrénalienne, elle pourrait provenir en partie de la médullosurrénale, peut-être via les cellules chromaffines ectopiques localisées dans le cortex, et en partie d'un site extra-surrénalien.

La démyélinisation réduit également la concentration de NPY dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale ; cet effet est, comme pour les catécholamines, amplifié par l'accroissement pondéral de cette partie de la glande démyélinisée. Il y a néanmoins une réduction du contenu en NPY dans cette zone superficielle du cortex associée à la présence de fibres NPYergiques plus irrégulièrement distribuées et apparemment plus fines. Ces fibres pourraient être des fibres en croissance associées à un cortex en régénération après la démyélinisation. On peut donc en conclure que le NPY de la zone capsulo-glomérulaire a une double origine, médullaire et extra-surrénalienne.

## CHAPITRE III

### Chapitre 3

**Récepteurs surrénaliens au NPY.  
Effets stéroïdogéniques du NPY, du PYY et du VIP sur la  
zone capsulo-glomérulaire.**



## Chapitre 3

### Récepteurs surrénaliens au NPY. Effets stéroïdogéniques du NPY, du PYY et du VIP sur la zone capsulo-glomérulaire

<b>I - INTRODUCTION</b>		p 141
<b>II - MATERIEL ET METHODES</b>		p 145
A - Animaux		p 145
B - Prélèvement des zones capsulo-glomérulaires et préparation des membranes pour les études de liaison		p 145
1°) Prélèvements		—
2°) Préparation des membranes surrénaliennes		—
3°) Liaison du NPY aux membranes		p 146
C - Incubations et périfusions de zones capsulo-glomérulaires intactes		p 147
1°) Incubations statiques		p 147
a) Protocole expérimental		—
b) Dosages de l'aldostérone et de la corticostérone		—
2°) Périfusions		p 148
D - Incubation de cellules capsulo-glomérulaires isolées		p 149
1°) Isolement des cellules par la collagénase et la DNase		—
2°) Incubation des cellules isolées		—
3°) Dosage de l'aldostérone		p 150
<b>III - RESULTATS</b>		p 151
A - Sites de liaison membranaire du NPY dans la zone capsulo- glomérulaire		p 151
B - Effets du VIP, du NPY et du PYY sur la sécrétion d'aldostérone		p 152
1°) Incubation statique de zones capsulo-glomérulaires		—
2°) Périfusion de zones capsulo-glomérulaires		—
3°) Incubation statique de cellules isolées		p 153
C - Effets du VIP, du NPY et du PYY sur la sécrétion de corticostérone		p 153
<b>IV - DISCUSSION</b>		p 154

## Chapitre 3

### Récepteurs surrenaliens au NPY. Effets stéroïdogéniques du NPY, du PYY et du VIP sur la zone capsulo-glomérulaire

#### I - INTRODUCTION

La sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée de la surrénale est sous contrôle multifactoriel ; les facteurs sécrétagogues majeurs comprennent l'angiotensine II (AII), l'ACTH, le potassium, la vasopressine, l'adrénaline et la noradrénaline tandis que, parmi les inhibiteurs, on note le facteur natriurétique atrial, la dopamine et la somatostatine (revue in QUINN, 1988). D'autres neuropeptides et/ou neurotransmetteurs peuvent participer à la régulation de la sécrétion d'aldostérone (revue in HINSON, 1990).

En effet, la zone glomérulée est richement innervée (cf. chapitre 1). Des fibres nerveuses, révélées par immunohistologie, contenant du peptide intestinal vasoactif (VIP) et du neuropeptide Y (NPY), de même que des fibres catécholaminergiques, révélées par histofluorescence, se répartissent dans la capsule surrenalienne et la zone glomérulée de plusieurs espèces dont le rat (HOLZWARTH et coll., 1987). Par des méthodes immunohistochimiques, nous avons observé (MAUBERT et coll., 1990) qu'il existe au moins deux populations de fibres nerveuses variées à VIP dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale de rat ; la plus importante est à la fois VIPergique et NPYergique alors que l'autre, peu importante, n'est pas NPYergique. Dans la partie superficielle du cortex, les fibres nerveuses à VIP/NPY, sont souvent associées à la vascularisation capsulaire ou subcapsulaire et envahissent la zone glomérulée. Il est très vraisemblable que, dans le cortex surrenalien de rat, les fibres à VIP/NPY sont également catécholaminergiques ; elles pourraient provenir de ganglions extra-surrenaliens dont le ganglion supraréal (KESSE et coll., 1988). De la noradrénaline et de l'adrénaline sont présentes dans la zone capsulo-glomérulaire (BERNET et coll., 1991).

Nos données expérimentales (démédullations *in vivo* ; cf. chapitre 2) suggèrent une origine extra-surrénalienne de l'innervation noradrénergique du cortex surrénalien et une origine double pour l'adrénaline ; une partie proviendrait du tissu chromaffine surrénalien et une autre d'un site extra-surrénalien (BERNET et coll., 1991). L'existence d'adrénaline et de noradrénaline dans la zone capsulo-glomérulaire pourrait être due également à la présence de quelques cellules chromaffines, identifiées par microscopie photonique et électronique, dans le cortex surrénalien du rat et particulièrement dans la zone glomérulée (GALLO-PAYET et coll., 1987 ; BORNSTEIN et coll., 1991).

Le rôle du VIP et du NPY dans la régulation neuroendocrinienne de la zone glomérulée a été recherché par de nombreux auteurs mais les données expérimentales sont souvent contradictoires selon que les études ont été faites *in vivo* ou *in vitro* et selon le type de préparation utilisé (cellules surrénaliennes isolées ou zone capsulo-glomérulaire isolée).

Par autoradiographie, CUNNINGHAM et HOLZWARTH (1989) ont mis en évidence une liaison spécifique de VIP marqué à l'iode 125, au niveau de la capsule et de la zone glomérulée de la surrénale de rat.

Des études *in vivo* ont montré que le VIP stimule la croissance de la zone glomérulée et/ou la sécrétion d'aldostérone, aussi bien chez le rat (MAZZOCCHI et coll., 1987 ; NUSSDORFER et MAZZOCCHI, 1987 ; HINSON et coll., 1992) que chez le porc (EHRHART-BORNSTEIN et coll., 1991).

*In vitro*, le VIP stimule la sécrétion d'aldostérone par des préparations capsulo-glomérulaires intactes, en périfusion ou en incubation statique (CUNNINGHAM et HOLZWARTH, 1988 ; HINSON et coll., 1992) mais n'a pas d'effet sur la production d'aldostérone par des cellules isolées de zone glomérulée (ENYEDI et coll., 1983 ; HINSON et coll., 1992).

Le VIP stimule la libération de catécholamines par la surrénale de rat (MALHOTRA et WAKADE, 1987) et d'adrénaline mais non de noradrénaline par du tissu capsulo-glomérulaire isolé (HINSON et coll., 1992). Une partie significative des effets du VIP sur la production d'aldostérone pourrait être due à une libération locale d'adrénaline (HINSON et coll., 1992) agissant via des récepteurs  $\beta$  adrénergiques, caractérisés dans le cortex surrénalien de rat (SHIMA et coll., 1984).

Il existe pareillement d'importantes contradictions quant aux effets potentiels du NPY sur le cortex surrénalien de rat. Des sites de liaison spécifique du NPY ont été mis en évidence au niveau de cellules



glomérulées de bovins (TORDA et coll., 1988) et, selon REBUFFAT et coll. (1988), des études autoradiographiques "paraissent suggérer l'existence de récepteurs au NPY au niveau de cellules de la zone glomérulée de rat".

*In vivo*, l'administration prolongée de NPY à des rats provoque une hypertrophie de la zone glomérulée et une élévation significative de l'aldostéronémie, aussi bien à l'état basal qu'après stimulation par l'AJI (REBUFFAT et coll., 1988). Par ailleurs, en traitement aigu, le NPY accroît l'aldostéronémie chez le rat (MAZZOCCHI et NUSSDORFER, 1987). D'autres résultats expérimentaux sont contradictoires ; ainsi, un traitement prolongé de rats avec de plus faibles doses de NPY, réduit l'aldostéronémie (LESNIEWSKA et coll., 1990).

*In vitro*, le NPY, à la concentration de  $10^{-6}$ M, est capable d'inhiber partiellement la libération d'aldostérone et de 18 hydroxycorticostérone par des cellules isolées de zone glomérulée de rat, aussi bien à l'état basal qu'après stimulation par l'ACTH (NERI et coll., 1990). Au contraire, selon LESNIEWSKA et coll. (1990), le NPY à la concentration de  $10^{-6}$ M mais non à des concentrations plus faibles ( $10^{-7}$  ou  $10^{-8}$ M), augmente la sécrétion stéroïdienne de base par des cellules glomérulées isolées.

Il existe plusieurs classes de récepteurs au NPY. En effet, des fragments C-terminaux du NPY sont de puissants agonistes du NPY sur certains systèmes biologiques mais ont peu ou pas d'effets sur d'autres (revue in MICHEL et coll., 1990). Sur la base de ces relations structure-fonction biologique, l'existence de plusieurs types de récepteurs au NPY a été postulée (WAHLESTEDT et coll., 1986) ; ces récepteurs ont été classés  $Y_1$  et  $Y_2$  (WAHLESTEDT et coll., 1987). Selon cette classification, les récepteurs de type  $Y_1$  seraient activés par la molécule entière de NPY mais non activés par des fragments C-terminaux de 24 acides aminés ou moins, ou bien ne seraient activés qu'à de fortes concentrations ; les récepteurs de type  $Y_2$  seraient à la fois activés par le peptide dans son intégralité (NPY<sub>1-36</sub>) et, avec une efficacité bien plus grande, par les fragments C-terminaux de type NPY<sub>13-36</sub>. Des résultats plus récents de MICHEL et coll. (1990) montrent que le NPY<sub>18-36</sub>, un fragment C-terminal du NPY à 19 acides aminés, pourrait être un outil fort utile pour établir *in vitro* une discrimination entre les types  $Y_1$  et  $Y_2$  des récepteurs au NPY. L'existence d'un troisième type de récepteurs du NPY, nommé  $Y_3$ , a été postulé (MICHEL et coll., 1990). Le peptide YY (PYY) voisin du NPY, mime les effets de ce dernier sur la plupart des modèles biologiques parmi lesquels figurent ceux utilisés pour caractériser les récepteurs  $Y_1$  et  $Y_2$ -like, avec une efficacité comparable à celle du NPY, voire

supérieure (revue in NERI et coll., 1991a). Toutefois, dans certains tissus (cellules chromaffines bovines, intestin, coeur, cerveau de rat) il existe des sites de liaison du NPY non sensibles au PYY ; ce dernier, soit ne mime pas les effets du NPY, soit a des effets opposés (revue in MICHEL, 1991).

A ce jour, on ne connaît pas la nature des récepteurs au NPY, impliqués dans les actions de ce neuropeptide sur la zone glomérulée de la surrénale de rat.

Le but de la présente expérimentation a été :

1°) de déterminer, par analyse de Scatchard, les caractéristiques des sites spécifiques de liaison du NPY dans la zone capsulo-glomérulaire du cortex surrénalien de rat.

2°) de comparer les effets *in vitro* et en incubation statique, de la molécule entière du NPY (NPY<sub>1-36</sub>), d'un fragment C-terminal (NPY<sub>18-36</sub>) agoniste des récepteurs Y<sub>2</sub>, du peptide Leu<sup>31</sup>-Pro<sup>34</sup> NPY, agoniste des récepteurs Y<sub>1</sub> (FUHLENDORFF et coll., 1990), du peptide YY (PYY) et du VIP sur la libération d'aldostérone et de corticostérone par la zone capsulo-glomérulaire dont on a conservé l'organisation architecturale. Nous signalerons au passage les résultats d'études ponctuelles relatives -à la zone capsulo-glomérulaire en périfusion et -à des cellules isolées en incubation statique.

## II - MATERIEL ET METHODES

### A - Animaux

L'étude porte sur des rats mâles de 200 à 250 grammes, de souche Wistar, élevés dans les conditions précédemment décrites.

### B - Prélèvement des zones capsulo-glomérulaires et préparation des membranes pour les études de liaison

#### 1°) Prélèvements

Le tissu capsulaire, comprenant la capsule et la zone glomérulée de la surrénale, a été prélevé dans les conditions précédemment décrites (cf. chapitre 2). Les zones capsulo-glomérulaires, destinées à la détermination des sites de liaison du NPY, ont été plongées dans de l'azote liquide puis conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'au jour de l'isolement des membranes.

#### 2°) Préparation des membranes surrénaliennes

Pour chaque expérience, nous avons utilisé un pool de tissus capsulaires provenant de 10 à 15 rats. Chaque lot a été décongelé à  $4^{\circ}\text{C}$  ; les capsules ont été mises en suspension dans 5 ml de tampon (Tris-HCl : 50 mM ; NaCl : 120 mM ; Mg Cl<sub>2</sub> : 5 mM ; bacitracine : 0,1 % ; aprotinine : 1  $\mu\text{M}$ ) pH 7,40 et broyées à l'homogénéiseur de Dounce. Cette opération se déroule à froid dans un bain de glace.

Les homogénats sont ensuite centrifugés à 1 000 g pendant 10 min. et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les surnageants recueillis sont centrifugés une première fois à 20 000 g pendant 30 min. et à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les culots, contenant la fraction membranaire, sont rapidement rincés avec du tampon refroidi puis resuspendus dans 5 ml de tampon frais. Une nouvelle centrifugation est pratiquée (20 000 g pendant 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ ). Les surnageants sont écartés et les culots sont remis en suspension dans un petit volume de tampon, dans l'attente d'une détermination du taux de protéines sur une fraction aliquote, par la méthode de LOWRY et coll. (1951) avec de la BSA comme standard. La suspension membranaire est alors diluée avec un volume approprié de tampon pour obtenir une concentration de protéines égale à 2 000  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3°) Liaison du NPY aux membranes

Le ligand radioactif utilisé est du NPY<sub>1-36</sub> porcin, marqué à l'iode 125 (Lys<sup>4</sup> <sup>125</sup>I NPY ; NEX 220, NEN Du Pont de Nemours ; 2200 Ci/mmol). L'étude est réalisée dans des tubes de polypropylène (12 x 75 mm). Le volume total d'incubation est de 250 µl ; il comprend 50 µl de suspension membranaire (100 µg de protéines/tube), 100 µl de solution radioactive de NPY<sub>1-36</sub> (approximativement 30 000 cpm/tube ; 25 pmol/tube) et 100 µl de tampon contenant de la BSA (0,25 %) et, ou non (tubes pour la liaison totale), du NPY<sub>1-36</sub> de rat, non marqué (froid). La concentration finale de BSA dans le milieu d'incubation est de 0,1 %. La liaison non spécifique est déterminée en présence de NPY<sub>1-36</sub> à la concentration de 10<sup>-6</sup>M. Pour l'inhibition compétitive de la liaison du NPY marqué à l'iode 125, par du NPY froid, les membranes sont incubées en présence de ce dernier ligand à des concentrations croissantes, comprises entre 0,78 et 100 nM.

L'incubation est réalisée (en double ou triple exemplaire pour chaque tube) à température ambiante (20 - 22°C), pendant 60 minutes. A la fin de ce temps d'incubation, le NPY<sub>1-36</sub> lié est séparé du NPY<sub>1-36</sub> libre par filtration sous vide, sur microfiltres de verre (GF/C Whatman) préalablement humidifiés pendant 1 à 2 heures dans une solution aqueuse de polyéthylèneimine (0,1 %). Les membranes, retenues par les filtres, sont très rapidement rincées avec 5 ml de NaCl 0,9 %, refroidi par un bain de glace fondante. La radioactivité des filtres est mesurée avec un compteur gamma LKB (1209 Rackbeta).

Les données relatives à la liaison du ligand radioactif ont été analysées par le programme "EBDA" (*Equilibrium Binding Data Analysis*) qui permet d'obtenir une estimation initiale des paramètres de la liaison à l'équilibre selon SCATCHARD, HILL et EADIE-HOFSTEE (in Mc PHERSON, 1983) et le traitement ultérieur des données pour une courbe non-linéaire, selon le programme "LIGAND" permettant l'estimation finale des paramètres de la liaison (MUNSON et RODBARD, 1980).

## C - Incubations et périfusions de zones capsulo-glomérulaires intactes

### 1°) Incubations statiques

#### a) Protocole expérimental

Des échantillons, fraîchement collectés, de capsules / zones glomérulées sont préincubés individuellement pendant 1 heure à 37°C, dans 2 ml de tampon Krebs-Ringer-bicarbonate (118 mM de NaCl ; 2,6 mM de CaCl<sub>2</sub> ; 4,75 mM de KCl ; 1,19 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 1,19 mM de MgSO<sub>4</sub> ; 24,7 mM de HCO<sub>3</sub>Na ; la concentration finale de Na<sup>+</sup> est de 142,7 mEq/l et celle de K<sup>+</sup> de 5,9 mEq/l ; pH 7,40), contenant 0,2 % de glucose (KRBG) et 0,2 % de BSA, sous une atmosphère de 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> et agitation constante.

A la fin de la période de préincubation, le milieu d'incubation est retiré et remplacé par 2 ml de milieu frais KRBG-BSA contenant ou non (témoins) les peptides suivants : NPY<sub>1-36</sub>, NPY<sub>18-36</sub>, Leu<sup>31</sup>-Pro<sup>34</sup> NPY, PYY ou VIP à des concentrations variables de 10<sup>-10</sup> à 10<sup>-6</sup>M. Après une incubation de 1 heure à 37°C sous atmosphère de 95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>, le milieu d'incubation est collecté et réparti en fractions aliquotes, réservées aux dosages radioimmunologiques de l'aldostérone et de la corticostérone. Les échantillons de tissus capsulaires sont rapidement essorés sur du papier absorbant et pesés.

#### b) Dosages de l'aldostérone et de la cortico-stérone

La concentration d'aldostérone dans le milieu d'incubation a été déterminée, sans extraction préalable, par dosage radioimmunologique selon la technique précédemment décrite (cf. chapitre 2).

La concentration de corticostérone a également été déterminée par dosage radioimmunologique.

L'immunsérum anti-corticostérone provient des laboratoires UCB-bioproducts ; il a été fabriqué chez le lapin par immunisation avec de la corticostérone couplée à de la BSA.

Les concentrations standard de corticostérone, ou les échantillons, ont été incubés 30 minutes à 37°C, puis 16 heures à 4°C en présence d'immunsérum (dilution finale 1/10.000<sup>ème</sup>) et de (1, 2, 6, 7)<sup>3</sup>H

corticostérone (Amersham ; activité spécifique 94 Ci/mmol) avec du tampon phosphate 0,05 M, pH 7,40, contenant 0,1 % de gélatine et 0,2 % d'azide de sodium. Le volume total d'incubation est de 700  $\mu$ l. La séparation de la corticostérone liée à l'anticorps, de la corticostérone libre a été obtenue par apport de 500  $\mu$ l de suspension Charbon-Dextran (25 mg de Dextran T et 250 mg de Charcoal Norit dans 100 ml de tampon phosphate).

Le pourcentage de réaction croisée est de 100 % avec la corticostérone, 5 % avec la 11 deoxycorticostérone, 0,38 % avec l'aldostérone, 0,18 % avec le 21-deoxycortisol, 0,16 % avec la 21 deoxycorticostérone, 0,005 % avec le cortisol et le 11 deoxycortisol, 0,002 % avec la progestérone et moins de 0,001 % avec la 17-hydroxyprogestérone, la pregnenolone et la 17-hydroxypregnenolone.

Pour une quantité de corticostérone  $^3\text{H}$  de l'ordre de 15 000 cpm et en absence de compétition, la liaison de la corticostérone à l'anticorps est de 47 % (n=7). Les variations intra et inter-dosage sont respectivement de 2,37 % (n=12) et de 4,41 % (n=5).

## 2°) Périfusions

Le système de périfusion est constitué d'une pompe péristaltique multi-canaux (minipuls 2 Gilson) réglée pour assurer un débit constant de l'ordre de 10 ml/h de KRBG-BSA (milieu identique à celui utilisé au cours des incubations statiques). Le milieu atteint les chambres de périfusion (3 en parallèle) d'un volume de 0,4 ml, contenant chacune 1 zone capsulo-glomérulaire isolée. Les chambres de périfusion sont maintenues à 37°C par une circulation d'eau.

Le milieu est maintenu à 37°C, sous une atmosphère de 95 %  $\text{O}_2$  / 5 %  $\text{CO}_2$ .

Les zones capsulo-glomérulaires sont pré-périfusées pendant 2 heures avant de commencer la collecte des milieux de périfusion grâce à des collecteurs de fraction (MC80 Jouan). Les fractions collectées sont de 1 ml. Toutes les heures, les zones capsulo-glomérulaires sont périfusées par 1 ml de KRBG-BSA contenant un neuropeptide (VIP, NPY<sub>1-36</sub> ou NPY<sub>18-36</sub>) à une concentration définie.



## D - Incubation de cellules capsulo-glomérulaires isolées

### 1°) Isolement des cellules par la collagénase et la DNase

Pour l'isolement de cellules surrénaliennes on a prélevé les zones capsulo-glomérulaires des surrénales d'une vingtaine de rats mâles.

Ce matériel, réduit en fragments aussi petits que possible avec une lame de rasoir, a été incubé 2 fois 30 minutes à 37° C sous atmosphère de 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub> et agitation constante mais légère, dans un petit volume (de l'ordre de 5 ml) de KRBG pH 7,40, additionné de BSA (0,2 %), de collagénase (4 mg/ml ; grade II Boehringer) et de DNase (25 µg/ml ; deoxyribonucléase I Sigma). Le milieu de digestion est filtré sur gaze de nylon (mailles de 100 µm) puis centrifugé à 100 g, 30 minutes à température ambiante. Le surnageant est éliminé, le culot cellulaire est resuspendu dans un volume approprié de KRBG-BSA dépourvu d'enzymes. Après une nouvelle centrifugation à 100 g pendant 30 minutes, le culot cellulaire est repris dans un petit volume de milieu final d'incubation (KRBG pH 7,40 contenant 0,2 % de BSA, 100 UI/ml d'aprotinine, 25 µg/ml de streptomycine, 15 µg/ml de pénicilline et 60 µg/ml d'acide ascorbique). Une fraction aliquote de la suspension cellulaire est prélevée pour compter les cellules à l'hémocytomètre. La suspension cellulaire est alors diluée pour obtenir une concentration finale de l'ordre de 2.10<sup>5</sup> cellules/ml. La viabilité des cellules déterminée par extrusion du bleu Trypan, est environ de 85 à 90 %.

### 2°) Incubation des cellules isolées

La suspension cellulaire est répartie en fractions aliquotes de 2.10<sup>5</sup> cellules/ml qui sont pré-incubées dans des tubes de polyéthylène pendant 1 heure à 37° C, sous agitation constante et atmosphère de 95 % O<sub>2</sub>/5 % CO<sub>2</sub>.

A la fin de la préincubation, les cellules sont récupérées par centrifugation, et remises en suspension dans du milieu contenant ou non du VIP ou du NPY à des concentrations variables de 10<sup>-10</sup> à 10<sup>-6</sup> M.

A la fin de l'incubation (1 heure 30), les tubes sont centrifugés à 100 g pendant 10 minutes à 4° C ; les surnageants sont congelés à -20° C jusqu'au moment du dosage de l'aldostérone dans le milieu d'incubation, sans extraction préalable.

### 3°) Dosage de l'aldostérone

L'aldostérone produite par les cellules a été dosée par méthode radioimmunologique selon le protocole expérimental précédemment décrit (cf. chapitre 2).

### III - RESULTATS

#### A - Sites de liaison membranaire du NPY dans la zone capsulo-glomérulaire

Au cours d'études préliminaires nous avons montré que la liaison spécifique du NPY<sub>1-36</sub> porcin, marqué à l'iode 125, augmente avec la concentration de protéines membranaires de la zone capsulo-glomérulaire. Dans nos conditions expérimentales, un maximum de liaison est atteint pour une concentration protéique de 200 à 400 µg/ml c.à.d pour une quantité de protéines de l'ordre de 50 à 100 µg/tube pour un volume final d'incubation de 250 µl. Une concentration de protéines de 100 µg/tube a été choisie pour la détermination des caractéristiques de la liaison.

La liaison du NPY<sub>1-36</sub> marqué aux membranes surrenaliennes est maximale après 60 minutes d'incubation à la température ambiante (20-22°C) mais tend à décliner pour une durée d'incubation plus longue (90 et 120 minutes). La liaison non spécifique est généralement élevée (environ 65 à 70 %), conformément aux observations faites par plusieurs auteurs qui ont utilisé des membranes isolées de cerveau (ADAMO et HAZELWOOD, 1991 ; WIDDOWSON et HALARIS, 1991). Une incubation de 60 minutes à température ambiante a été utilisée pour déterminer les caractéristiques de la liaison.

Les courbes de Scatchard obtenues lors de compétitions entre une concentration constante de NPY marqué et des concentrations variables de NPY froid sont curvilignes (figure 3-1). L'analyse des données expérimentales par les programmes "EBDA" et "LIGAND" suggère que le radioligand se fixe simultanément à deux sites de liaison qui pourraient correspondre à deux classes de récepteurs à moins que ces deux sites apparents ne correspondent en fait qu'à un seul type de récepteurs dans deux états différents d'affinité. Dans nos conditions expérimentales, le fort pourcentage de liaison non spécifique est assez peu favorable à une analyse de l'interaction neuropeptide-récepteur. Néanmoins, une estimation de l'affinité des récepteurs et de leur densité donne pour l'une des classes :  $Kd_1 = 3,48 \pm 1,03$  nM et  $Bmax_1 = 609 \pm 434$  fmol/mg de protéines membranaires (moyenne  $\pm$  S.E.M. de 4 déterminations indépendantes avec des pools différents de membranes provenant chacun de 10 à 15 rats), pour l'autre classe de récepteurs :  $Kd_2 = 125 \pm 48$ nM et  $Bmax_2 = 2315 \pm 1084$  fmol/mg de protéines membranaires (n = 4).

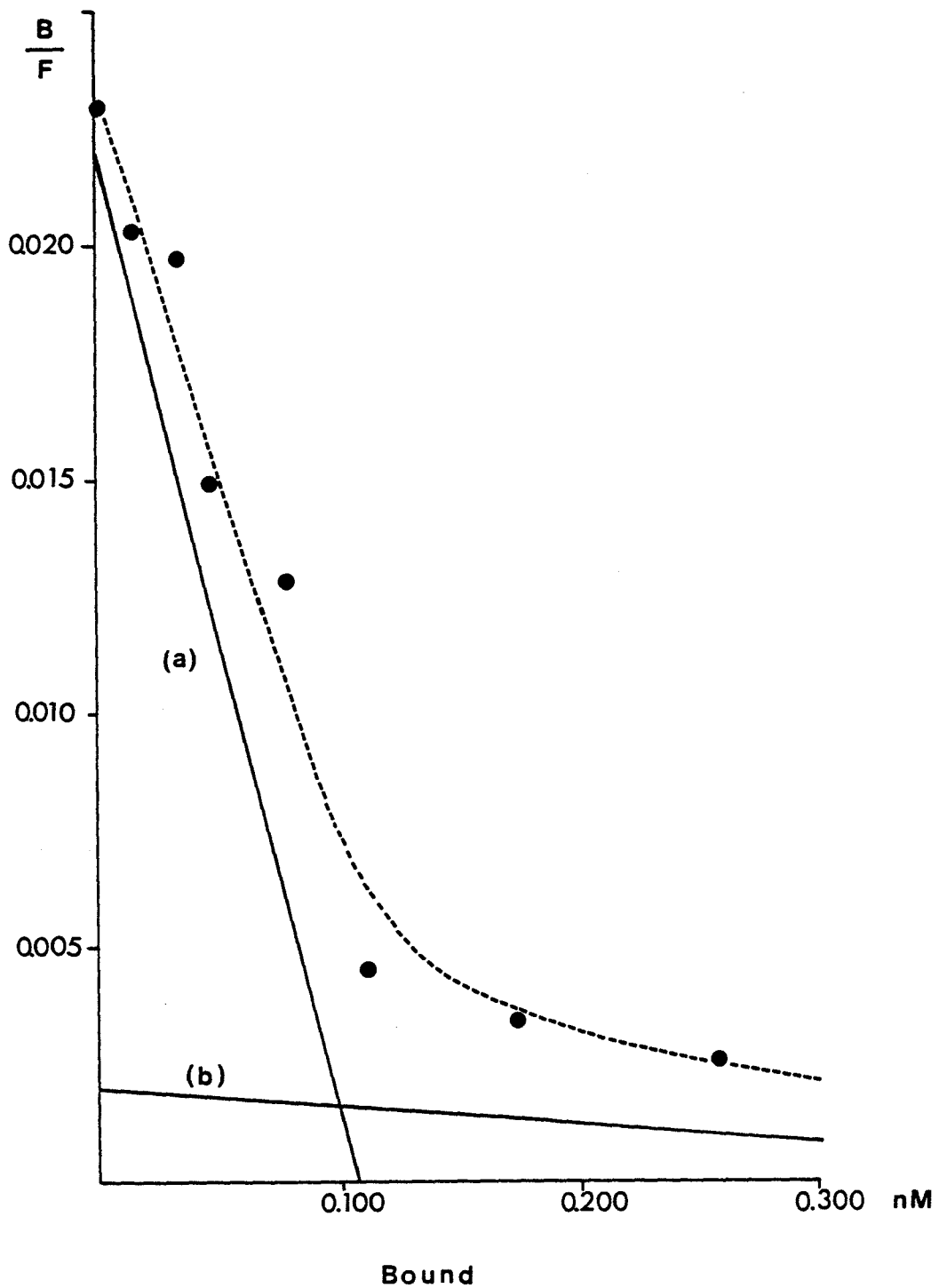


Figure 3-1

Liaison du  $^{125}\text{I}$ -NPY à des membranes de la zone capsulo-glomérulaire de surrénales de rat. Déplacement du ligand marqué par des concentrations croissantes de NPY 1-36 (0,78-100 nM).

La représentation selon Scatchard est curvilinéaire (courbe en pointillés). L'analyse par le programme LIGAND suggère la présence de deux sites de liaison: un de haute affinité et de faible capacité (a) et un de faible affinité et de grande capacité (b).

B: *bound* (lié)

F: *free* (libre)

## B - Effets du VIP, du NPY et du PYY sur la sécrétion d'aldostérone

### 1°) Incubation statique de zones capsulo-glomérulaires

En incubation statique le VIP accroît la production d'aldostérone de manière dose-indépendante pour des concentrations comprises entre  $10^{-10}$  et  $10^{-7}/10^{-6}$  M (figure 3-2).

La sécrétion d'aldostérone est également stimulée par le NPY<sub>1-36</sub> (figure 3-3A), le peptide Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup> NPY (figure 3-3B) et le NPY<sub>18-36</sub> (figure 3-3C) pour des concentrations de neuropeptides comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-6}$  M. Par contre, le PYY ne modifie pas significativement la sécrétion d'aldostérone à des concentrations comprises entre  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  M (figure 3-4).

### 2°) Périfusion de zones capsulo-glomérulaires

Le VIP et le NPY (1-36 et 18-36) stimulent la production d'aldostérone par les zones capsulo-glomérulaires en périfusion (figure 3-5). Cependant nous n'avons pas été en mesure d'établir une relation dose-effet pour chacun de ces trois peptides dans ce type d'expérience pour, au moins, deux raisons.

La première, est l'absence de reproductibilité pour une préparation donnée quand un peptide est administré, toujours à la même concentration, de manière pulsatile et à une fréquence convenable (1 pulse de 5 minutes toutes les heures) permettant un retour à la sécrétion "basale" d'aldostérone.

La deuxième est précisément liée à une relative instabilité de la sécrétion d'aldostérone au cours du temps, en absence de toute stimulation. La sécrétion "basale" ne cesse de décliner tout au long d'une périfusion dont la durée habituelle est de 8 à 10 heures. Dans nos conditions expérimentales, les résultats obtenus ne peuvent donc avoir qu'une valeur qualitative.

Les trois neuropeptides (VIP, NPY<sub>1-36</sub> et NPY<sub>18-36</sub>) stimulent la sécrétion d'aldostérone (figure 3-5) ; le peptide Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup> NPY et le PYY n'ont pas été testés sur ce modèle expérimental.

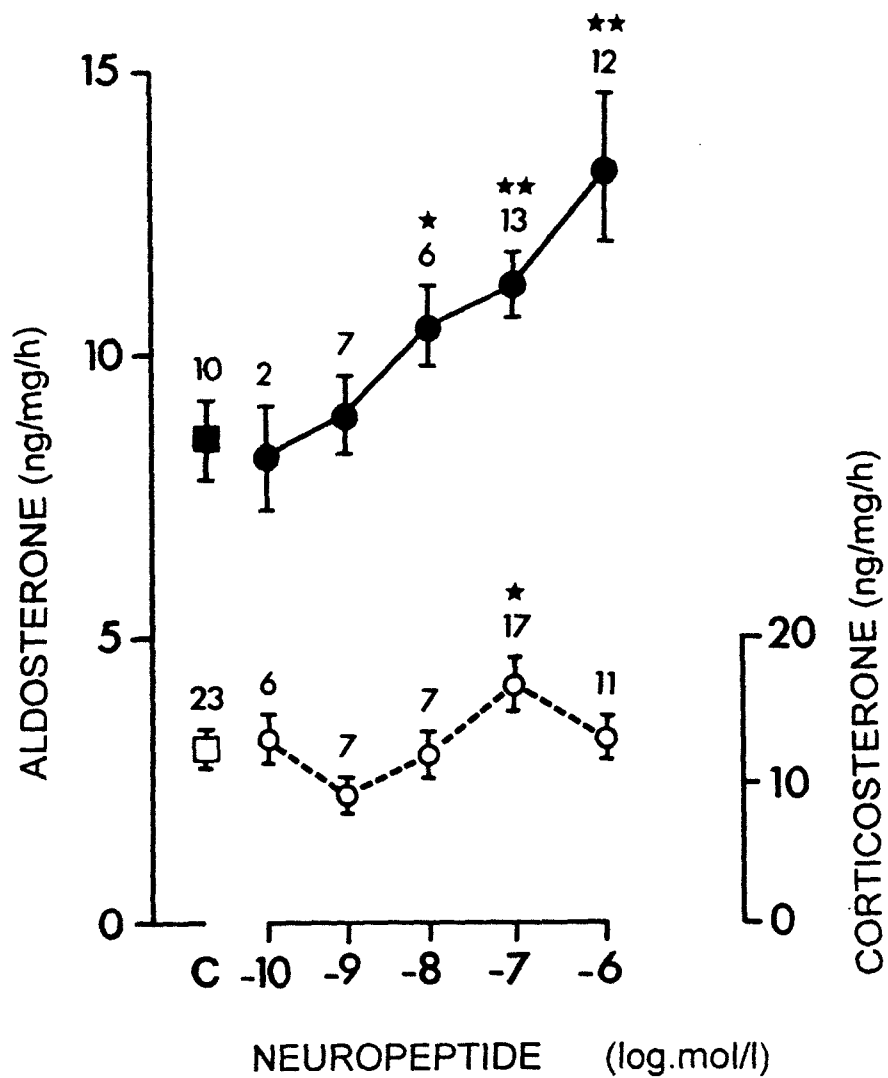


Figure 3-2

Sécrétions d'aldostérone (●—●) et de corticostérone (○---○) par des préparations de zones capsulo-glomérulaires incubées en présence de VIP.

C : Controls (solvant seul)

Moyennes +/- S.E.M.

Les chiffres indiquent le nombre de cas

Comparaison des moyennes vs C:

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01



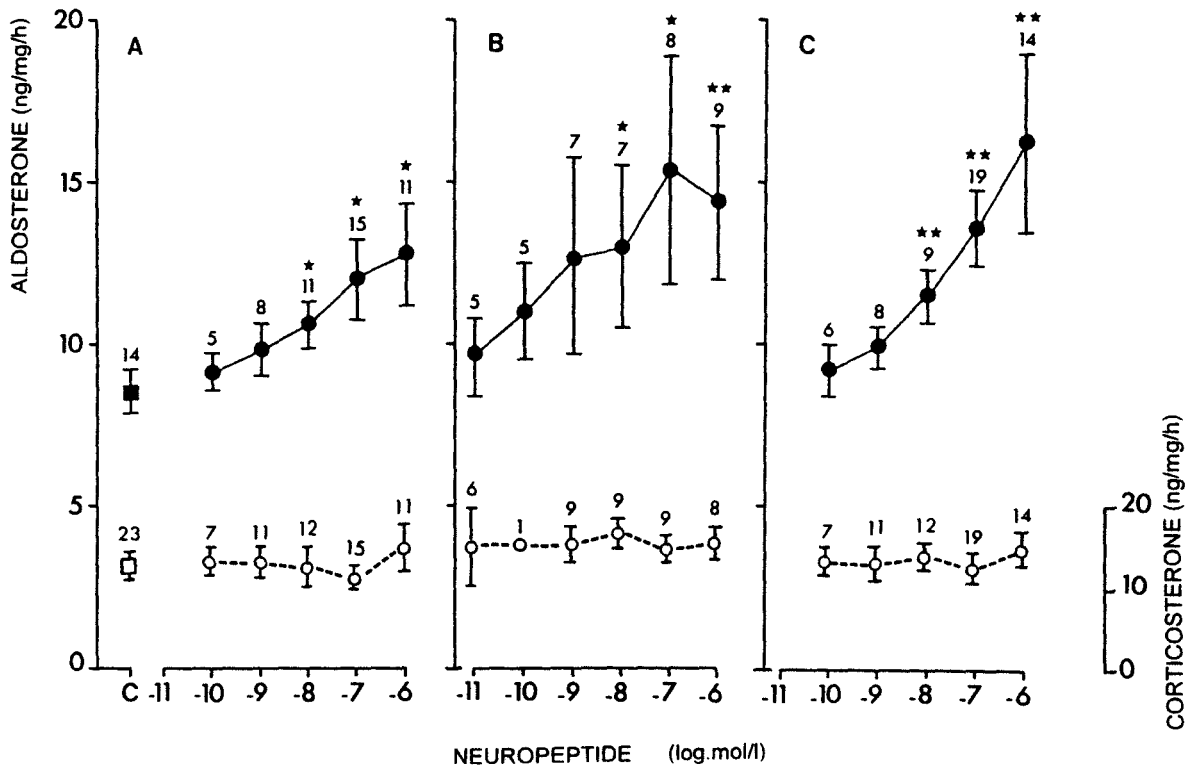


Figure 3-3

Sécrétions d'aldostérone (●—●) et de corticostérone (○---○) par des préparations de zones capsulo-glomérulaires incubées en présence de NPY<sub>1-36</sub> (A), de Leu<sup>31</sup> Pro<sup>34</sup> NPY (B) ou de NPY 18-36 (C).

C : Controls (solvant seul)

Moyennes +/- S.E.M.

Les chiffres indiquent le nombre de cas

Comparaison des moyennes vs C:

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

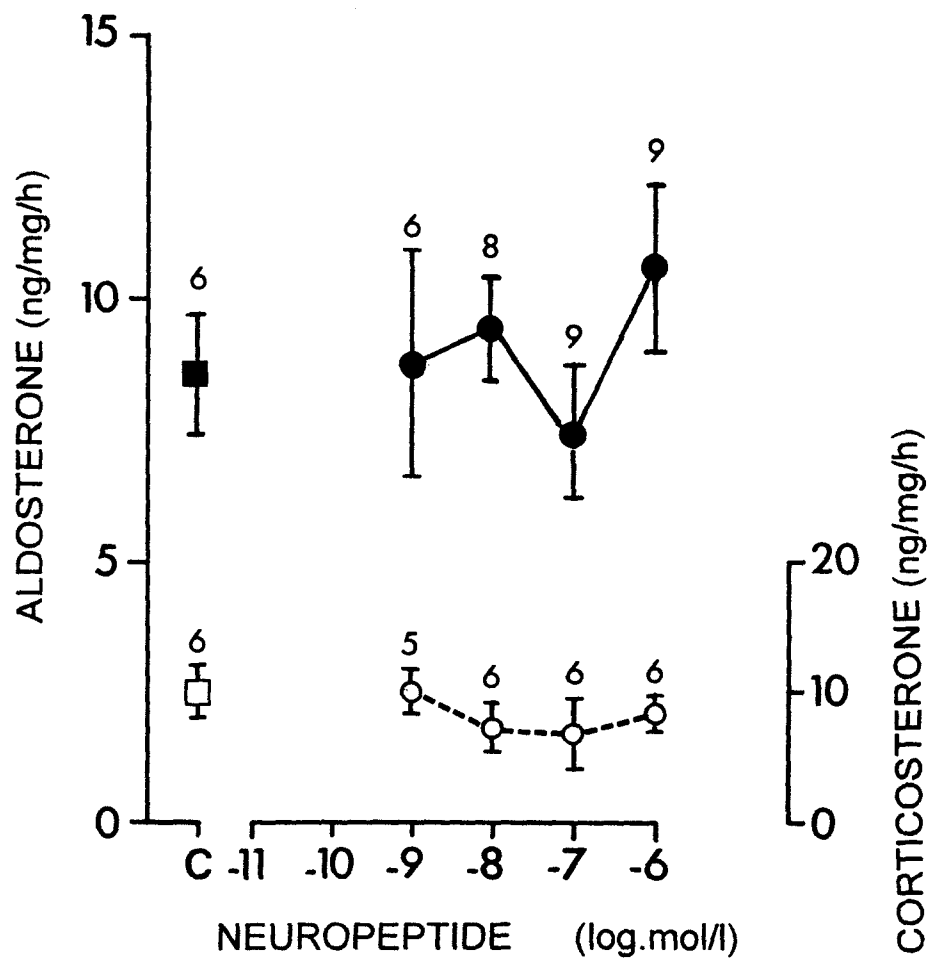


Figure 3-4

Sécrétions d'aldostérone (●—●) et de corticostérone (○---○) par des préparations de zones capsulo-glomérulaires incubées en présence de peptide YY (PYY).

C : Controls (solvant seul)

Moyennes +/- S.E.M.

Les chiffres indiquent le nombre de cas

Comparaison des moyennes vs C:

dans tous les cas  $p > 0,05$

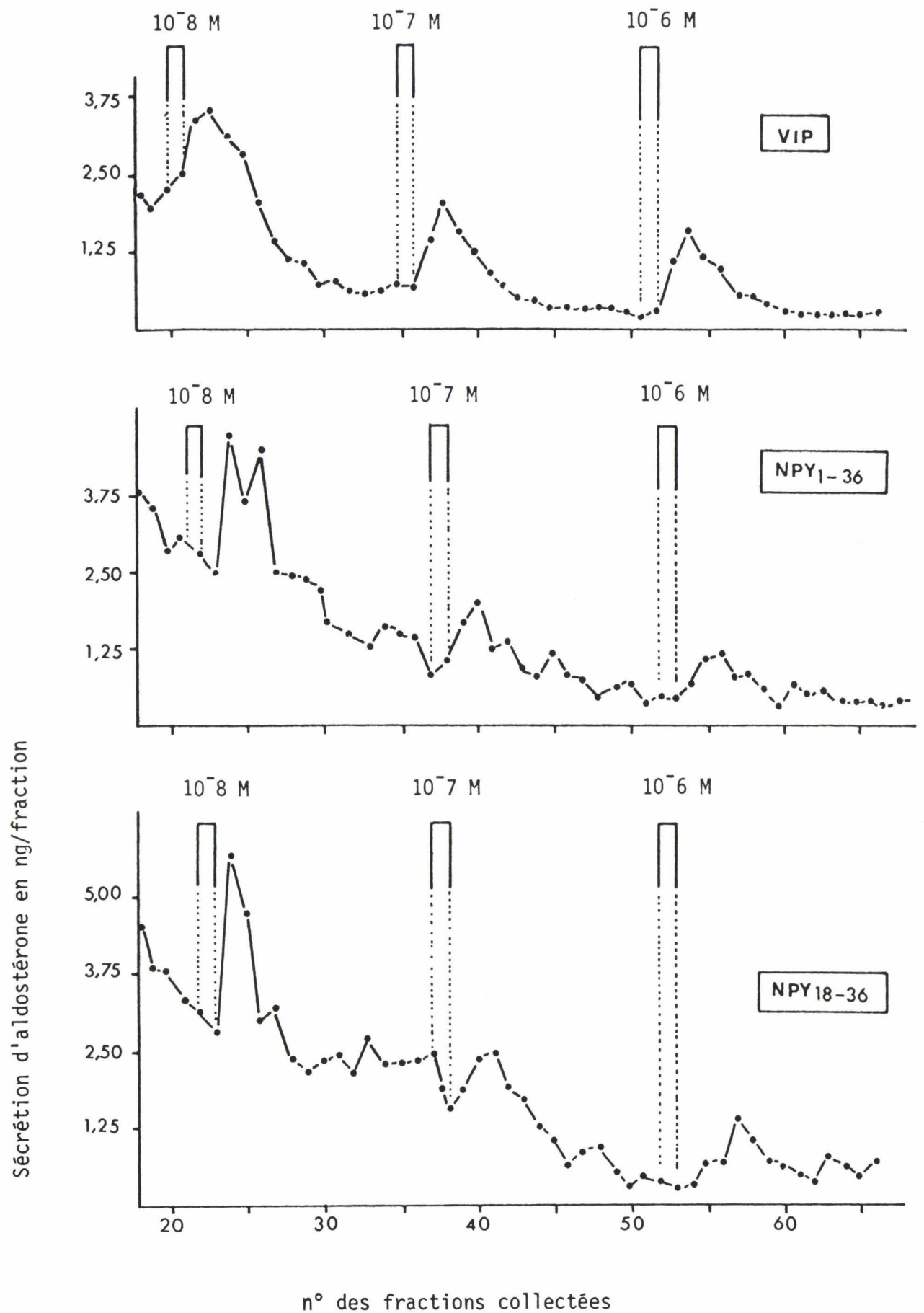


Figure 3-5

- Production d'aldostérone par zones capsulo-glomérulaires péricapsulaires ; effets du VIP, du NPY<sub>1-36</sub> et du NPY<sub>18-36</sub>.
- Volumes péricapsulaires pour chaque neuropeptide : 1 ml
  - Volume des fractions : 1 ml

### 3°) Incubation statique de cellules isolées

Le VIP induit une sécrétion d'aldostérone dose-dépendante pour des concentrations comprises entre  $10^{-8}$  et  $10^{-6}$  M (figure 3-6).

A cette dernière dose, la production d'aldostérone est environ 4 fois supérieure à la production basale (solvant) (figure 3-6).

Le NPY<sub>1-36</sub> ne stimule la sécrétion d'aldostérone qu'à la plus forte concentration testée ( $10^{-6}$  M) ( $p < 0,05$  vs solvant) ; l'effet stimulant est modeste puisque la production d'aldostérone n'est que de 20 à 25 % supérieure à la production basale (figure 3-6).

#### C - Effets du VIP, du NPY et du PYY sur la sécrétion de corticostérone

L'étude n'a été réalisée qu'en incubation statique de zones capsulo-glomérulaires.

La sécrétion de corticostérone dans le milieu d'incubation, dans des conditions basales, en absence de stimulation peptidergique et après 1 heure de préincubation, est de  $12,62 \pm 0,84$  ng/mg /heure ( $n = 23$ ).

La production de corticostérone n'est pas affectée par le VIP à des concentrations testées de  $10^{-10}$  à  $10^{-8}$  M (figure 3-2) ; néanmoins à une concentration plus élevée ( $10^{-7}$  M) nous avons observé une légère, mais significative, augmentation de la production de corticostérone ( $17,35 \pm 1,80$  ng/mg/heure ;  $n = 17$  ;  $p < 0,05$  vs témoins) non confirmée pour une dose supérieure ( $10^{-6}$  M).

Les peptides NPY<sub>1-36</sub> (figure 3-3A), Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup> NPY (figure 3-3B) et NPY<sub>18-36</sub> (figure 3-3C) n'ont pas eu d'effet corticostéroïdogénique pour des concentrations comprises entre  $10^{-10}$  et  $10^{-6}$  M (NPY<sub>1-36</sub>) entre  $10^{-11}$  et  $10^{-6}$  M (Leu<sup>31</sup>Pro<sup>34</sup> NPY) ou entre  $10^{-10}$  et  $10^{-6}$  M (NPY<sub>18-36</sub>).

Le peptide YY n'a pas d'effet corticostéroïdogénique pour des concentrations comprises entre  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  M (figure 3-4).

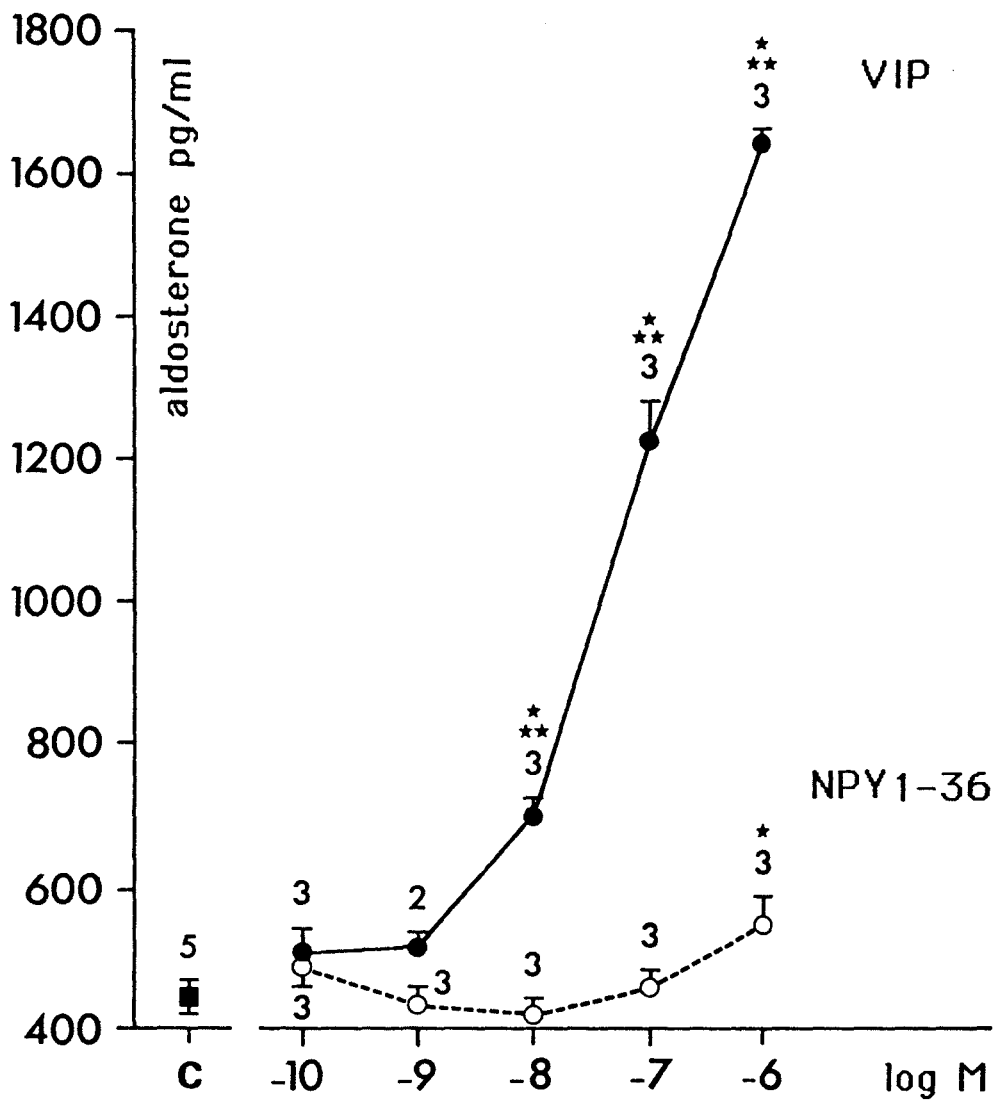


Figure 3-6

Production d'aldostérone par cellules isolées de zones capsulo-gomérulaires : effets du VIP et du NPY<sub>1-36</sub>.

- Moyennes  $\pm$  S.E.M. et nombre de cas
- C = témoin (control)
- Comparaison des moyennes : VIP ou NPY<sub>1-36</sub> versus C (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

#### IV - DISCUSSION

La partie la plus externe de la surrénale fraîchement déméduillée, de rate intacte, contient, comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 2), plus de 70 % du contenu total en aldostérone de la glande (BERNET et coll., 1991). Nous pouvons donc admettre que nos préparations de zones capsulo-glomérulaires de mâles, utilisées dans cette étude, comportent, outre la capsule fibreuse, la majeure partie de la zone glomérulée. Par ailleurs, ces préparations de surrénales des deux sexes contiennent, comme nous l'avons vu précédemment (chapitre 2), de l'adrénaline et de la noradrénaline (Mc CARTY et coll., 1984 ; PRATT et coll., 1987 ; BUU et LUSSIER, 1990 ; BERNET et coll., 1991).

Des récepteurs de haute affinité pour le NPY ont été mis en évidence dans le système nerveux central et périphérique (revue in MANNON et coll., 1991). Tous les auteurs signalent l'existence d'une liaison non-spécifique particulièrement élevée, du même ordre de grandeur que celle que nous observons avec le tissu surrénalien.

Notre étude montre l'existence, sur les membranes de la zone capsulo-glomérulaire, de deux populations de récepteurs au NPY dont l'affinité paraît être 10 fois plus faible et la capacité de liaison 3 fois plus grande que celles rapportées pour des membranes de cerveau de rat (WIDDOWSON et HALARIS, 1991) ou de poulet (ADAMO et coll., 1991). Il est possible que dans nos conditions expérimentales et avec une liaison non-spécifique élevée, l'existence d'autres types de récepteurs de faible affinité n'ait pas pu être révélée.

L'effet stimulant du potassium sur la sécrétion d'aldostérone est bien connu. C'est pour cette raison que plusieurs auteurs ont utilisé soit des milieux de culture modifiés par dilution avec du tampon Krebs-Ringer-bicarbonate dépourvu (ou appauvri) de (en)  $K^+$  (ENYEDI et coll., 1983 ; NERI et coll., 1990, 1991a ; HINSON et coll., 1992), soit du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate modifié dans sa composition (CUNNINGHAM et HOLZWARATH, 1988) pour obtenir une concentration finale en ions  $K^+$  inférieure à 4 mM, nettement plus faible que celle rapportée pour le sérum de rat qui varie, selon les auteurs, de 5 à 6,2 mM (PROSSER, 1973 ; NERI et coll., 1991a). La concentration de potassium dans notre milieu d'incubation ou de périfusion (5,9 mM) est donc physiologique.

CUNNINGHAM et HOLZWARATH (1988) ayant utilisé des préparations capsulo-glomérulaires périfusées après plusieurs heures de "rinçage", nous ne pouvons pas établir de comparaison fiable quant à la



production basale d'aldostérone entre leur étude et la nôtre pour une préparation similaire. Il semble néanmoins que la sécrétion basale d'aldostérone soit plus importante dans nos conditions expérimentales ; une durée de préincubation ou de pré-pérfusion moindre (respectivement 1 heure et 2 heures) et la nature des milieux utilisés peuvent, en partie, rendre compte de cette différence.

Le VIP induit, *in vitro*, de façon dose-dépendante, une augmentation de la sécrétion d'aldostérone par la zone capsulo-glomérulaire du cortex surrénalien de rat. Cette observation est compatible avec la présence de sites de liaison spécifiques de ce neuropeptide dans cette région de la surrénale (CUNNINGHAM et HOLZWARTH 1989) et est conforme avec l'effet stimulant du VIP sur la production d'aldostérone par des préparations capsulo-glomérulaires pérfusées *in vitro* (CUNNINGHAM et HOLZWARTH 1988) ou par des surrénales isolées et pérfusées *in situ*, aussi bien chez le rat (HINSON et coll., 1992) que chez le porc (EHRHART-BORNSTEIN et coll., 1991).

*In vivo*, le VIP stimule aussi la sécrétion d'aldostérone par des surrénales de rat (NUSSDORFER et MAZZOCHI, 1987). A la concentration de  $10^{-7}$  M, le VIP induit une légère mais significative élévation de la production de corticostérone par les préparations capsulo-glomérulaires. Ces observations sont compatibles avec la sécrétion de corticostérone induite par le VIP lorsque ce dernier est introduit dans le milieu de perfusion de surrénale de rat *in situ* (HINSON et coll., 1992). Puisque la stimulation du nerf splanchnique s'accompagne d'une libération de VIP, de cortisol et d'aldostérone par la surrénale de porc isolée et pérfusée *in situ* (EHRHART-BORNSTEIN et coll., 1991), il est vraisemblable que l'innervation VIPergique du cortex surrénalien du rat (MAUBERT et coll., 1990) est un élément stimulateur important du contrôle nerveux de la sécrétion d'aldostérone et, à un degré moindre, de la production de corticostérone. Le VIP stimule aussi *in vitro*, la production d'aldostérone par les cellules capsulo-glomérulaires isolées par la collagénase et la DNase. Cette dernière observation est en contradiction avec celle d'autres auteurs qui n'ont pas observé d'effet du VIP sur ce type de préparation (ENYEDI et coll., 1983 ; HINSON et coll., 1992). De même le VIP n'a pas d'effet stimulant sur la sécrétion de corticostérone par des cellules dispersées de la zone fasciculo-réticulée, pour des concentrations allant de 10 pmol à 10 mmol/l (HINSON et coll., 1992). Pareillement, le VIP n'a pas d'effet sur la réponse à l'ACTH de cellules dispersées de zone glomérulée ou de zone fasciculo-réticulée (HINSON et coll., 1992). Ces

données de la littérature et les nôtres suggèrent que les effets du VIP sur la production d'aldostérone et de corticostérone, toujours observés quand l'architecture de la zone glomérulée est préservée, rarement observés quand les cellules sont dispersées par la collagénase, pourraient être plus (ou tout autant d'après nos observations sur cellules isolées) indirects que directs et impliquer la libération locale d'autres substances dont l'adrénaline. A l'appui de cette hypothèse on peut signaler que le VIP induit une libération, dose-dépendante (entre  $10^{-9}$  et  $10^{-6}$  M), d'adrénaline et de noradrénaline dans le milieu d'incubation de zones capsulo-glomérulaires isolées de surrénales de rat (F. BERNET, communication personnelle). Par ailleurs, selon HINSON et coll. (1992), une concentration plus élevée de VIP ( $10^{-5}$  M) entraîne une élévation significative de la libération d'adrénaline mais non de noradrénaline, dans le milieu d'incubation de tissu capsulaire de surrénale de rat. D'un autre côté, l'adrénaline stimule la sécrétion d'aldostérone par les cellules isolées de zone glomérulée de rat (HORIUCHI et coll., 1987) et l'apport d'un antagoniste  $\beta$  adrénergique (alprenolol) au milieu d'incubation, atténuée significativement, mais n'abolit pas, la réponse stéroïdogénique du tissu capsulaire au VIP (HINSON et coll., 1992). Toutes ces données sont donc compatibles avec l'hypothèse selon laquelle l'adrénaline serait impliquée, au moins partiellement, dans les effets du VIP sur la sécrétion d'aldostérone. Néanmoins un certain effet direct du VIP sur les cellules stéroïdogéniques de la zone glomérulée est vraisemblable ; notre étude sur les cellules isolées en témoigne tout comme l'abolition seulement partielle de l'effet du VIP par l'antagoniste  $\beta$  adrénergique dans l'étude du groupe de HINSON (1992).

L'administration prolongée de NPY à des rats dont l'axe hypothalamo-hypophysaire corticotrope et le système rénine-angiotensine sont pharmacologiquement bloqués, induit un accroissement du volume de la zone glomérulée de la surrénale et une élévation moindre, bien que significative, du volume de la zone fasciculée (REBUFFAT et coll., 1988) ; par ailleurs, ce traitement augmente l'aldostéronémie (MAZZOCHI et NUSSDORFER, 1987 ; REBUFFAT et coll., 1988). Nos observations *in vitro* sur zones capsulo-glomérulaires intactes en incubation statique ou en périfusion, s'accordent bien avec ces dernières observations *in vivo*. Nous montrons, de plus, que le NPY<sub>18-36</sub>, connu pour stimuler les récepteurs Y<sub>2</sub> avec plus d'efficacité que le NPY<sub>1-36</sub> (revue in MICHEL et coll., 1990), est un stimulant de la production d'aldostérone tout comme la molécule entière de NPY (NPY<sub>1-</sub>

36). De même le peptide  $\text{Leu}^{31}\text{Pro}^{34}\text{-NPY}$ , un agoniste spécifique des récepteurs de type  $Y_1$  stimule la sécrétion d'aldostérone. Par contre, le peptide YY ne stimule pas la production d'aldostérone, contrairement au  $\text{NPY}_{1-36}$  ou à ses analogues agissant sélectivement sur les récepteurs de type  $Y_1$  et  $Y_2$ . Aucun des peptides testés (NPY et analogues, PYY) ne stimule la production de corticostérone.

Puisque le PYY ne se lie pas aux récepteurs du NPY de type  $Y_3$  mais a des affinités comparables pour les récepteurs de type  $Y_1$  et  $Y_2$  (MICHEL, 1991) et que le PYY ne mime pas les effets stéroïdogéniques (sécrétion d'aldostérone) du NPY ou de ses analogues sélectifs ( $\text{Leu}^{31}\text{Pro}^{34}\text{ NPY}$ ,  $\text{NPY}_{18-36}$ ), on peut spéculer que le NPY agit sur la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale via des récepteurs de type  $Y_3$  plutôt que de type  $Y_1$  ou  $Y_2$ .

A la fois une partie de nos résultats et ceux de la littérature relatifs à des expériences *in vivo*, tels que nous les avons rapportés ci-dessus, sont en contradiction avec ceux de NERI et coll. (1990) *in vitro* et de LESNIEWSKA et coll. (1990) *in vivo*. En effet, selon le groupe de NERI, le NPY inhiberait partiellement à la fois la sécrétion, basale et stimulée par l'ACTH, de l'aldostérone et de la 18 hydroxy-corticostérone par des cellules isolées de zone glomérulée de surrénale de rat et, inversement, stimulerait celle de 11 deoxycorticostérone et de corticostérone ; ceci suggère que le NPY pourrait déprimer directement l'activité 18-hydroxylase des cellules stéroïdogéniques de la zone glomérulée. D'après notre étude sur cellules isolées, le  $\text{NPY}_{1-36}$  apparaît bien moins efficace pour promouvoir une production d'aldostérone qu'il ne l'est sur zone capsulo-glomérulaire intacte. D'un autre côté, selon le groupe de LESNIEWSKA, le traitement de longue durée par du NPY de rates intactes ou injectées de dexaméthasone, diminuerait l'ACTHémie et l'aldostéronémie ce qui pourrait suggérer un effet inhibiteur direct du NPY sur le cortex surrénalien.

Dans une étude préliminaire (F. BERNET, communication personnelle), une libération dose-dépendante de catécholamines (noradrénaline et adrénaline) par des préparations de zone capsulo-glomérulaire de rat, est induite *in vitro* par le  $\text{NPY}_{1-36}$ , le peptide  $\text{Leu}^{31}\text{Pro}^{34}\text{ NPY}$ , le  $\text{NPY}_{18-36}$  et le VIP à des concentrations comprises entre  $10^{-10}$  et  $10^{-8}\text{M}$ . Dans un travail récent réalisé en collaboration avec F. BERNET, nous avons montré que le peptide  $\text{Leu}^{31}\text{Pro}^{34}\text{ NPY}$ , le  $\text{NPY}_{18-36}$  et le VIP à la concentration de  $10^{-7}\text{M}$  stimulent bien *in vitro* la libération de catécholamines (noradrénaline et adrénaline) et

d'aldostérone par des zones capsulo-glomérulaires ; un antagoniste  $\beta_1$  adrénergique (Atenolol), à la concentration de  $10^{-7}M$ , mais non un antagoniste  $\beta_2$  adrénergique (ICI-118, 551) à cette même concentration qui n'affecte par lui-même pas la production basale d'aldostérone, prévient l'effet stéroïdogénique du NPY, de ses analogues ( $Y_1$  et  $Y_2$ -like) et du VIP (BERNET et coll., in press). Ces dernières données suggèrent que l'adrénaline et/ou la noradrénaline de la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale pourrai(en)t être impliquée(s) dans les effets stéroïdogéniques du NPY et du VIP via les récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques. Une autre hypothèse peut aussi être proposée, à savoir qu'il pourrait y avoir une interaction directe entre les sites spécifiques de liaison du NPY ou du VIP, présents au niveau de la zone capsulo-glomérulaire du cortex surrénalien de rat, et les récepteurs  $\beta_1$  adrénergiques ; des interactions entre récepteurs au NPY et récepteurs  $\alpha_2$  adrénergiques ont été montrées au niveau de neurones du cerveau (MARTIRE et PISTRITTO, 1992).



**BIBLIOGRAPHIE**



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMO M.L. and HAZELWOOD R.L. (1991). Specific neuropeptide Y binding sites in chicken brain. *Amer. J. Physiol.* **260** : E 839-E 845.
- AFEWORK M., TOMLINSON A., BELAI A. and BURNSTOCK G. (1992). Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in rat adrenal gland. *Neurochem.* **3** : 893-896.
- AGUILERA G., HARWOOD J.P. and CATT K.J. (1981). Somatostatin modulates the effects of angiotensin II in adrenal glomerulosa zone. *Nature* **292** : 262-263.
- AGUILERA G., MILLAN M.A., HAUGER R.L. and CATT K.J. (1987). Corticotropin-releasing factor receptors : distribution and regulation in brain, pituitary and peripheral tissues. *Ann. NY. Acad. Sci.* **512** : 48-66.
- AHONEN M., SOINILA S. and JOH T.H. (1987). Pre- and postnatal development of rat retroperitoneal paraganglia. *J. Auton. Nerv. Syst.* **18** : 111-120.
- ALLEN J.M., ADRIAN T.E., POLAK J.M. and BLOOM S.R. (1983). Neuropeptide Y (NPY) in the adrenal gland. *J. Auton. Nerv. Syst.* **9** : 559-563.
- ANDERSON D.J. and AXEL R. (1985). Molecular probes for the development and plasticity of neural crest derivatives. *Cell* **42** : 649-662.
- ANDERSON D.J. and AXEL R. (1986). A bipotential neuroendocrine precursor whose choice of cell fate is determined by NGF and glucocorticoids. *Cell* **47** : 1079-1090.
- ANDERSON D.J. (1991). Development and plasticity in the sympathoadrenal lineage of the neural crest. Discussions in Neuroscience, Elsevier, *Neuronal development 7* (2-3) : 26-32.
- ANDERSON D.J., CARNAHAN J.F., MICHELSON A. and PATTERSON P.H. (1991). Antibody markers identify a common progenitor to sympathetic neurons and chromaffin cells in vivo and reveal the timing of commitment to neuronal differentiation in the sympathoadrenal lineage. *J. Neurosci.* **11** (11) : 3507-3519.
- ANDERSON D.J. (1993a). Molecular control of cell fate in the neural crest : The sympathoadrenal lineage. *Ann. Rev. Neurosci.* **16** : 129-158.
- ANDERSON D.J. (1993b). Cell fate determination in the peripheral nervous system : The sympathoadrenal progenitor. *J. Neurobiology* **24**(2) : 185-198.
- ANDREIS P.G., NERI G. and NUSSDORFER G.G. (1991). Corticotropin-releasing hormone (CRH) directly stimulates corticosterone secretion by the rat adrenal gland. *Endocrinology* **128** : 1198-1200.
- ANDREIS P.G., NERI G., MAZZOCCHI G., MUSAJO F. and NUSSDORFER G.G. (1992). Direct secretagogue effect of corticotropin-releasing factor on the rat adrenal cortex : the involvement of the zona medullaris. *Endocrinology* **131** : 69-72.
- ARIANO M.A. and KENNY L.K. (1985). Peptide coincidence in rat superior cervical ganglion. *Brain Research* **340** : 181-185.
- BAETGE G., PINTAR J.E. and GERSHON M.D. (1990). Transiently catecholaminergic (TC) cells in the bowel of the fetal rat : precursors of noncatecholaminergic enteric neurons. *Developmental Biology* **141** : 353-380.



- BAFFI J., GORCS T., SLOWIK F., HORVATH M., LEKKA N., PASZTOR E. and PALKOVITS M. (1992). Neuropeptides in the human superior cervical ganglion. *Brain Research* **570** : 272-278.
- BALJET B. and DRUKKER J. (1979). The extrinsic innervation of the abdominal organs in the female rat. *Acta anat.* **104** : 243-267.
- BAUER F.E., HACKER G.W., TERENGI G., ADRIAN T.E., POLAK J.M. and BLOOM S.R. (1986). Localization and molecular forms of galanin in human adrenals : elevated forms in pheochromocytomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **63** : 1372-1378.
- BERNET F., MAUBERT E., DELOOF S., BERNARD J., MONTEL V., and DUPOUY J.P. (1991). Effects of estrous cycle and of in vivo unilateral or bilateral adrenal demedullation on the distribution of the norepinephrine and epinephrine between different zones of the adrenal. *J. Neuroendocrinol.* **3** : 523-528.
- BERNET F., BERNARD J., LABORIE C., MONTEL V., MAUBERT E. and DUPOUY JP. Neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal peptide (VIP)-induced aldosterone secretion by rat capsule/glomerular zone could be mediated by catecholamines via B<sub>1</sub> adrenergic receptors. *Neurosci. Lett.* (in press).
- BLOCH B., POPOVICI T., CHOUHAM S. and KOWALSKI C. (1986). Detection of the mRNA coding for enkephalin precursor in the rat brain and adrenal by using an "in situ" hybridization procedure. *Neuroscience Letters* **64** : 29-34.
- BOHN M.C., GOLDSTEIN M. and BLACK I.B. (1981). Role of glucocorticoids in expression of the adrenergic phenotype in rat embryonic adrenal gland. *Dev. Biol.* **82** : 1-10.
- BOHN M.C., KESSLER J.A., GOLIGHTLY L. and BLACK I.B. (1983). Appearance of enkephalin-immunoreactivity in rat adrenal medulla following treatment with nicotinic antagonists or reserpine. *Cell Tissue Res.* **231** : 469-479.
- BOHN M.C. (1987). Division of small intensely fluorescent cells in neonatal rat superior cervical ganglion is inhibited by glucocorticoids. *Neuroscience* **20** : 885-894.
- BORNSTEIN S.R., EHRHART-BORNSTEIN M., SCHERBAUM W.A., PFEIFFER E.F. and HOLST J.J. (1990). Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology.* **127** : 900-906.
- BORNSTEIN S.R., EHRHART-BORNSTEIN M., USADEL H., BOCKMANN M., SCHERBAUM W.A. (1991). Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell. Tissue Res.* **265** : 1-9.
- BOUDOURESQUE F., GUILLAUME V., GRINO M., STRBAK V., CHAUTARD T., CONTE-DEVOLX B. and OLIVER C. (1988). Maturation of the pituitary-adrenal function in rat fetuses. *Neuroendocrinology* **48** : 417-422.
- BREDT D.S., HWANG P.M. and SNYDER S.H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **354** : 768-770.
- BRESLOW M.J. (1992). Regulation of adrenal medullary and cortical blood flow. *Am. J. Physiol.* **262** : H1317-H1330.

BRUHN T.O., ENGELAND W.C., ANTHONY E.L.P., GANN D.S. and JACKSON I.M.C. (1987). Corticotropin-releasing factor in the dog adrenal medulla is secreted in response to hemorrhage. *Endocrinology* **120** : 25-33.

BUCSICS A., SARIA A. and LEMBECK F. (1981). Substance P in the adrenal gland : origin and species distribution. *Neuropeptides* **1** : 329-341.

BUU N.T. and LUSSIER C. (1990). Origin of dopamine in the rat adrenal cortex. *Amer. J. Physiol.* **258** : F287-F291.

CARNAHAN J.F. and PATTERSON P.H. (1991a). The generation of monoclonal antibodies that bind preferentially to adrenal chromaffin cells and the cells of embryonic sympathetic ganglia. *J. Neurosci.* **11** : 3493-3506.

CARNAHAN J.F. and PATTERSON P.H. (1991b). Isolation of the progenitor cells of the sympathoadrenal lineage from embryonic sympathetic ganglia with the SA monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* **11** (11) : 3520-3530.

CARNAHAN J.F., ANDERSON D.J. and PATTERSON P.H. (1991). Evidence that enteric neurons may derive from the sympathoadrenal lineage. *Develop. Biol.* **148** : 552-561.

CAVANAGH M.E. and PARNAVELAS J.G. (1988). Development of somatostatin immunoreactive neurons in the rat occipital cortex : a combined immunohistochemical-autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.* **268** : 1-12.

CECCATELLI S., DAGERLIND A., SCHALLING M., WIKSTROM A.C., OKRET S., GUSTAFSSON J.A., GOLDSTEIN M. and HÖKFELT T. (1989). The glucocorticoid receptor in the adrenal gland is localized in the cytoplasm of adrenaline cells. *Acta Physiol. Scand.* **137** : 559-560.

CHATELAIN A. and CHEONG H.S. (1987). The biological activity of different molecular forms of ACTH on corticosterone production by perfused fetal rat adrenal glands in vitro. *Acta Endocrinologica* **116** : 179-185.

CHARLTON B.G. (1990). Adrenal cortical innervation and glucocorticoid secretion. *J. Endocrinology* **126** : 5-8.

CHARLTON B.G., NKOMAZANA O.F., MCGADEY J. and NEAL D.E. (1991). A preliminary study of acetylcholinesterase-positive innervation in the human adrenal cortex. *J. Anat.* **176** : 99-104.

CHEVENDRA V. and WEAVER L.C. (1992). Distributions of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide and somatostatin in populations of postganglionic neurons innervating the rat kidney, spleen and intestine. *Neuroscience* **50** (3) : 727-743.

COCHARD P., GOLDSTEIN M. and BLACK I.B. (1978). Ontogenetic appearance and disappearance of tyrosine hydroxylase and catecholamines in the rat embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **75** : 2986-2990.

COCHARD P., GOLDSTEIN M. and BLACK I.B. (1979). Initial development of noradrenergic phenotype in autonomic neuroblasts of the rat embryo in vivo. *Dev. Biol.* **71** : 100-114.

COHEN A. (1976). Adrenal and plasma corticosterone levels in the pregnant, foetal and neonatal rat, in the perinatal period. *Horm. Metab. Res.* **8** : 474-478.

COULOMBE J.N. and NISHI R. (1991). Stimulation of somatostatin expression in the developing ciliary ganglion neurons by cells of the choroid layer. *J. Neurosci.* **11**, 553-562.

COUPLAND R.E. and SELBY J.E. (1976). The blood supply of the mammalian adrenal medulla : a comparative study. *J. Anat.* **122** (3) : 539-551.

COUPLAND R.E., PARKER T.L., KESSE W.K. and MOHAMED A.A. (1989). The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation. *J. Anat.* **163** : 173-181.

CUNNINGHAM L.A. and HOLZWARTE M.A. (1988). Vasoactive intestinal peptide stimulates adrenal aldosterone and corticosterone secretion. *Endocrinology* **122** (5) : 2090-2097.

CUNNINGHAM L.A. and HOLZWARTE M.A. (1989). Autoradiographic distribution of  $^{125}\text{I}$ -VIP binding in the rat adrenal cortex. *Peptides* **10** : 1105-1108.

DAGERLIND A., GOLDSTEIN M. and HÖKFELT T. (1990). Most ganglion cells in the rat adrenal medulla are noradrenergic. *Neuroreport* **1** : 137-140.

DAVE J.R., EIDEN L.E. and ESKAY R.L. (1985). Corticotropin-releasing factor binding to peripheral tissue and activation of the adenylate cyclase-adenosine 3', 5'-monophosphate system. *Endocrinology* **116** (6) : 2152-2159.

DE CHAMPLAIN J., MALMFORS T., OLSON L. and SACHS C.H. (1970). Ontogenesis of peripheral adrenergic neurons in the rat : pre- and postnatal observations. *Acta Physiol. Scand.* **80** : 276-288.

DE QUIDT M.E. and EMSON P.C. (1986). Neuropeptide Y in the adrenal gland : characterisation, distribution and drug effects. *Neuroscience* **19** : 1011-1022.

DOUPE A.J., LANDIS S.C. and PATTERSON P.H. (1985a). Environmental influences in the development of neural crest derivatives : glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci.* **5** : 2119-2142.

DOUPE A.J., PATTERSON P.H. and LANDIS S.C. (1985b). Small intensely fluorescent cells in culture : role of glucocorticoids and growth factors in their development and interconversions with other neural crest derivatives. *J. Neurosci.* **5** : 2143-2160.

DUPONT E., RHEAUME E., SIMARD J., VAN LUU-THE, LABRIE F. and PELLETIER G. (1991). Ontogenesis of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase in the rat adrenal as revealed by immunocytochemistry and *in situ* hybridization. *Endocrinology* **129** (5) : 2687-2692.

DUPOUY J.P. (1993). Hormones et grandes fonctions. Tome I Chapitre 3 Ellipses, Edition Marketing.

DUPOUY J.P., COFFIGNY H., MAGRE S. (1975). Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J. Endocrinol.* **65** : 347-352.

EDWARDS A.V. and JONES C.T. (1988). Secretion of corticotropin releasing factor from the adrenal during splanchnic nerve stimulation in conscious calves. *J. Physiol. (London)* **400** : 89-100.

- EHRHART-BORNSTEIN M., BORNSTEIN S.R., SCHERBAUM W.A., PFEIFFER E.F., HOLST J.J. (1991). Role of the vasoactive intestinal peptide in a neuroendocrine regulation of the adrenal cortex. *Neuroendocrinology*. **54** : 623-628.
- EHRlich M.E., EVINGER M.J., JOH T.H. and TEITELMAN G. (1989). Do glucocorticoids induce adrenergic differentiation in adrenal cells of neural crest origin ? *Dev. Brain Res.* **50** : 129-137.
- EL-MAGHRABY M., LEVER J.D. (1980). Typification and differentiation of medullary cells in the developing rat adrenal. A histochemical and electron microscopic study. *J. Anat.* **131** : 103-120.
- ENYEDI O., SZABO B. and SPAT A. (1983). Failure of vasoactive intestinal peptide to stimulate aldosterone production. *Acta Physiologica Hungarica* **61** : 77-79.
- FELDMAN S.C., HARRIS M.R. and LAEMLE L.K. (1990). The maturation of the somatostatin systems in the rat visual cortex. *Peptides* **11**, 1055-1064.
- FERRIERO D.M. and SAGAR S.M. (1987). Development of somatostatin immunoreactive neurons in the rat retina. *Dev. Brain Res.* **34**, 207-214.
- FERRIERO D.M., HEAD V. A., EDWARDS R.H. and SAGAR S.M. (1990). Somatostatin mRNA and molecular forms during development of the rat retina. *Dev. Brain Res.* **57** : 5-19.
- FISCHER-COLBRIE R., IACANGELO A. and EIDEN L.E. (1988). Neural and humoral factors separately regulate neuropeptide Y, enkephalin and chromogranin A and B mRNA levels in rat adrenal medulla. *Proc. Natl. Acad.* **85** : 3240-3244.
- FOSTER G.A., SCHULTZBERG M., DAHL D., GOLDSTEIN M. and VERHOFSTAD A.J. (1985). Ephemeral existence of a single catecholamine synthetic enzyme in the olfactory placode and the spinal cord of the embryonic rat. *Int. J. Devl. Neuroscience* **3** (6) : 597-608.
- FRIED G., MEISTER B., WIKSTROM M. and GOLDSTEIN M. (1989). Galanin-, neuropeptide Y- and enkephalin-like immunoreactivities in catecholamine-storing paraganglia of the fetal guinea pig and newborn pig. *Cell Tissue Res.* **255** : 495-504.
- FRIED G., WILKSTROM L.M., FRANCK J. and ROKAEUS A. (1991). Galanin and neuropeptide Y in chromaffin granules from the guinea-pig. *Acta Physiol. Scand.* **142** : 487-493.
- FUHLENDORFF J., GETHER U., AAKERLUND L., LANGELAND-JOHANSEN N., THOGERSEN H., MELBERG S.G., OLSEN U.B., THASTRUP O. and SCHWARTZ T.W. (1990). [Leu<sup>31</sup>-Pro<sup>34</sup>] Neuropeptide Y : a specific Y1 receptor agonist. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **87** : 182-186.
- GALLO-PAYET N., POTHIER P. and ISLER H. (1987). On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex : their possible role in adrenocortical function. *Biochem. Cell. Biol.* **65** : 588-592.
- GALLOT-PAYET N. (1993). Nouveaux concepts sur la régulation de la sécrétion d'aldostérone ; interactions endocrines, paracrines, autocrines et neurocrines. *Medecines et Sciences* **9** : 943-951.
- GARCIA-ARRARAS J.E., FAUQUET M., CHANCONIE M. and SMITH J. (1986). Coexpression of somatostatin-like immunoreactivity and catecholaminergic

properties in neural crest derivatives : comodulation of peptidergic and adrenergic differentiation in cultured neural crest. *Developmental Biology* **114** : 247-257.

GARCIA-ARRARAS J.E. and MARTINEZ R. (1990). Developmental expression of serotonin-like immunoreactivity in the sympathoadrenal system of the chicken. *Cell Tissue Res.* **262** : 363-372.

GARCIA-ARRARAS J.E., LUGO-CHINCHILLA A.M. and CHEVERE-COLON I. (1992). The expression of neuropeptide Y immunoreactivity in the avian sympathoadrenal system conforms with two models of coexpression development for neurons and chromaffin cells. *Development* **115** : 617-627.

GERSHON M.D., CHALAZONITIS A. and ROTHMAN T.P. (1993). From neural crest to bowel : development of the enteric nervous system. *J. Neurobiol.* **24** : 199-214.

GIBBINS I.L. (1990). Target-related patterns of co-existence of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, enkephalin and substance P in cranial parasympathetic neurons innervating the facial skin and exocrine glands of guinea-pigs. *Neuroscience* **38** (2) : 541-560.

GOEDERT M., REYNOLDS G.P. and EMSON P.C. (1983). Neurotensin in the adrenal medulla. *Neurosci. Lett.* **35** : 155-160.

GONZALO-SANZ L.M., INSAUSTI R. (1976). The structure of the suprarenal venous system and its possible functional significance. *Acta Anat.* **95** : 309-318.

GOZES I. and BRENNEMAN D.E. (1989). VIP : Molecular biology and neurobiological function. *Mol. Neurobiol.* **3** : 201-235.

GUPTA P., FRANCO-SAENZ R. and MULROW P.J. (1992). Regulation of the adrenal renin angiotensin system in cultured bovine zona glomerulosa cells : effect of catecholamines. *Endocrinology* **130** (4) : 2129-2134.

HALL A.K. and LANDIS S.C. (1991). Principal neurons and small intensely fluorescent (SIF) cells in the rat superior cervical ganglion have distinct developmental histories. *J. Neurosci.* **11** : 472-484.

HANSEN B., LIETZKE R., UNSICKER K. and WESTERMANN R. (1992). Developmental and strain-specific heterogeneity of rat adrenal chromaffin cells recognized by a monoclonal antibody against intact chromagranin B. *Int. J. Devl. Neuroscience* **10** (3) : 183-195.

HANUKOGLU I. (1992). Steroidogenic enzymes : structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **43** (8) : 779-804.

HAPPÖLA O., SOINILA S., PAIVARINTA H., JOH T.H. and PANULA P. (1985). Histamine-immunoreactive endocrine cells in the adrenal medulla of the rat. *Brain Research* **339** : 393-396.

HAPPÖLA O. (1988). 5-Hydroxytryptamine immunoreactive neurons and nerve fibers in the superior cervical ganglion of the rat. *Neuroscience* **27** : 301-307.

HARDEBO J.E., SUZUKI N., EKBLAD E. and OWMAN C. (1992). Vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine coexist with neuropeptide Y, dopamine- $\beta$ -hydroxylase, tyrosine hydroxylase, substance P or calcitonin gene-related peptide



in neuronal subpopulations in cranial parasympathetic ganglia of rat. *Cell Tissue Res.* **267** : 291-300.

HASHIMOTO K., MURAKAMI K., HATTORI T., NIIMI M., FUJINO K. and OTA Z. (1984). Corticotropin-releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the adrenal medulla. *Peptides* **5** : 707-711.

HAYCOCK J.W. (1991). Four forms of tyrosine hydroxylase are present in human adrenal medulla. *J. Neurochem.* **56** (6) : 2139-2142.

HELKE C.J., KRAUSE J.E., MANTYH P.W., COUTURE R. and BANNON M.J. (1990). Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons : multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *FASEB J.* **4** : 1606-1615.

HENDRY I.A. (1977). Cell division in the developing sympathetic nervous system. *J. Neurocytol.* **6** : 299-309.

HENION P.D. and LANDIS S.C. (1990). Asynchronous appearance and topographic segregation of neuropeptide-containing cells in the developing rat adrenal medulla. *J. Neurosci.* **10** (9) : 2886-2896.

HENION P.D. and LANDIS S.C. (1992). Developmental regulation of leucine-enkephalin expression in adrenal chromaffin cells by glucocorticoids and innervation. *J. Neurosci.* **12** (10) : 3818-3827.

HIGUCHI H., YOKOKAWA K., IWASA A., YOSHIDA H. and MIKI N. (1991). Age-dependent increase in neuropeptide Y gene expression in rat adrenal gland and specific brain areas. *J. Neurochem.* **57** (6) : 1840-1847.

HINSON J.P. (1990). Paracrine control of adrenocortical function : a new role for the medulla? *J. Endocrinology* **124** : 7-9.

HINSON J.P. and VINSON G.P. (1990). Calcitonin gene related peptide stimulates adrenocortical function in the isolated perfused rat adrenal gland in situ. *Neuropeptides* **16** : 129-133.

HINSON J.P., KAPAS S., ORFORD C.D. and VINSON G.P. (1992). Vasoactive intestinal peptide stimulation of aldosterone secretion by the rat adrenal cortex may be mediated by the local release of catecholamines. *J. Endocrinology* **133** : 253-258.

HO R.H. (1988). Somatostatin immunoreactive structures in the developing rat spinal cord. *Brain Res. Bull.* **21**, 105-116.

HOFLE G., WEILER R., FISCHER-COLBRIE R., HUMPEL C., LASLOP A., WOHLFARTER T., HOGUE-ANGELETTI R., SARIA A., FLEMING P.J. and WINKLER H. (1991). Stimulation of rat adrenal medulla can induce differential changes in the peptide and mRNA levels of chromogranins, neuropeptides and other constituents of chromaffin granules. *Regulatory Peptides* **32** : 321-331.

HÖKFELT T., LUNDBERG J.M., SCHULTZBERG M. and FAHRENKRUG J. (1981). Immunohistochemical evidence for a local VIP-ergic neuron system in the adrenal gland of the rat. *Acta Physiol. Scand.* **113** : 575-576.

HÖKFELT T., ARVIDSSON U., CECCATELLI S., CORTES R., CULLHEIM S., DAGERLIND A., JOHNSON H., ORAZZO C., PIEHL F., PIERIBONE V., SCHALLING M., TERENIUS L., ULFHAKE B., VERGE V.M., VILLAR M., WIESENFELD-HALLIN Z., XU X.-J. and XU Z. (1992). Calcitonin gene-related peptide in the brain, spinal cord, and some peripheral systems. *Annals New York Academy of Sciences* **657** : 119-134.



HOLGERT H., SCHALLING M., HERTZBERG T., LAGERCRANTZ H. and HÖKFELT T. (1991). Changes in levels of mRNA coding for catecholamine synthesizing enzymes and neuropeptide Y in the adrenal medulla of the newborn rat. *J. Developmental Physiology* **16** : 19-26.

HOLST J.J., EHRHART-BORNSTEIN M., MESSELL T., POULSEN S.S. and HARLING H. (1991). Release of galanin from isolated perfused porcine adrenal glands : role of splanchnic nerves. *Am. J. Physiol.* **261** : E34-E40.

HOLT P.G. and OLIVER I.T. (1968). Plasma corticosterone concentrations in the perinatal rat. *J. Biochem.* **108** : 339-341.

HOLZWARTH M.A. (1983). Localization of vasoactive intestinal protein (VIP)-like immunoreactivity in the adrenal cortex and medulla of the rat. *Anat. Rec.* **205** : 84A.

HOLZWARTH M.A. and BROWNFIELD M.S. (1983). Serotonin-immunoreactivity in the adrenal medulla of the rat. *Soc. Neurosci Abstr.* **9** : 388.

HOLZWARTH M.A. (1984). The distribution of vasoactive intestinal peptide in the rat adrenal cortex and medulla. *J. Auton. Nerv. Syst.* **11** : 269-283.

HOLZWARTH M.A., SAWETAWAN C. and BROWNFIELD M.S. (1984). Serotonin-immunoreactivity in the adrenal medulla : distribution and response to pharmacological manipulation. *Brain Res.* **13** : 299-308.

HOLZWARTH M.A. and SAWETAWAN C. (1985). Postnatal development of serotonin in adrenal medullary cells. *Brain Res.* **14** : 15-23.

HOLZWARTH M.A., CUNNINGHAM L.A. and KLEITMAN N. (1987). The role of adrenal nerves in the regulation of adrenocortical functions. *Ann. NY. Acad. Sci.* **512** : 449-464.

HORIUCHI T., TANAKA K. and SHIMIZU N. (1987). Effect of catecholamine on aldosterone release in isolated rat glomerulosa cell suspension. *Life Sci.* **40** : 2421-2428.

HYATT-SACHS H., SCHREIBER R.C., BENNETT T.A. and ZIGMOND R.E. (1993). Phenotypic plasticity in adult sympathetic ganglia in vivo : effects of deafferentation and axotomy on the expression of vasoactive intestinal peptide. *J. Neurosci.* **13** (4) : 1642-1653.

ITO S., IWANAGA T., YAMADA I.Y., SUZUKI T., SUDO N., MOMOTSU T. and SHIBATA A. (1981). Immunohistochemical demonstration of ACTH-like immunoreactivity in the foetal adrenal medulla in the 23rd week of gestation. *Acta Endocrinologica* **97** : 412-418.

JARVI R., HELEN P., PELTO-HUIKKO M. and HERVONEN A. (1986). Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in rat sympathetic neurons and small granule-containing cells. *Neuroscience Letters* **67** : 223-227.

JONAKAIT G.M., ROSENTHALL M. and MORRELL J.I. (1989). Regulation of tyrosin hydroxylase mRNA in catecholaminergic cells of embryonic rat : analysis by in situ hybridization. *J. Histochemistry and cytochemistry* **37**(1) : 1-5.

JOUSSELIN-HOSAJA M. et DERBIN C. (1993). Effets du NGF sur les cellules chromaffines à adrénaline de la médullo-surrénale de lapin greffées dans le cerveau de la souris. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **316** : 259-266.

JU G., HÖKFELT T., BRODIN E., FAHRENKRUG J., FISCHER J. A., FREY P., ELDE R. P. and BROWN J. C. (1987). Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide-, and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells. *Cell Tissue Res.* **247** : 417-431.

KACHI T., SUZUKI T., TAKAHASHI G. and QUAY W.B. (1993). Differences between adrenomedullary adrenaline and noradrenaline cells : quantitative electron-microscopic evaluation of their differential cellular association with supporting cells. *Cell Tissue Res.* **271** : 257-261.

KAMOUN A. (1970). Activité cortico-surrénale au cours de la gestation, de la lactation et du développement pré- et post-natal chez le rat. *J. Physiol.* **62** : 5-32.

KARHULA T., SOINILA S. and HAPPÖLA O. (1993). Comparison of immunohistochemical localization of [MET<sup>5</sup>] enkephalin-ARG<sup>6</sup>-GLY<sup>7</sup>-LEU<sup>8</sup>, vasoactive intestinal polypeptide and tyrosine hydroxylase in the major pelvic ganglion of the rat. *Neuroscience* **54** (1) : 253-261.

KATZ D.M., HE H. and WHITE M. (1992). Transient expression of somatostatin peptide is a widespread feature of developing sensory and sympathetic neurons in the embryonic rat. *J. Neurobiol.* **23** (7) : 855-870.

KEAST J.R. (1991). Patterns of co-existence of peptides and differences of nerve fibre types associated with noradrenergic and non-noradrenergic (putative cholinergic) neurons in the major pelvic ganglion of the male rat. *Cell Tissue Res.* **266** : 405-415.

KESSE W.K., PARKER T.L. and COUPLAND R.E. (1988). The innervation of the adrenal gland. I. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. *J. Anat.* **157** : 33-41.

KLEITMAN N. and HOLZWARTH M.A. (1985a). Catecholaminergic innervation of the rat adrenal cortex. *Cell Tissue Res.* **241** : 139-147.

KLEITMAN N. and HOLZWARTH M.A. (1985b). Compensatory adrenal cortical growth is inhibited by sympathectomy. *Amer. J. Physiol.* **248** : E261-263.

KNIGHT D.S., FABRE R.D. and BEAL J.A. (1989). Identification of noradrenergic nerve terminals immunoreactive for neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in the rat kidney. *Am. J. Anat.* **184** : 190-204.

KOBAYASHI S., OHASHI T., FUJITA T., NAKAO K., YOSHIMASA T., IMURA H., MOCHIZUKI T., YANAIHARA C., YANAIHARA N. and VERHOFSTAD A.A.J. (1983). An immunohistochemical study on the co-storage of Met-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> and Met-Enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup> with adrenaline and/or noradrenaline in the adrenal chromaffin cells of the rat, dog, and cat. *Biomedical Research* **4** (5) : 433-442.

KONDO H., KURAMOTO H. and IWANAGA N. (1984). Immunohistochemical study on Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu-like immunoreactive nerve fibers in the rat adrenal medulla. *Brain Res.* **310** : 371-375.

KONDO H. (1985). Immunohistochemical analysis of the localization of neuropeptides in the adrenal gland. *Arch. Histol. Jap.* **48** (5) : 453-481.

KONDO H., KURAMOTO H. and FUJITA T. (1986). An immuno-electro-microscopic study of the localization of VIP-like immunoreactivity in the adrenal gland of the rat. *Cell Tissue Res.* **245** : 531-538.

KURAMOTO H., KONDO H. and FUJITA T. (1985). Substance P-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intra-adrenal nerve fibers of rats. *Histochemistry* **82** : 507-512.

KURAMOTO H., KONDO H. and FUJITA T. (1986). Neuropeptide tyrosine (NPY)-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and intraadrenal nerve fibers of rats. *The Anatomical Record* **214** : 321-328.

KURAMOTO I., KONDO H. and FUJITA T. (1987). Calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity in scattered chromaffin cells and nerve fibers in the adrenal gland of rats. *Cell Tissue Res.* **247** : 309-315.

LACAZE-MASMONTEIL T. (1992). Les monoxyde d'azote (NO) synthases. *Medecinesciences* **8** : 843-845.

LANDIS S.C. and DAMBOISE S. (1986). Neuron birthdays in the paravertebral sympathetic chain of the rat. *Anat. Rec.* **214** : 71A.

LANDIS S.C., SIEGEL R.E. and SCHWAB M. (1988). Evidence for neurotransmitter plasticity in vivo. II. Immunohistochemical studies of rat sweat gland innervation during development. *Developmental Biology* **126** : 129-140.

LANDIS S.C. (1990). Target regulation of neurotransmitter phenotype. *Trends Neurosci.* **13** (8) : 344-350.

LASLOP A., WOHLFARTER T., FISHER-COLBRIE R., STEINER H.J., HUMPEL Ch. SARIA A., SCHMID K.W., SPERK G. and WINKLER H. (1989). Insulin hypoglycemia increases in the levels of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide, but not of chromogranins A and B, in rat chromaffin granules. *Regulatory Peptides* **26** : 191-202.

LAU C., ROSS L.L., WHITMORE W.L. and SLOTKINS T.A. (1987). Regulation of adrenal chromaffin cell development by the central monoaminergic system : differential control of norepinephrine and epinephrine levels and secretory responses. *Neuroscience* **22** (3) : 1067-1075.

LEBLANC G.G. and LANDIS S.C. (1989). Differentiation of noradrenergic traits in the principal neurons and small intensely fluorescent cells of the parasympathetic sphenopalatine ganglion of the rat. *Developmental Biology* **131** : 44-59.

LEBOULENGER F., CHARNAY Y., DUBOIS P.M., ROSSIER J., COY D.H., PELLETIER G. and VAUDRY H. (1984). Coexistence de neuropeptides et de catécholamines dans la surrenale. Recherche d'effets paracrines sur les cellules corticosurréaliennes. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **45** : 217-227.

LE DOUARIN N.M. and DUPIN E. (1993). Cell lineage analysis in neural crest ontogeny. *J. Neurobiology* **24**(2) : 146-161.

LEON C., GRANT N.J., AUNIS D. and LANGLEY K. (1992a). L1 cell adhesion molecule is expressed by noradrenergic but not adrenergic chromaffin cells : a possible major role for L1 in adrenal medullary design. *Europ. J. Neurosci.* **4** : 201-209.



- LEON C., GRANT N.J., AUNIS D. and LANGLEY K. (1992b). Expression of cell adhesion molecules and catecholamine synthesizing enzymes in the developing rat adrenal gland. *Develop. Brain Res.* **70** : 109-121.
- LESNIEWSKA B., NOWAK M., MISKOWIAK B., NUSSDORFER G.G. and MALENDOWICZ L.K. (1990). Long term effects of neuropeptide Y on the rat adrenal cortex. *Neuropeptides* **16** : 9-13.
- LIM A.T.W. (1985). Ir-CRF release from a subpopulation of rat chromaffin cells : stimulating effect of nicotinic cholinergic agonist. *Endocrinology* **116** : suppl. 4.
- LONGLEY C.D. and WEAVER L.C. (1993). Proportions of renal and splenic postganglionic sympathetic populations containing galanin and dopamine beta hydroxylase. *Neuroscience* **55** (1) : 253-261.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-273.
- LUNDBERG J.M., HÖCKFELT T., HEMSEN A., THEODORSSON-NORHEIM E., PERNOW J., HAMBERGER B. and GOLDSTEIN M. (1986). Neuropeptide Y-like immunoreactivity in adrenaline cells of adrenal medulla and in tumors and plasma of pheochromocytoma patients. *Reg. Peptides* **13** : 169-182.
- Mc CARTY R., KIRBY R.F. and CAREY R.M. (1984). Dopamine may be a neurohormone in rat adrenal cortex. *Amer. J. Physiol.* **247** : E709-E713.
- Mc NICOL A.M. and DUFFY A.E. (1987). A study of cell migration in the adrenal cortex of the rat using bromodeoxyuridine. *Cell Tissue Kinet.* **20** : 519-526.
- Mc PHERSON G.A. (1983). A practical computer-based approach to the analysis of radioligand binding experiments. *Comp. Programs Biomed.* **17** : 107-114.
- MAJANE E.A., ALHO H., KATAOKA Y., LEE C.H. and YANG H.Y. (1985). Neuropeptide Y in bovine adrenal glands : distribution and characterization. *Endocrinology* **117** : 1162-1168.
- MALENDOWICZ LK. (1993). Involment of neuropeptides in the regulation of growth, structure and function of the adrenal cortex. *Histology and Histopathology* **8** : 173-186.
- MALHOTRA R.K, and WAKADE A.R. (1987). Vasoactive intestinal polypeptide stimulates the secretion of catecholamines from the rat adrenal gland. *J. Physiol. (London)*. **388** : 285-294.
- MANNON P.J., MERVIN S.J., TAYLOR I.L. (1991). Solubilization of the neuropeptide Y receptor from rat brain membranes. *J. Neurochem.* **56** : 1804-1809.
- MARGOLIS F.L, ROFFI J. and JOST A. (1966). Norepinephrine methylation in fetal rat adrenals. *Science* **154** : 275-276.
- MARTI E., BIFFO S. and FASOLO A. (1992). Neuropeptide Y m-RNA and peptide are transiently expressed in the developing rat spinal cord. *Neuroreport* **3** : 401-404.
- MARTIRE M. and PISTRITTO G. (1992). Neuropeptide Y interaction with the adrenergic transmission line : a study of its effect on alpha 2 adrenergic receptors. *Pharmacol. Res.* **25** : 203-215.

MAUBERT E., TRAMU G., CROIX D., BEAUVILLAIN J.C. and DUPOUY J.P. (1990). Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide and neuropeptide Y immunoreactivities in the nerve fibers of the rat adrenal gland. *Neurosci. Lett.* **113** : 121-126.

MAUBERT E., CIOFI P., TRAMU G. et DUPOUY J.P. (1991a). Nature catécholaminergique des fibres peptidergiques à NPY et VIP innervant le cortex surrénalien du rat. *Annales d'Endocrinologie* **52**.

MAUBERT E., CIOFI P., TRAMU G. et DUPOUY J.P. (1991b). Expression de somatostatine et de neuropeptide Y dans les dérivés des crêtes neurales à des stades précoces du développement embryonnaire du rat. *Annales d'Endocrinologie* **52**.

MAUBERT E., CIOFI P., TRAMU G., MAZZUCA M. and DUPOUY J.P. (1992a). Early transient expression of somatostatin (SRIF) immunoreactivity in dorsal root during ontogenesis in the rat. *Brain Res.* **523** : 153-156.

MAUBERT E., POLAK J.M., HAYCOCK J.W., CIOFI P., TRAMU G., BERNET F. and DUPOUY J.P. (1992b). A survey of the co-expression of immunoreactivities for tyrosine hydroxylase (TH) with neuropeptides and serotonin (5 HT) between embryonic days E11 and E16 in the rat fetus. *7th International Catecholamine Symposium, Amsterdam*.

MAUBERT E., SLAMA A., EPELBAUM J., TRAMU G., CIOFI P., BEAUVILLAIN J.C., MAZZUCA M., BERNET F. et DUPOUY J.P. (1992c). Somatostatine et neurogenèse chez le rat. *Annales d'Endocrinologie* **53**.

MAUBERT E., DUPOUY J.P. and BERNET F. (1993a). Effect of adrenal demedullation on neuropeptide Y content of the capsule / glomerular zone of the rat adrenal gland. *Neuroscience Letters* **156** : 5-8.

MAUBERT E., DOUTRELANT O., VAROQUEAUX F., TRAMU G., CIOFI Ph. et DUPOUY J.P. (1993b). Etude ontogénétique de la distribution de neuropeptides et d'une activité stéroïdogénique dans la glande surrénale du rat. *Annales d'Endocrinologie* **54** : p. 14 n° S13 .

MAUBERT E., GRENET C., SLAMA A., BEAUVILLAIN J.C., DUPOUY J.P., KORDON C. et EPELBAUM J. (1993c). Etude ontogénétique des récepteurs à la somatostatine au cours du développement embryonnaire du rat : distribution, pharmacologie et caractérisation moléculaire. *Annales d'Endocrinologie* **54** : 1 p. 25 n° 40.

MAURER R. and REUBI J.C. (1986a). Somatostatin receptors in the adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* **45** : 81-90.

MAURER R. and REUBI J.C. (1986b). Distribution and coregulation of three peptide receptors in adrenals. *Eur. J. Pharmacol.* **125** : 241-247.

MAXWELL G.D., SIETZ P.D. and CHENARD P.H. (1984). Development of somatostatin-like immunoreactivity in embryonic sympathetic ganglia. *J. Neurosci.* **4** (2) : 576-584.

MAZZOCCHI G. and NUSSDORFER G.G. (1987). Neuropeptide Y acutely stimulates rat zona glomerulosa in vivo. *Neuropeptides* **9** : 257-262.

MAZZOCCHI G., ROBBA C., MALENDOWICZ L.K. and NUSSDORFER G. (1987). Stimulatory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Biomed. Res.* **8** : 19-23.

MAZZOCCHI G., MALENDOWICZ L.K., MENEGHELLI V. and NUSSDORFER G.G. (1990a). Acute effect of dynorphin on rat adrenocortical secretion in vivo. *Neuroendocrinol. Letters* **12**(2) :95-99.

MAZZOCCHI G., MALENDOWICZ L.K., MENEGHELLI V., KASPRZAK A. and NUSSDORFER G.G. (1990b). Inhibitory effect of dynorphin on the secretory activity of rat adrenal cortex in vivo. *Biomedical Res.* **11** (2) : 125-128.

MAZZOCCHI G., MALENDOWICZ L.K. and NUSSDORFER G.G. (1990c). Endothelin -1 acutely stimulates the secretory activity of rat zona glomerulosa cells. *Peptides* **11** : 763-765.

MAZZOCCHI G., MALENDOWICZ L.K. and NUSSDORFER G.G. (1992). Galanin stimulates corticosterone secretion by isolated rat adrenocortical cells. *Biomedical Res.* **13** (3) :181-184.

MEFFORD I.N., JURIK S., NOYCE N. and BARCHAS J.D. (1983). Analysis of catecholamines, metabolites and sulfate conjugates in brain tissue and plasma by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. In : Parvez S, Nagatsu T, Nagatsu J, Parvez H., eds. *Methods in Biogenic Amine Res.* 101-102. Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam.

MICHEL MC. (1991). Receptors for neuropeptide Y : multiple subtypes and multiple second messengers. *Trends in Pharmacological Sciences* **12** : 389-394.

MICHEL M.C., SCHLICKER E., FINK K., BOUBLIK J.H., GOTHERT M., WILLETTE R.N., DALY R.N., HIEBLE J.P., RIVIER J.E. and MOTULSKY H.J. (1990). Distinction of NPY receptors *in vitro* and *in vivo*. I. NPY (18-36) discriminates NPY receptor subtypes *in vitro*. *Amer. J. Physiol.* **259** : E 131-E 139.

MILKOVIC S., MILKOVIC K. and PAUNOVIC J. (1973). The initiation of fetal adrenocorticotrophic activity in the rat. *Endocrinology* **92** : 380-384.

MILLAR T.J. and UNSICKER K. (1981). Catecholamine-storing cells in the adrenal medulla the pre- and postnatal rat. *Cell Tissue Res.* **217** : 155-170.

MINAMINO H., UEHARA A. and ARIMURA A. (1988). Biological and immunological characterization of corticotropin-releasing activity in the bovine adrenal medulla. *Peptides* **9** : 37-45.

MOREL G., LEROUX P., GARCIA-CABALLERO T., BEIRAS A. and GOSSARD F. (1990) Ultrastructural distribution of somatostatin-14 and 28 in rat adrenal cells. *Cell Tissue Res.* **261** : 517-524.

MULLER J. (1991). Aldosterone biosynthesis in bovine, rat and human adrenal : commonalities and challenges. *Molecular and Cellular Endocrinology* **78** : C119-C124.

MULROW P.J. (1992). Adrenal renin : regulation and function. *Frontiers in Neuroendocrinology* **13**(1) : 47-60.

MUNSON P.J. and RODBARD D. (1980). Ligand : a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal. Biochem.* **297** : 220-229.

NERI G., ANDREIS P.G. and NUSSDORFER G.G. (1990). Effects of neuropeptide Y and substance P on the secretory activity of dispersed zona glomerulosa cells of rat adrenal gland. *Neuropeptides.* **17** : 121-125.



NERI G., ANDREIS PG., MALENDOWICZ L.K. and NUSSDORFER G.G. (1991a). Acute action of polypeptide YY(PYY) on rat adrenocortical cells : In vivo versus in vitro effects. *Neuropeptides* 19 : 73-76.

NERI G., ANDREIS P.G. and NUSSDORFER G.G. (1991b). Comparison of ACTH and corticotropin-releasing hormone effects on rat adrenal steroidogenesis in vitro. *Res. Exp. Med.* 191 : 291-295.

NICHOLSON H.D., SWANN R.W., BURFORD G.D., WATHES D.C., PORTER D.G. and PICKERING B.T. (1984). Identification of oxytocin and vasopressin in the testis and in adrenal tissue. *Regul. Peptides* 8 : 141-146.

NIEL J.P. and JULE Y. (1990). Physiology of mammalian sympathetic ganglia. I. Morphology, integrative role, neuromediators. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 14 : 442-450.

NUSSDORFER G.G., MAZZOCCHI G. (1987). Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates aldosterone secretion by rat adrenal glands *in vivo*. *J. Steroid Biochem.* 26 : 203-205.

NUSSDORFER G.G., MALENDOWICZ L.K., BELLONI A.S., MAZZOCCHI G. and REBUFFAT P. (1988). Effects of substance P on the rat adrenal zona glomerulosa *in vivo*. *Peptides* 9 : 1145-1149.

NUSSEY S.S., ANG V.T.Y., JENKINS J.S., CHOWDREY H.S. and BISSET G.W. (1984). Brattleboro rat adrenal contains vasopressin. *Nature* 310 : 64-66.

OOMORI Y., OKUNO S., FUJISAWA H., ISHIKAWA K., SATOH Y., YAMANO M. and ONO K. (1989). Tyrosine-hydroxylase-immunoreactive nerve fibers in the separated capsule of the rat adrenal gland. *Acta Anatomica* 136 : 49-54.

OOMORI Y., OKUNO S., FUJISAWA H. and ONO K. (1991). Immunoelectron microscopic study of tyrosine hydroxylase immunoreactive nerve fibers and ganglion cells in the rat adrenal gland. *Anat. Rec.* 229 : 407-414.

PADBURY J.F. (1989). Functional maturation of the adrenal medulla and peripheral sympathetic nervous system. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 3 (3) : 689-705.

PATTERSON P.H. (1990). Control of cell fate in a vertebrate neurogenic lineage. *Cell* 62 : 1035-1038.

PELTO-HUIKKO M. (1989) Immunohistochemical localization of neuropeptides in the adrenal medulla. *J. Electron Microscopy Technique* 12 : 364-379.

PHELPS P.E., BARBER R.P. and VAUGHN J.E. (1991). Embryonic development of choline acetyltransferase in thoracic spinal motor neurons : Somatic and autonomic neurons may be derived from a common cellular group. *J. Comp. Neurol.* 307 : 77-86.

PIERIBONE V.A., BRODIN L., FRIBERG K., DAHISTRAND J., SODERBERG C., LARHAMMAR D. and HÖKFELT T. (1992). Differential expression of mRNAs for neuropeptide Y-related peptides in rat nervous tissues : possible evolutionary conservation. *J. Neurosci.* 12 : 3361-3371.

PRATT J.H., TURNER D.A., BOWSHER R.R. and HENRY D.P. (1987). Dopamine in rat adrenal glomerulosa. *Life Sci.* 40 : 811-816.

PROSSER C.L. (1973). Comparative animal physiology. Ed. WB. Saunders Company Philadelphia, London, Toronto.

PURWAR R.S. (1978). Neuro-histochemical study of the adrenal gland of *Rattus rattus rufescens* (Indian black rat) as revealed by cholinesterase technique. *Acta Anat.* **102** : 29-32.

QUINN S.J. (1988). Regulation of aldosterone secretion. *Ann. Rev. Physiol.* **50** : 409-426.

RACZ K., BUU NT. and KUCHEL O. (1983). Free and sulfoconjugated catecholamines in the adrenal medulla and cortex. *Clin. Res.* **31** : 401A.

RAO M.S. and LANDIS S.C. (1993). Cell interactions that determine sympathetic neuron transmitter phenotype and the neurokinins that mediate them. *J. Neurobiol.* **24** (2) : 215-232.

REBUFFAT P., MALENDOWICZ L.K., BELLONI A.S., MAZZOCCHI G. and NUSSDORFER G.G. (1988). Long term stimulatory effect of Neuropeptide-Y on the growth and steroidogenic capacity of the rat adrenal zona glomerulosa. *Neuropeptides* **11** : 133-136.

ROIVAINEN R., PELTO-HUIKKO M., HIETANEN-PELTOLA M. and KOISTINAHO J. (1991). Protein kinase c-b-like immunoreactivity in the developing and adult rat adrenal gland. *Histochemical Journal* **23** : 375-378.

ROTHMAN T.P., SPECHT L.A., GERSHON M.D., JOH T.H., TEITELMAN G., PICKEL V.M. and REIS D.J. (1980). Catecholamine biosynthetic enzymes are expressed in replicating cells of the peripheral but not the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77** (10) : 6221-6225.

RUNDLE S.E., CANNY B.J., ROBINSON P.M. and FUNDER J.W. (1988). Innervation of the sheep adrenal cortex : an immunohistochemical study with rat corticotrophin-releasing factor antiserum. *Neuroendocrinology* **48** : 8-15.

SAITO H., SAITO S., OHUCHI T., OKA M., SANO T. and HOSOI E. (1984). Co-storage and co-secretion of somatostatin and catecholamine in bovine adrenal medulla. *Neurosci. Lett.* **52** : 43-47.

SCHALLING M., DAGERLIND A., BRENE S., HALLMAN H., DJURFELDT M., PERSSON H., TERENIUS L., GOLDSTEIN M., SCHLESINGER D. and HÖKFELT T. (1988a). Coexistence and gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase, tyrosine hydroxylase, and neuropeptide tyrosine in the rat and bovine adrenal gland : effects of reserpine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85** : 8306-8310.

SCHALLING M., SEROOGY K., HÖKFELT T., CHAI S.Y., HALLMAN H., PERSSON H., LARHAMMER D., ERICSSON A., TERENIUS L., GRAFFI J., MASSOULIE J. and GOLDSTEIN M. (1988b). Neuropeptide tyrosine in the rat adrenal gland-immunohistochemical and in situ hybridization studies. *Neuroscience* **24** (1) : 337-349.

SCHALLING M., FRANCO-CERECEDA A., HEMSEN A., DAGERLIND A., SEROOGY K., PERSSON H., HÖKFELT T. and LUNDBERG J.M. (1991). Neuropeptide Y and catecholamine synthesizing enzymes and their mRNAs in rat sympathetic neurons and adrenal glands : studies on expression, synthesis and axonal transport after pharmacological and experimental manipulations using hybridization techniques and radioimmunoassay. *Neuroscience* **41** (2/3) : 753-766.

SCHRAMM L.P., ADAIR J.R., STRIBLING J.M. and GRAY L.P. (1975). Preganglionic innervation of the adrenal gland of the rat : a study using horseradish peroxidase. *Experimental Neurology* 49 : 540-553.

SCHULTZBERG M., LUNDBERG J.M., HÖKFELT T., TERENIUS L., BRANDT J., ELDE R.P. and GOLDSTEIN M. (1978). Enkephalin-like immunoreactivity in gland cells and nerve terminals of the adrenal medulla. *Neuroscience* 3 : 1169-1186.

SEIDL K. and UNSICKER K. (1989). The determination of the adrenal medullary cell fate during embryogenesis. *Dev. Biol.* 136 : 481-490.

SHIMA S., KOMORIYAMA K., HIRAI M. and KUOYAMA H. (1984). Studies on cyclic nucleotides in the adrenal gland. XI. Adrenergic regulation of adenylate cyclase activity in the adrenal cortex. *Endocrinology*. 114 : 325-329.

SHIOSAKA S., TAKATSUKI K., SAKANAKA M., INAGAKI S., TAKAGI H., SENBA E., KAWAI Y. and TOHYAMA M. (1981). Ontogeny of somatostatin-containing neuron system of the rat: Immunohistochemical observations. I. Lower Brainstem. *J. Comp. Neurol.* 203 : 173-188.

SHIOSAKA S., TAKATSUKI K., SAKANAKA M., INAGAKI S., TAKAGI H., SENBA E., KAWAI Y., IIDA H., MINAGAWA H., HARA Y., MATSUZAKI T. and TOHYAMA M. (1982). Ontogeny of somatostatin-containing neuron system of the rat: Immunohistochemical analysis. II. Forebrain and diencephalon. *J. Comp. Neurol.* 204 : 211-224.

SHIOSAKA S. (1992). Ontogeny of the central somatostatinergic system. In Handbook of chemical neuroanatomy (ed. Björklund A., Hökflet T. and Tohyama M.), Vol 10, Ontogeny of transmitters and peptides in the CNS, pp.369-398. Elsevier, Amsterdam.

SLOTKIN T.A. and SEIDLER F.J. (1989). Catecholamines and stress in the newborn. *Molecular Biology of Stress Alan R.Liss, Inc.* : 133-142.

SNYDER S.H. (1992). Nitric oxide : First in a new class of neurotransmitters ? *Science* 257 : 494-496.

SOINILA S., AHONEN M., JOH T.H. and STEINBUSCH H.W.M. (1988). 5-Hydroxytryptamine and catecholamines in developing sympathetic cells of the rat. *J. Autonomic Nervous System* 22 : 193-202.

STOFER W.D. and HORN J.P. (1990). Expression of neuropeptide-Y-like immunoreactivity begins after adrenergic differentiation and ganglionic synaptogenesis in developing bullfrog sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 10 (10) : 3305-3312.

SUZUKI N., HARDEBO J.E., KAHRSTROM J. and OWMAN C. (1990). Neuropeptide Y co-exists with vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine in parasympathetic cerebrovascular nerves originating in the sphenopalatine, otic, and internal carotid ganglia of the rat. *Neuroscience* 36 (2) : 507-519.

TATEMOTO K. (1989). Neuropeptide Y : Isolation, structure and Function. Karolinska Institute Nobel Conference Series. Neuropeptide Y. Raven press, 13-22.

TEITELMAN G., BAKER H., JOH T.H. and REIS D.J. (1979). Appearance of catecholamine-synthesizing enzymes during development of rat sympathetic nervous system : possible role of tissue environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 76 (1) : 509-513.

TEITELMAN G., JOH T.H., PARK D., BRODSKY M., NEW M. and REIS D.J. (1982). Expression of the adrenergic phenotype in cultured fetal adrenal medullary cells : role of intrinsic and extrinsic factors. *Dev. Biol.* **89** : 450-459.

THIEVENT A. and CONNANT J.L. (1993). Calcitonin gene-related peptide innervation and binding sites in rat aorta during development. *J. Auton. Nerv. Syst.* **44** : 233-241.

THOENEN H., OTTEN U. (1978). Role of adrenocortical hormones in the modulation of synthesis and degradation of enzymes involved in the formation of catecholamines. In : Ganong WF and Martini L, eds. *Frontiers in Neuroendocrinology* **5** : 163-184, Raven Press, New-York.

TISCHLER and DeLELLIS R.A. (1988). The rat adrenal medulla. I. The normal adrenal. *J. Amer. Coll. Toxicol.* **7** (1) : 1-21.

TISCHLER A.S. (1989). The rat adrenal medulla. *Toxicologic Pathology* **17** : 330-332.

TISCHLER A.S., RUZICKA L.A. and DELELLIS R.A. (1991). Regulation of neurotensin content in adrenal medullary cells : comparison of PC12 cells to normal rat chromaffin cells in vitro. *Neuroscience* **43** (2/3) : 671-678.

TISCHLER A.S., RISEBERG J.C., HARDENBROOK M.A. and VAN CHERINGTON (1993). Nerve growth factor is a potent inducer of proliferation and neuronal differentiation for adult rat chromaffin cells in vitro. *J. Neurosci.* **13** (4) : 1533-1542.

TOMLINSON A. and COUPLAND R.E. (1990). The innervation of the adrenal gland. IV. Innervation of the rat adrenal medulla from birth to old age. A descriptive and quantitative morphometric and biochemical study of the innervation of chromaffin cells and adrenal medullary neurons in Wistar rats. *J. Anat.* **169** : 209-236.

TORDA T., CRUCIANI R.A. and SAAVEDRA J.M. (1988). Localization of Neuropeptide Y binding sites in the zona glomerulosa of the bovine adrenal gland. *Neuroendocrinology* **48** : 207-210.

TRAMU G., PILLEZ A. and LEONARDELLI J. (1978). An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous location of two antigens by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem* **26** : 322-324.

TSUCHIYA T., SUZUKI Y., OHTAKE R. and SHIMODA S.I. (1990). Changes in adrenal neuropeptides content [peptide 7B2, neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)] induced by pharmacological and hormonal manipulations. *J. Endocrinol. Invest.* **13** : 381-389.

UDELSMAN R., HARWOOD J.P., CHROUSOS G.P., GOLDSTEIN D.S., ZIMLICHMAN R., CATT K.J. and AGUILERA G. (1986). Functional corticotropin releasing factor receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system. *Nature* **319** : 147-150.

UNGAR A. and PHILLIPS J.H. (1983). Regulation of the adrenal medulla. *Physiol. Rev.* **63** : 787-843.

VARNDELL I.M., POLAK J.M., ALLEN J.M., TERENCE G. and BLOOM S.R. (1984). Neuropeptide tyrosine (NPY) immunoreactivity in norepinephrine-containing cells and nerves of the mammalian adrenal gland. *Endocrinology* **114** : 1460-1462.

VERHOFSTAD A.A.J., HÖKFELT T., GOLDSTEIN M., STEINBUSCH H.W.M. and JOOSTEN H.W.J. (1979). Appearance of tyrosine hydroxylase, aromatic amino-acid decarboxylase, dopamine-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyltransferase during the ontogenesis of the adrenal medulla. *Cell Tissue Res.* **200** : 1-13.

VERHOFSTAD A.A.J., STEINBUSCH H.W.M., PENKE B., VARGA J. and JOOSTEN H.W. (1981). Serotonin-immunoreactive cells in the superior cervical ganglion of the rat. Evidence for the existence of separate serotonin and catecholamine containing small ganglionic cells. *Brain Res.* **212** : 39-49.

VERHOFSTAD A.A.J. and JONSSON G. (1983). Immunohistochemical and neurochemical evidence for the presence of serotonin in the adrenal medulla of the rat. *Neuroscience* **10** (4) : 1443-1453.

VERHOFSTAD A.A.J., COUPLAND R.E., PARKER T.R. and GOLDSTEIN M. (1985). Immunohistochemical and biochemical study on the development of the noradrenaline- and adrenaline-storing cells of the adrenal medulla of the rat. *Cell Tissue Res.* **242** : 233-243.

VOLLMER R.R., BARUCHIN A., KOLIBAL-PEGHER S.S., COREY S.P., STRICKER E.M. and KAPLAN B.B. (1992). Selective activation of norepinephrine- and epinephrine-secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. *Am. J. Physiol.* **263** : R716-R721.

WAHLESTEDT C., YANAIHARA N. and HAKANSON R. (1986). Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Peptides.* **13** : 307-318.

WAHLESTEDT C., EDVINSSON L., EKBLAD E. and HAKANSON R. (1987). Effects of neuropeptide Y at sympathetic neuroeffector junctions : existence of Y1 and Y2-receptors. In : *Neuronal messengers in vascular function*, edited by A. Nobin, C. Owman and B. Arneklo-Nobin, NY:Elsevier. Science 231-242.

WATERMAN M.R. and SIMPSON E.R. (1990). Steroidogenic capacity in the adrenal cortex and its regulation. *Progress in Drug Research* **34** : 359-381.

WIDDOWSON P.S. and HALARIS A.E. (1991). Chronic desipramine treatment reduces regional neuropeptide Y binding to Y2-type receptors in rat brain. *Brain Res.* **539** : 196-202.

WURTMAN R.J. (1966). Control of epinephrine synthesis in the adrenal medulla by the adrenal cortex : hormonal specificity and dose-response characteristics. *Endocrinology* **79** : 608-614.

WURTMAN R.J. and AXELROD D. (1966). Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. *J. Biol. Chem.* **241** : 2301-2305.

WONG D.L., LESAGE A., SIDDALL B. and FUNDER J.W. (1992). Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in vivo. *FASEB J.* **6** : 3310-3315.

ZAMIR N., WEBER E., PALKOVITS M. and BROWNSTEIN M. (1984). Differential processing of prodynorphin and proenkephalin in specific regions of the rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81** : 6886-6889.

ZENTEL H.J., NOHR D., MULLER S., YANAIHARA N. and WEIHE E. (1990). Differential occurrence and distribution of galanin in adrenal nerve fibres and medullary cells in rodent and avian species. *Neurosci. Lett.* **120** : 167-170.



**RESUME**

## RESUME

### Chapitre 1 :

**Distribution de messagers chimiques dans la surrénale du rat adulte et au cours du développement embryonnaire.**

**Caractérisation des dérivés sympathosurréaliens.**

#### A - Surrénale du rat adulte.

Nous avons établi que le **Neuropeptide Y (NPY)** est présent dans trois compartiments de la surrénale du rat adulte : des fibres nerveuses capsulo-glomérulaires et médullaires dans lesquelles on ne détecte que le NPY, des neurones ganglionnaires et des cellules chromaffines qui contiennent à la fois le NPY et ses ARN messagers. Le NPY est, en règle générale, le plus abondant des neuropeptides recherchés dans la surrénale adulte. Les cellules chromaffines peuvent également présenter une immunoréactivité pour la **neurotensine (NT)** (généralement de faible intensité), la **Met-enképhaline-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup>** et plus rarement le **Calcitonin-gene related peptide (CGRP)**, la **Galanine (GAL)** et la **Substance P (SP)**. Une colocalisation avec le NPY n'a pas été clairement établie pour ce dernier neuropeptide.

Il existe une variabilité inter-individuelle, parfois importante, quant à la nature et à l'abondance des neuropeptides présents dans les cellules chromaffines et dans les différentes fibres qui les innervent. Cette variabilité est susceptible de rendre compte de données divergentes de la littérature quant à la présence et à l'abondance de neuropeptides surréaliens.

La médullosurrénale reçoit souvent un contingent important de fibres **enképhalinergiques**, **CGRPergiques**, **SPergiques** et **NPY/TH** (tyrosine hydroxylase) et un contingent plus discret de fibres à **GAL**, **CKK<sub>8</sub>** (cholécystokinine) et **VIP** (vasoactive intestinal peptide). Nous avons mis pour la première fois en évidence chez le rat, une innervation **cholécystokininergique (CKK<sub>8</sub>)** de la surrénale intéressant la médulla et le cortex superficiel. L'innervation peptidergique de la surrénale n'est pas homogène ; il existe manifestement une innervation préférentielle des cellules chromaffines noradrénergiques et adrénérgiques par certains types de fibres. Ainsi les îlots de cellules noradrénergiques sont souvent densément innervés



par des fibres à **SP** et ne seraient peu, voire pas, innervés par des fibres **enképhalinergiques** alors que les îlots de cellules adrénérgiques reçoivent préférentiellement une innervation **enképhalinergique** et ne reçoivent pas de dense innervation à **SP**. Sur la base de ces données histologiques, on peut raisonnablement émettre l'hypothèse que cette innervation peptidergique, particulièrement diversifiée par la nature des peptides exprimés, la densité et la distribution des fibres, pourrait intervenir dans le contrôle multifactoriel local de l'activité du tissu chromaffine. On peut aussi envisager que l'expression de certains phénotypes peptidergiques, au sein des cellules chromaffines, soit corrélée avec tel ou tel type d'innervation.

La zone capsulo-glomérulaire reçoit un important contingent de fibres **NPY/VIP/TH**. D'autres fibres plus rares, à **CGRP, CCK<sub>8</sub>, GAL** et **SP** sont également présentes dans cette zone. Ces observations immunohistologiques suggèrent que des peptides associés à des fibres nerveuses peuvent participer localement au contrôle multifactoriel de la production d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée et/ou au contrôle de la circulation locale dans cette zone du cortex. Les neuropeptides libérés dans la zone corticale superficielle pourraient également agir, via la vascularisation de la glande, sur les zones corticales sous-jacentes. Nous rapportons également qu'une réaction histoenzymatique utilisant le NADPH comme cofacteur, est parfaitement corrélée avec l'acquisition des capacités stéroïdogéniques du cortex. Cette réaction paraît être un outil intéressant pour l'étude du tissu stéroïdogénique du cortex surrénalien.

**B - Lignée sympathosurrénalienne au cours du développement embryonnaire.**

Nous avons, à l'aide de techniques immunohistochimiques, entamé la caractérisation des dérivés sympathosurrénaux au cours du développement embryonnaire. Chez le rat, parmi les neuropeptides testés, présents ou non dans les neurones sympathiques de l'adulte, le **NPY** est le premier à apparaître au cours de l'ontogenèse, dans les neurones sympathiques ; son expression semble corrélée avec la diminution de l'intensité du marquage anti-**TH** et/ou à la disparition du marquage anti-SA1 rapportée par ANDERSON et coll. (1991). Le **NPY** n'est pas exprimé dans les cellules précurseurs de la chaîne paravertébrale (CPV) et du système nerveux entérique (SNE). Notre

étude suggère par ailleurs l'implication de la **somatostatine (SRIF)** dans la neurogenèse de la lignée sympathosurrénaliennne (LSS). En effet, dès (ou peu de temps après) l'apparition des cellules précurseurs de la CPV, du SNE ou de la médullosurrénale, des fibres **somatostatinerigiques** sont détectées à leur voisinage alors que ces (ou certaines) cellules subissent d'importants bouleversements phénotypiques. Dans la LSS, la **somatostatine** apparaît peu de temps après le **NPY** dans les neurones sympathiques ; sa distribution, comparée à celle d'un autre marqueur des neurones sympathiques, le **B2** (ANDERSON et coll., 1991), suggère que ce peptide pourrait être utile pour caractériser une différenciation en neurones pour la majorité des dérivés sympathosurréaliens typiques (neurones sympathiques de la CPV, des plexus prévertébraux (PPV) et de la surrénale). Contrairement au **NPY**, la **somatostatine** n'a jamais été détectée dans les dérivés sympathosurréaliens qui ne se différencient pas en neurones (cellules **SIF**, cellules paraganglionnaires et cellules chromaffines). Au cours du développement embryonnaire, la **somatostatine** est transitoirement exprimée dans les neurones sympathosurréaliens, des neurones de la moelle épinière et des neurones sensitifs. Nos observations suggèrent que ce neuropeptide pourrait jouer un rôle majeur dans l'organisation et/ou la différenciation de ces populations neuronales. Cette hypothèse doit néanmoins être soumise à une vérification expérimentale.

La différenciation des neurones de la LSS est marquée par une diminution de l'intensité de l'immunoréactivité pour la **TH**, une expression de **NPY** puis de **SRIF**.

Dans la CPV du tronc, le **VIP** apparaît dans de rares neurones, autour du 15<sup>ème</sup> jour de gestation, plus tardivement que le **NPY** et le **SRIF**, mais avant d'autres neuropeptides présents ou exprimés par des neurones sympathiques de l'adulte (**GAL**, **enképhalines**, **CGRP** et **SP**).

La colonisation de la surrénale s'opère en deux étapes à partir de la CPV. Elle passe par la formation d'un blastème au pôle aortique de la surrénale ; des cellules de ce blastème se différencient en neurones et sont probablement à l'origine du ganglion suprarénal de l'adulte. Compte tenu de l'abondance des neurones intrasurréaliens détectés chez le fœtus, et parfois chez l'adulte, la différenciation des cellules de la LSS ne doit pas être réduite à une différenciation en cellules chromaffines dans un environnement riche en glucocorticoïdes (surrénale fœtale). Les neurones intrasurréaliens pourraient provenir de cellules prédifférenciées et/ou se différencieraient dans la surrénale sous

l'influence de l'innervation **somatostatinerigique**. Ultérieurement malgré l'environnement riche en glucocorticoïdes, les îlots formés par ces neurones sont très importants. Dans la période périnatale, une intense mort neuronale pourrait rendre compte du nombre habituellement modeste (sauf exception) de neurones intrasurréaliens détectés chez l'adulte.

Entre le 15<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour de gestation, le **NPY**, les **enképhalines**, la **PNMT** (phényléthanolamine N-méthyl transférase) et la sérotonine font leur apparition dans les cellules chromaffines. La détection simultanée d'une activité **NADPH-diaphorase** et de gouttelettes lipidiques dans les cellules corticales voisines pourrait constituer un argument nouveau, ou supplémentaire, en faveur d'une intervention des corticostéroïdes dans l'induction de ces phénotypes dans les cellules chromaffines. La **NT** et le **CGRP** sont détectés avant la naissance, contrairement à la **GAL** et à la **SP**. Dès la naissance, différents types de cellules chromaffines peuvent être individualisés d'après la présence ou l'absence de divers marqueurs (**NPY**, **enképhalines**, **CGRP**, **NT**, **PNMT** et sérotonine). Dans la surrénale du fœtus à terme, nous avons mis en évidence la présence de fibres peptidergiques à **NPY** et **CGRP** ; ces neuropeptides pourraient être impliqués dans la différenciation des cellules noradrénergiques et/ou dans la libération du contenu des cellules chromaffines à la naissance.

La signification physiologique de la colonisation de peptides avec les amines biogènes dans la surrénale du fœtus et du nouveau-né est fort mal connue. Ces observations immunohistologiques ouvrent de nouvelles perspectives de recherche en physiologie fœtale et néonatale.

## Chapitre 2 :

**Effets de la démyéllination surrénalienne *in vivo* sur les catécholamines et le NPY de la zone capsulo-glomérulaire.**

La zone capsulo-glomérulaire de la surrénale de rat adulte est richement innervée par des fibres **NPYergiques** et contient des catécholamines (**adrénaline**, **noradrénaline**).

Une semaine après démyéllination surrénalienne unilatérale ou bilatérale, qui exclut la médullosurrénale et la majeure partie de la zone capsulo-glomérulaire, le contenu et la concentration en **adrénaline (A)** sont réduits dans cette zone capsulo-glomérulaire alors que le contenu

en **noradrénaline (NA)** n'est pas significativement affecté. La réduction de la concentration en **NA** a été, par contre, attribuée à une augmentation pondérale post-chirurgicale de cette partie de la surrénale déméduillée (formation de tissu cicatriciel et/ou régénération partielle du cortex). La démédullation unilatérale ne modifie pas significativement les taux plasmatiques de **NA** et d'**adrénaline**. Par contre, la démédullation bilatérale s'accompagne d'une disparition quasi complète de l'**adrénaline** dans la circulation et d'une importante réduction de l'ordre de 50% du taux plasmatique de **NA**.

Ces résultats suggèrent : 1°/ une origine extra-surrénalienne de l'innervation **noradrénergique** de la zone capsulo-glomérulaire du cortex surrénalien de rat adulte et 2°/ Une origine duale de l'**adrénaline** présente dans cette région superficielle de la surrénale ; une partie pourrait provenir de cellules médullosurréaliennes et une partie d'un site extra-surrénalien.

Le contenu et la concentration en **NPY** de la zone capsulo-glomérulaire ont été déterminés par RIA chez des rats adultes non opérés (témoins absolus) et chez des rats adultes opérés, une semaine après démédullation unilatérale. Cette opération entraîne une réduction du contenu et de la concentration en **NPY** de la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale déméduillée par rapport à la zone correspondante de la surrénale contralatérale intacte. Des fibres immunoréactives **NPYergiques**, révélées par immunofluorescence, sont présentes dans la zone capsulo-glomérulaire, aussi bien dans la surrénale intacte que dans la zone contralatérale déméduillée. Néanmoins, après démédullation, quelques secteurs de la zone capsulo-glomérulaire sont dépourvus de fibres **NPYergiques**, alors que celles-ci sont plus nombreuses et plus régulièrement distribuées dans la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale intacte. La population de fibres immunoréactives est plus importante dans cette région de la surrénale, plusieurs semaines après démédullation unilatérale.

Ces résultats suggèrent une origine duale pour les fibres **NPYergiques** qui innervent la zone capsulo-glomérulaire du cortex surrénalien. Une partie pourrait provenir d'une région extra-surrénalienne, peut-être du ganglion suprarrénal ; une autre partie pourrait avoir pour origine les neurones ganglionnaires intrasurréaliens, dotés de **NPY**.



### Chapitre 3 :

#### Récepteurs surrénaliens au NPY. Effets stéroïdogéniques du NPY, du PYY et du VIP sur la zone capsulo-glomérulaire.

L'analyse par Scatchard de la liaison du  $^{125}\text{I}$ -NPY<sub>1-36</sub> sur de membranes, isolées à partir de zones capsulo-glomérulaires de surrénales de rats adultes, révèle la présence de deux types de sites : un de très grande affinité et de faible capacité, un autre de faible affinité mais de forte capacité.

Les effets du NPY<sub>1-36</sub>, de deux analogues structuraux du NPY (Leu<sup>31</sup>-Pro<sup>34</sup> NPY, agoniste spécifique des récepteurs Y<sub>1</sub>-NPYergiques, NPY<sub>18-36</sub>, agoniste spécifique des récepteurs Y<sub>2</sub>-NPYergiques) et du Peptide YY (PYY) sur les sécrétions d'aldostérone et de corticostérone par des zones capsulo-glomérulaires fraîchement isolées, ont été étudiés *in vitro*, en incubation statique. L'effet du VIP a été étudié sur des cellules isolées à partir de zones capsulo-glomérulaires.

Le NPY<sub>1-36</sub>, le peptide Leu<sup>31</sup>-Pro<sup>34</sup> NPY et le NPY<sub>18-36</sub>, mais non le PYY (qui reconnaît les récepteurs Y<sub>1</sub> et Y<sub>2</sub> du NPY mais non les récepteurs Y<sub>3</sub>), induisent une augmentation de la production d'aldostérone dose-dépendante. Tous ces peptides n'affectent pas significativement la production de corticostérone. Le VIP stimule aussi la production d'aldostérone.

Le NPY et ses deux analogues structuraux, de même que le VIP, stimulent aussi la libération de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par les zones capsulo-glomérulaires de surrénales adultes en incubation statique. Un antagoniste  $\beta_1$  adrénergique, mais non un antagoniste  $\beta_2$  adrénergique, à la concentration de  $10^{-7}$  M qui n'affecte pas la production basale de d'aldostérone, supprime l'effet stéroïdogénique du peptide Leu<sup>31</sup>-Pro<sup>34</sup> NPY, du NPY<sub>18-36</sub> et du VIP.

Ces résultats expérimentaux suggèrent : 1°/ l'existence de sites de liaison du NPY de type Y<sub>3</sub> au niveau de la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale de rat adulte ; 2°/ un effet stimulant du NPY et du VIP sur la production d'aldostérone ; 3°/ une implication des récepteurs adrénergiques dans l'action du NPY et du VIP sur la synthèse /libération du principal minéralocorticoïde surrénalien.

Ainsi l'innervation NPYergique et catécholaminergique de la zone capsulo-glomérulaire de la surrénale, caractérisée par immunohistochimie, doit-elle constituer un élément stimulant important

dans le contrôle nerveux et neuroendocrinien de la sécrétion d'aldostérone.