

RECHERCHES
SUR L'INCORPORATION DU RADIO-SULFATE
DANS LA PRÉHYPOPHYSE CHEZ LA SOURIS
IN VIVO ET IN VITRO

PAR

M. DEMINATTI

En des recherches antérieures (1), nous avons rapporté nos résultats de l'étude autoradiographique de l'adénohypophyse de Souris après injection de radio-sulfate. Nous avons déjà précisé dans cette publication la nature histo-chimique des cellules préhypophysaires qui sont le lieu d'une intense fixation de radio-soufre après administration de radio-sulfate. En effet, de l'étude comparative des autoradiographies et des coupes colorées, nous avons pu conclure que les cellules où l'incorporation de ^{35}S est la plus intense sont aldéhyde-fuchsine Gomori positives (A.F.G.⁺), bleu Alcian positives (BA⁺) et acide periodique-Schiff positives (P.A.S.⁺).

Mais, d'une part, la technique autoradiographique ne permet pas de préciser la forme chimique des radioisotopes détectés; d'autre part, on sait que si les tissus de Mammifères ne peuvent métaboliser le soufre minéral, sous forme de sulfate, en soufre organique (2), on constate toutefois que cette transformation est possible au niveau du tube digestif grâce aux bactéries intestinales (2).

C'est pourquoi nous avons cherché à identifier par des méthodes biochimiques et par le test histo-chimique de la méthylation (3) la nature organique ou minérale du radio-

soufre détecté par la technique autoradiographique au niveau des cellules B.A.⁺, P.A.S.⁺, A.F.G.⁺ de la préhypophyse de Souris.

De plus, nous avons étudié par la technique autoradiographique l'incorporation du radio-soufre au niveau de la préhypophyse de Souris placée dans les conditions de la culture organotypique sur milieu semi-synthétique, ce qui permet d'éliminer l'apport éventuel de ³⁵S organique provenant des bactéries intestinales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. — *Préhypophyse in vivo*

Cette étude porte sur 108 Souris mâles et femelles pesant de 18 à 25 g parmi lesquelles 37 ont été utilisées pour l'étude biochimique, 71 ont été soumises à l'étude histoautoradiographique.

Les doses de radio-sulfate injectées par voie intrapéritonéale ont été de 100 à 200 microcuries par Souris et les autopsies pratiquées 24 et 72 heures après l'injection.

a) *Etude histoautoradiographique.*

L'hypophyse et un fragment de rectum de chaque animal ont été fixés au formol à 10 %. Après déshydratation et inclusion à la paraffine, les coupes d'hypophyse et de rectum de chaque animal sont placées côte à côte sur les mêmes lames. Après déparaffinage, les lames sont recouvertes d'une émulsion photographique pelliculaire (AR 10 Kodak).

Pour chaque cas, nous avons soumis un certain nombre de coupes à l'oxydation au permanganate-sulfurique avant l'application de l'émulsion photographique.

Après un temps d'exposition d'un à deux mois, nous avons procédé au développement. Les coupes préalablement oxydées ou non au permanganate-sulfurique sont, après passage dans le formol à 10 % afin de durcir l'émulsion photographique, colorées au B.A. à pH 0.2 puis au glychémalun de Mayer, au glychémalun seul ou au Bleu de Toluidine.

b) *Etude histochimique par le « test de la méthylation ».*

Les coupes d'hypophyse et de rectum provenant du même animal sont réparties sur 9 lames, dont trois servent de témoins, trois sont méthylées à 60° pendant 12 à 24 heures et trois placées dans de l'eau distillée à 60° pendant 12 à 24 heures.

Le procédé de « méthylation » est celui de FISCHER et LILLIE (3). Toutes les lames sont ensuite recouvertes d'une émulsion photographique (AR 10 Kodak). Après un mois d'exposition, nous avons procédé au développement et à la coloration des lames comme ci-dessus.

c) *Etude biochimique.*

L'hypophyse et un fragment de foie provenant du même animal et ayant subi le même traitement que les hypophyses conservées pour l'examen histologique (fixation formol à 10 %, déshydratation à l'alcool, toluène) sont soumis séparément à l'hydrolyse acide (HCl, 6 N pendant 24 heures à 110°). Les hydrolysats radioactifs sont débarrassés de l'acide chlorhydrique par lyophilisation. Chaque résidu sec est dissous dans 0,05 ml d'eau. La solution de chacun des hydrolysats est répartie sur deux bandes de papier à électrophorèse.

Sur une des bandes, nous avons ajouté du $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$. Puis les bandes de papier sont soumises à l'analyse électrophorétique dans les conditions suivantes; acide formique 2 N, 10 volts par cm pendant 1 h. 30.

Dans 3 cas, après traitement par la technique histologique, les broyats non hydrolysés de l'hypophyse et du fragment de foie, ont été répartis séparément sur des bandes de papier à électrophorèse et nous avons ajouté du $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ sur une des deux bandes de chaque organe. Puis les bandes de papier sont analysées par électrophorèse dans les mêmes conditions que ci-dessus. Ceci afin de nous assurer que la fixation histologique a éliminé les éventuels différents composés libres contenant du ^{35}S présents dans la préhypophyse ou le foie avant la fixation au formol.

Dans toutes ces expériences, la détection du ou des composés radioactifs ainsi séparés est obtenue par l'étude autoradiographique des bandes de papier à électrophorèse (film Kodirex, durée d'exposition 1 à 5 mois).

De plus, nous avons coloré à la ninhydrine les bandes de papier pour mettre en évidence les constituants protidiques séparés par l'électrophorèse.

II. — *Préhypophyse in vitro*

Nous avons utilisé la technique de culture organotypique sur gélose de WOLFF et HAFEN (4) en milieu semi-synthétique à 37° (milieu Lépine et gélose à 1 % en quantités égales) selon A. PETROVIC (5).

Après avoir enlevé les lobes postérieur et intermédiaire, les fragments de préhypophyse sont déposés sur le milieu de culture gélosé contenant 5 microcuries de radio-sulfate par ml.

Après des délais de 24 h, 48 h et trois jours, les fragments provenant de la même préhypophyse sont fixés soit au formol à 10 %, soit au Bouin-Hollande modifié d'après HERLANT (6).

Seules les coupes de fragments fixés au formol ont été soumises à l'étude autoradiographique alors que sur les coupes de fragments fixés au Bouin-Herlant, nous avons pratiqué les colorations au B.A., P.A.S. et tétrachromique d'HERLANT (7).

RÉSULTATS

A) *Etude histoautoradiographique de la préhypophyse in vivo.*

Les résultats obtenus sont identiques à ceux présentés par ailleurs (1).

Nous apportons ici certaines précisions grâce à la possibilité de colorer au B.A. les autoradiographies des coupes oxydées au permanganate-sulfurique avant l'application de l'émulsion photographique AR 10. Nous vérifions dans chaque cas que ni l'oxydation préalable des coupes, ni la colo-

ration au B.A. n'entraînent de perte significative de la radioactivité en comparant l'intensité de la radio-activité des coupes oxydées à celle des coupes non oxydées (fig. 1 et 2) et pour une même lame, avant et après la coloration au B.A.

Nous avons pu ainsi constater qu'au niveau d'une même préhypophyse, l'intensité de la radioactivité diffère d'une cellule BA^+ à l'autre: on note, en effet, la présence de cellules

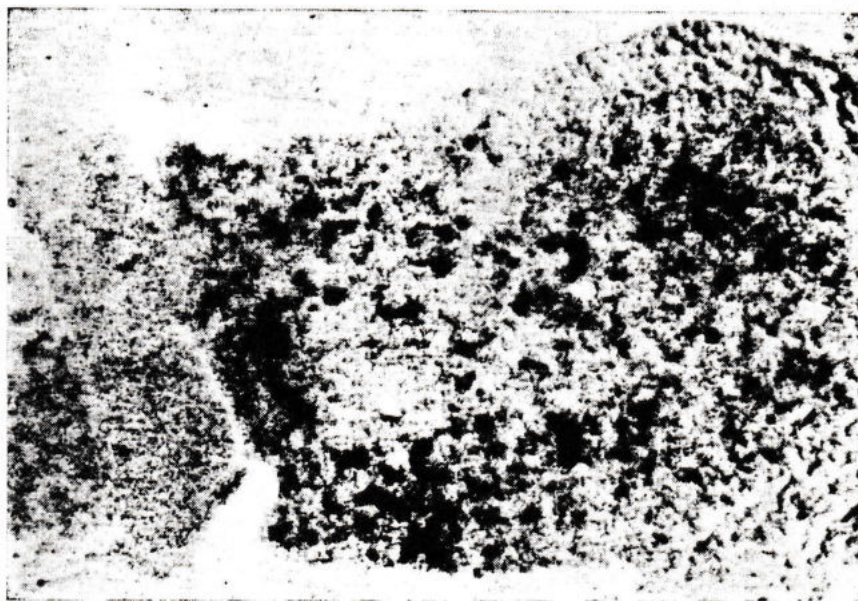


FIG. 1.

Cas 645 — lame 3.

Autoradiographie non colorée du lobe latéral d'une préhypophyse de Souris mâle ayant reçu 100 microcuries de radiosulfate. Autopsie 24 h après l'injection. Lame recouverte par l'émulsion photographique, sans oxydation préalable au permanganate sulfurique.

Noter la présence abondante, dans ce cas, de zones intensément radioactives.

intensément radioactives, le plus souvent peu nombreuses, de cellules faiblement radioactives et de cellules dont l'intensité de la radioactivité est égale à celle des cellules BA^- .

Ces variations de l'intensité de la radioactivité au niveau des cellules BA^+ de la même hypophyse peuvent être dues à des différences qualitatives (8) ou quantitatives du métabolisme des différentes cellules BA^+ ou encore au fait que ces cellules se trouvent à des stades différents d'un même cycle sécrétoire. Quant aux variations, d'un animal à l'autre, du

nombre des cellules BA^+ intensément radioactives, nous ne pouvons en tenir compte, étant donné les conditions de nos expériences: en effet, nous avons injecté la même quantité de radio-sulfate à des souris de poids différents (18 à 25 gr) et les temps d'exposition ne sont pas constants.

Enfin, dans les cas d'autopsie 24 h après l'injection de radio-sulfate, l'intensité de la radioactivité des cellules BA^+

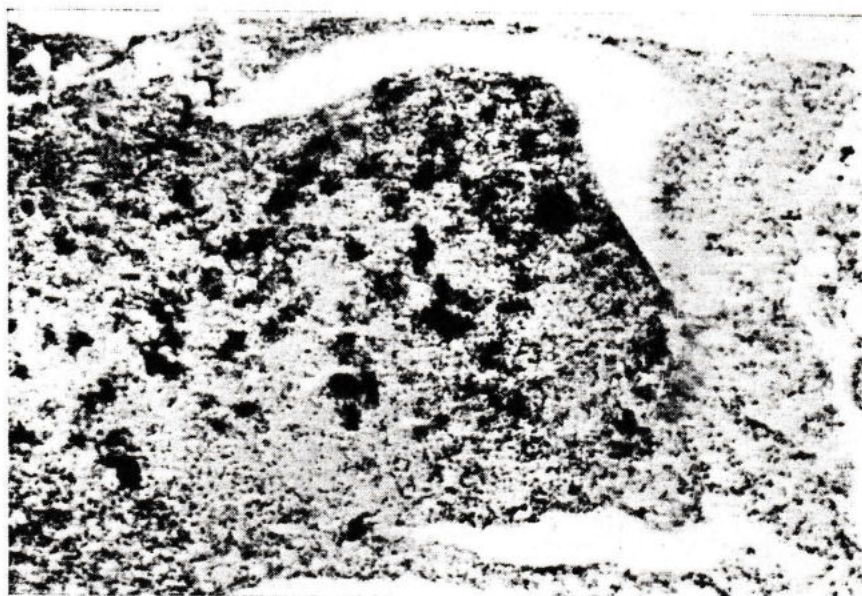


FIG. 2.

Cas 645 — lame 4.

Autoradiographie (même cas que la figure 1) colorée au B.A. à pH 0,2. Lame oxydée au permanganate sulfurique avant l'application de l'émulsion photographique.

Noter, en comparant avec la figure 1, que ni l'oxydation au permanganate-sulfurique, ni la coloration au B.A. n'ont entraîné de diminution appréciable du nombre des grains photographiques.

préhypophysaires apparaît nettement inférieure à celle des cellules à mucus de l'intestin qui sont connues pour leur richesse en mucopolysaccharides sulfatés; par contre, chez les animaux sacrifiés 72 h après l'injection, l'intensité de la radioactivité de certaines cellules BA^+ préhypophysaires, toujours très intense, est supérieure ou égale à celle des cellules à mucus de l'intestin. Ceci indique avec certitude que le renouvellement des groupes sulfatés non libres (cf. l'étude

mais non hydrolysés par HCl, montrent une zone radioactive localisée au trait de départ sur le papier. On exclut l'impossibilité éventuelle de migration des groupements sulfate con-

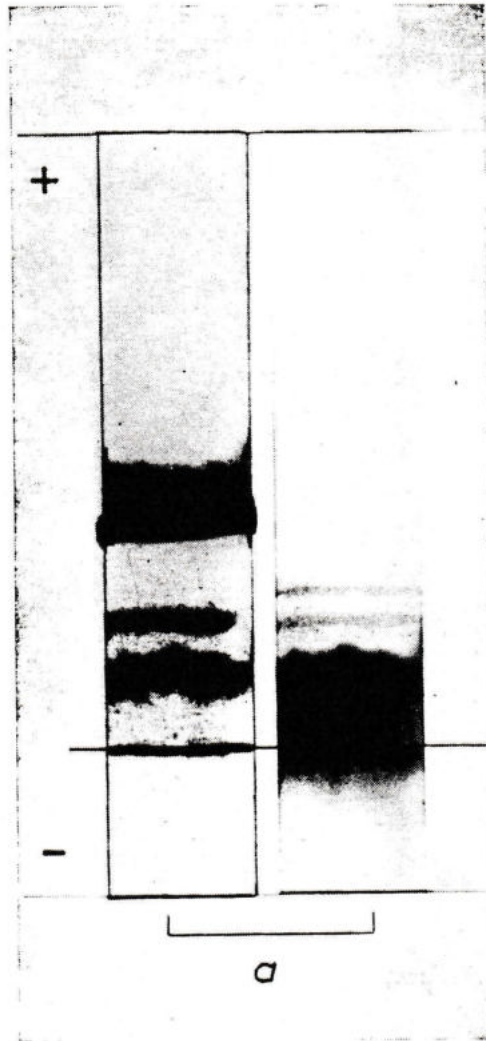


FIG. 4.

Cas N 523

Autoradiographie (à gauche) et bande électrophorétique (à droite) colorée à la ninhydrine d'un fragment de foie provenant du même animal que la figure 3. Noter la présence de zones radioactives ninhydrine-positives.

tenus dans les broyats par le fait que du $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ ajouté aux broyats avant l'électrophorèse a, dans les mêmes conditions, la migration du radio-sulfate témoin.

Après hydrolyse dans 33 cas, l'unique zone radioactive décelable par autoradiographie sur les bandes d'électropho-

rèse d'hypophyses correspond à une substance qui migre de la même façon que le radio-sulfate ajouté à l'hydrolysate avant l'électrophorèse (fig. 3). De plus, cette unique zone radioactive est de nature non protidique ainsi qu'en témoigne le fait qu'elle est dépourvue de matériel ninhydrine positive. Par contre, dans un cas, nous avons observé une zone radioactive supplémentaire de très faible intensité et ninhydrine positive.

Enfin, sur les autoradiographies des bandes d'électrophorèse de foies fixés puis hydrolysés, on observe en plus d'une zone radioactive correspondant à des ions $^{35}\text{SO}_4^-$, plusieurs bandes radioactives ninhydrine-positives (fig. 4).

Ainsi ces résultats indiquent que le ^{35}S décelé sur les histautoradiographies d'hypophyses correspond à du radio-sulfate, mais aussi, pour une faible part, compte tenu du cas unique cité ci-dessus et de l'étude du foie, à du soufre organique de nature protidique. Nous ne pouvons donc pas affirmer la nature exacte du ^{35}S incorporé dans les cellules préhypophysaires BA^+ qui, rappelons-le, sont généralement peu nombreuses.

C'est pourquoi nous avons jugé opportun d'utiliser le « test histochimique de la méthylation », qui a la propriété d'éliminer les groupements sulfates incorporés dans les cellules (9 - 10).

C) *Etude par le test histochimique de la méthylation.*

Alors que les coupes témoins et celles placées dans l'eau distillée à 60° présentent des zones intensément radio-actives correspondant à des cellules BA^+ , on constate au niveau des coupes méthylées l'absence totale de zones intensément radioactives jointe à une disparition quasi totale de la radio-activité aussi bien au niveau des coupes d'hypophyses que des cellules à mucus du tube digestif.

Etant donné la spécificité du « test de la méthylation » vis-à-vis des groupements SO_4 , nous pouvons conclure que le radio-soufre décelé sur les autoradiographies au niveau des cellules BA^+ préhypophysaires correspond en totalité, sinon en presque totalité, à du radio-sulfate.

D) *Culture organotypique de préhypophyse.*

L'examen des fragments préhypophysaires fixés au Bouin-Herlant et colorés par le B.A., P.A.S. ou par la coloration tétrachromique d'Herlant permet de constater que dans les délais de culture utilisés, les explants contiennent les mêmes variétés cellulaires chromophiles que la préhypophyse *in situ* (fig. 5).

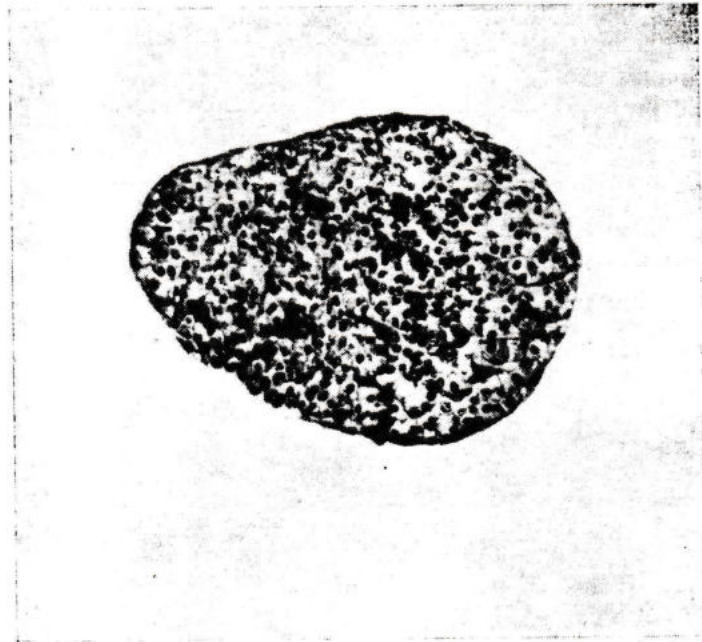


FIG. 5.

Cas 55

Fragment de préhypophyse de Souris mâle fixé au Bouin-Herlant, après 72 h de culture sur milieu contenant 5 microcuries de radiosulfate par ml. Coloration au P.A.S.-glychémalun.

De l'étude des autoradiographies de fragments préhypophysaires cultivés et fixés au formol, nous pouvons conclure que les résultats obtenus *in vitro* sont identiques à ceux obtenus *in vivo*. On observe en effet des zones intensément radioactives qui correspondent à des cellules B.A.⁺, P.A.S.⁺ (fig. 6).

Ces résultats nous permettent donc d'affirmer que certaines cellules préhypophysaires B.A.⁺, P.A.S.⁺ utilisent intensément *in vitro* comme *in vivo* des groupements SO₄

lors de leur métabolisme, contrairement aux autres variétés cellulaires préhypophysaires. En conséquence, ces cellules B.A.⁺ doivent posséder soit électivement, soit à un taux plus élevé par rapport aux autres variétés cellulaires préhypophysaires, les enzymes nécessaires au métabolisme du sulfate.



FIG. 6.

Cas 55

Autoradiographie d'un fragment de préhypophyse (même cas que la figure 5).
Noter la présence de zones intenses radioactives.

CONCLUSIONS

De l'ensemble de ces études histoautoradiographiques, histo-chimiques et biochimiques, nous pouvons conclure à l'intense participation des ions sulfate au métabolisme de certaines cellules B.A.⁺, P.A.S.⁺ de la préhypophyse de Souris, *in vivo* et *in vitro* : ces groupements sulfates étant vraisemblablement liés aux constituants mucopolysaccharidiques contenus dans ces cellules (8).

(Laboratoire d'Histologie et Embryologie I de la Faculté de Médecine de Lille et Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires de Strasbourg.)

BIBLIOGRAPHIE

1. DEMINATTI (M.). — Etude comparative histoautoradiographique et histo-chimique de la préhypophyse, après administration de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$, chez le Cobaye, la Souris et *Carassius auratus*.
Path. Biol., 1962, **10**, 425-428.

2. — in *La biochimie du soufre*, Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, éd., 1956, 244 p.
 3. — in L. LISON. *Histochimie et cytochimie animale*. Gauthier-Villars, Paris, éd., 1960, 842 p.
 4. WOLFF (E.) et HAFEN (K.). — Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires « in vitro ».
Texas Reports of Biology and Medicine, 1952, **10**, 463-472.
 5. PETROVIC (A.). — Recherches sur la préhypophyse en culture organotypique : évolution structurale et action sur les organes effecteurs associés *in vitro*.
Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Alsatia, Colmar, éd., Strasbourg, 1961, 179 p.
 6. HERLANT (M.). — Méthodes nouvelles applicables à l'étude histologique du lobe antérieur de l'hypophyse.
Ann. Endocrinol., 1950, **11**, 644-647.
 7. HERLANT (M.). — Etude critique de deux nouvelles techniques destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentées dans la glande pituitaire.
Bull. Microsc. appl., 1960, **10**, 37-44.
 8. HERLANT (M.). — The cells of the Adenohypophysis and their functional significance.
Internat. Review of Cytology, 1964, **17**, 299-382.
 9. SPICER (S.-S.), SWARM (A.-L.) et BURTNER (H.-J.). — Comparison of basophilia with S-35 Label in normal and methylated mucopolysaccharides.
Labo. Invest., 1961, **2**, 256-264.
 10. DEMINATTI (M.). — Recherches sur le test histochimique de la méthylation appliqué à l'étude de la préhypophyse chez *Carassius auratus*.
C.R. Acad. Sc., Paris, 1963, **256**, 4987-4990.
-