

THÈSES

présentées à la

FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR D'ETAT ES-SCIENCES NATURELLES

par

Marc-Marie DEMINATTI

Docteur en Médecine, Strasbourg (Prix REISS, 1956)
Agrége d'Histologie et Embryologie des Facultés de Médecine

PREMIERE THESE

Recherches sur la présence de groupements sulfates
et leur participation métabolique dans les cellules préhypophysaires

DEUXIEME THESE

Bases chromosomiques de la détermination du sexe chez les vertébrés

Soutenues le 24 mars 1969 devant la Commission d'examen:

- M. J.-H. VIVIEN, Président - Doyen de la Faculté des Sciences
- M. E. FOLLENIUS, Examineur - Professeur à la Faculté des Sciences
- M. J. WEIL, Examineur - Professeur à la Faculté des Sciences
- M. R. HAVEZ, Examineur - Professeur à la Faculté de Médecine.

Doyen : M. le Professeur J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires :

A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT

Professeurs Honoraires :

MM. P. DE BEAUCHAMP	MM. A. KIRRMANN
L. BOISSELET	G. LEMEE
H. CARTAN	P. L'HERITIER
G. CERF	A. LICHNEROWICZ
C. CHABAUTY	L. NEEL
A. CHRETIEN	Ch. SADRON
J. DENY	E. TERROINE
Ch. EHRESMANN	R. THIRY
M. FRECHET	H. VILLAT
Melle S. GILLET	H. WEISS
Mme A. HEE	Et. WOLFF
R. HOCART	J. YVON

Maître de Conférence Honoraire : R. WEIL

Professeurs :

H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
A. ROUSSEL	T.	Calcul différentiel et intégral et théorie des fonctions
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACROUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expéri- mentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mle M. PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Pétrographie
P. JOLY	T.	Biologie générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie

R. ROHMER	T.	Chimie minérale
M ^{lle} A. GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie Biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.P. LONCHAMP	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie
J. COGNE	T.T.P.	Géologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T.T.P.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL	T.	Chimie Biologique
J. PARROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
M ^{me} D. MAGNAC	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
M. ZISMAN	T.T.P.	Mathématiques
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	T.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.P.	Mécanique des Fluides
P. CARTIER	T.	Mathématiques
G. REEB	T.	Topologie
F. NORGUET	T.	Analyse supérieure
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
M ^{me} M. BRINI	P.S.C.	Chimie
G. PERNY	P.S.C.	Physique
R. BARO	P.S.C.	Physique
H. DURANTON	P.S.C.	Botanique
R. WEISS	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSONEGO		Physique

P. GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères Industriels
P.A. MEYER	T.T.P.	Mathématiques
G. WEILL.....	P.S.C.	Physique
J.M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P.S.C.	Chimie
E. FOLLENIUS	P.S.C.	Zoologie
J. LUCAS	P.S.C.	Géologie
G. GLAESER	T.	Mathématiques
J.J. THIEBOLD	P.S.C.	Biologie animale

Professeurs Associés

S.R. DE GROOT.....	Physique
R. MARCHESAULT	Physicochimie macromoléculaire
G. LUMER	Mathématiques
R. MORIARTY	Chimie organique
J. AUSLANDER	Physique corpusculaire

Maîtres de Conférences

H. DANAN	Physique
Mme WINTER Ch.	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
Mme D. CAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
J.H. WEIL	Chimie Biologique
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
D. FOATA	Mathématiques
J.L. VERDIER	Mathématiques
J.M. LEHN	Chimie
Cl. ROBERT	Physique
Fr. LACROUTE	Biologie végétale
M. GOUNOT	Botanique
J. PRADINES	Mathématiques
A. GIRARDIE	Biologie animale
F. BECKER	Physique mathématique
J. DEHAND	Chimie minérale
Cl. GODBILLON	Mathématiques
M. KAROUBI	Mathématiques
A. MIGNOT	Mathématiques appliquées

Maîtres de conférences Associés :

V. AVANISSIAN	Mathématiques
---------------------	---------------

A la mémoire de mon père.

A ma mère

en témoignage de ma filiale affection.

"Les anciens physiologistes semblaient croire que la localisation des fonctions était tout. Quand on avait localisé anatomiquement une fonction ou une maladie, on croyait avoir atteint le but suprême. La fonction s'expliquait ensuite par une entité (force vitale, propriété vitale). La Science moderne a montré qu'il n'en est point ainsi. Quand on a localisé la fonction, il faut descendre dans son explication qui est d'ordre physico-chimique spécial".

Cl. BERNARD

Principes de Médecine Expérimentale
p. XXVI P.U.F. edit. (Paris), 308 p.

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Centre de Recherches Nucléaires de STRASBOURG-CRONENBOURG, grâce à Monsieur le Doyen J.H. VIVIEN, Directeur du Département des Applications Biologiques, qui a mis à notre disposition des locaux modernes et des moyens matériels de travail indispensables.

Nous tenons à assurer de notre profonde reconnaissance notre Maître de la Faculté de Médecine de STRASBOURG, le Professeur Honoraire M. ARON qui guida nos premiers pas dans la recherche scientifique.

Nous remercions Monsieur le Doyen J. CLAVERT qui nous a constamment encouragé et conseillé avec la plus grande sollicitude.

Notre reconnaissance s'adresse à Messieurs les Professeurs E. FOLLENIUS et J. WEIL d'avoir bien voulu nous faire l'honneur d'examiner et de juger le présent travail.

Notre plus vive gratitude s'adresse à Messieurs le Professeur R. HAVAZ et le Docteur R. DESGAND pour leur aide au cours de notre travail.

Nous adressons ici un témoignage de notre vive et amicale reconnaissance à Mademoiselle G. GERLINGER, technicienne au C.N.R.S., qui est associée depuis 1960 à la réalisation de ce travail.

C'est nous acquitter d'un bien agréable devoir que de remercier Mademoiselle M. BUOB pour les travaux de dactylographie, ainsi que Monsieur S. LIESS pour la réalisation des planches photographiques.

Notre plus vive reconnaissance s'adresse au Docteur F. ZADJELA qui nous a initié à la technique histoautoradiographique.

Que les chercheurs et le personnel du Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires trouvent ici l'expression de notre amicale pensée.

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION	1
II - CHOIX DU MATERIEL BIOLOGIQUE	4
III - PLAN	5
IV - DONNEES ANATOMO-MICROSCOPIQUES, HISTOCHIMIQUES ET HISTOPHYSIOLOGIQUES SUR LA PREHYPOPHYSE DES DIFFERENTES ESPECES ETUDIEES.	6
1. Préhypophyse du Cobaye	6
a. Anatomie microscopique	6
b. Les types cellulaires	6
c. Répartition des types cellulaires	7
d. Signification fonctionnelle des types cellulaires	8
2. Préhypophyse de Souris	8
a. Anatomie microscopique	8
b. Les types cellulaires	8
c. Répartition des types cellulaires	10
d. Signification fonctionnelle des types cellulaires	11
3. Préhypophyse de <i>Carassius auratus</i> L.	12
a. Anatomie microscopique	12
b. Les types cellulaires	12
c. Répartition des types cellulaires	13
d. Signification fonctionnelle des types cellulaires	13
4. Préhypophyse de <i>Mollienisia sphenops</i> C.V.	14
a. Anatomie microscopique	14
b. Les types cellulaires	14
c. Répartition des types cellulaires	15
5. Conclusions	
a. Homologies entre les hypophyses des espèces étudiées	15
b. Apports des techniques histochimiques sur la connaissance de l'activité sécrétrice des cellules à granulations glycoprotéiques	19

1) Caractéristiques histochimiques des produits sécrétés	19
2) Etudes histochimiques des modalités quantitatives de fonctionnement des cellules à granulations glycoprotéiques	21
V. BUTS ET NATURE DES RECHERCHES	23
VI. RECHERCHES HISTO AUTORADIOGRAPHIQUES	27
1. Techniques d'observation	27
a. Techniques histologiques et histochimiques ..	27
1) Fixation	27
2) Colorations histologiques	27
3) Colorations histochimiques	27
b. Techniques histoautoradiographiques	28
1) Principe	28
2) Modalités de mise en oeuvre	28
α Autoradiographie en microscopie photonique	28
β Autoradiographie en microscopie électronique	31
3) Ses applications à l'étude de l'adénohypophyse	32
2. Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cobaye	34
a. Buts des recherches	34
b. Matériel biologique et méthodes expérimentales	34
1) Choix et nombre d'animaux	34
2) Nature des radiomolécules utilisées, conditions expérimentales, techniques d'étude	34
α Sulfate de sodium marqué au S-35 ..	34
β DL-méthionine marquée au S-35	35
c. Résultats expérimentaux	35
1) Après injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$	35
2) Après injection de ^{35}S -méthionine	36
3) Etude <u>in vitro</u> en présence de ^{35}S -méthionine	36
d. Conclusions générales	36
3. Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Souris	37
a) Buts des recherches	37
b) Matériel biologique et méthodes expérimentales	38

1) Choix et nombre d'animaux	38
2) Nature des Radiomolécules utilisées, conditions expérimentales	38
α Recherches <u>in vivo</u>	38
β Recherches <u>in vitro</u>	39
c. Résultats expérimentaux	40
1) Etude histoautoradiographique de l'incorporation du radiosulfate dans la préhypophyse, <u>in vivo</u> et <u>in vitro</u> chez la Souris normale	40
α Etude <u>in vivo</u>	40
β Etude <u>in vitro</u>	43
2) Etude histoautoradiographique de l'incorporation du radiosulfate dans la préhypophyse chez la Souris thyroi- dectomisée ou castrée	44
après thyroïdectomie	44
après castration	45
d. Conclusions générales	46
4. Etude histoautoradiographique de l'adénohy- pophyse de <u>Carassius auratus L.</u>	47
a. Buts des recherches	47
b. Matériel biologique et méthodes expérimentales	48
1) Choix et nombre des animaux	48
2) Nature des radiomolécules utilisées, conditions expérimentales	48
c. Résultats	50
1) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprin après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$	50
α Microscopie photonique	50
β Microscopie électronique	51
2) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprin après injection de 35-S-méthionine, 3-H- phénylalanine ou 3-H-leucine	52
3) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprin après injection de D-glucose-6-3-H	53
4) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprin après injection de 3-H-acétate	54
d. Conclusions générales	55
5. Etude histoautoradiographique de l'adénohy- pophyse de <u>Mollienisia sphenops C.V.</u>	55
a. Buts des recherches	55
b. Matériel biologique et méthodes expérimentales	55

1) Choix et nombre des animaux	55
2) Nature des radiomolécules utilisées, conditions expérimentales	56
α sulfate de sodium marqué au 35-S..	56
β DL-méthionine marquée au 35-S.....	56
c. Résultats	56
1) Après injection de radiosulfate	56
2) Après injection de 35-S-méthionine	56
d. Conclusions	57

VII. RECHERCHES HISTOCHIMIQUES

1. Buts des recherches	58
2. Principe du test histochimique de la méthy- lation	58
3. Matériel et méthodes expérimentales	59
4. Résultats expérimentaux	60
a. Chez le Cyprin	60
1) Après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$	60
α Etude de l'action du lavage par l'eau distillée	60
β Etude de l'action de la méthy- lation	61
2) Après administration de 35-S-méthio- nine	61
b. Chez la Souris après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$	63
1) Etude de l'action du lavage à l'eau ...	63
2) Etude de l'action de la méthylation ...	63
5. Conclusions	65

VIII. RECHERCHES BIOCHIMIQUES

1. Recherches biochimiques en vue de l'identifi- cation de la nature chimique du 35-S fixé dans la préhypophyse après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$...	66
a. Buts des recherches	66
b. Principe de la méthode	66
c. Matériel et méthodes	67
d. Résultats	68
1) Chez la Souris	68
2) Chez le Cobaye	69
3) Chez le Cyprin	69
e. Conclusions	70
2. Recherches biochimiques en vue de l'identifi- cation de la nature chimique ou des substrats qui fixent les groupements 35-SO ₄ dans l'adénohypophyse de Cyprin	70

a. Buts des recherches	70
b. Principe des méthodes	72
1) Définition des glycoprotéides sulfatés	72
2) Méthodes de préparation et de fractionnement des glycoprotéides sulfatés	76
α Libération des polysaccharides-peptides	77
β Isolement des polysaccharides-peptides	77
γ Caractérisation et fractionnement des polysaccharides-peptides	78
c. Matériel et méthodes	80
1) Préparation des hydrolysats tissulaires	80
2) Fractionnement de l'hydrolysat	81
3) Caractérisation des sulfoglycopeptides	81
d. Résultats	82
1) Hydrolysat total	82
α Etude des fractions précipitées par le Rivanol à pH 1,5	82
β Fractionnement de l'hydrolysat par chromatographie sur colonne de Biogel P 20	82
γ Isolement des glycopeptides sulfatés par chromatographie sur colonne de DEAE-Séphadex A 25 ..	83
2) Etude du résidu d'hydrolyse	84
e. Conclusions	84

IX - CONCLUSIONS GENERALES	87
----------------------------------	----

BIBLIOGRAPHIE	88
---------------------	----

I - INTRODUCTION

Appelée il y a quelques années "chef d'orchestre" des glandes endocrines, la préhypophyse cède de plus en plus ce rôle à son voisin, le diencéphale. Mais si de nombreux faits tendent de plus en plus à attribuer ce rôle de coordinateur endocrinien au diencéphale, la préhypophyse n'en reste pas moins un des éléments fondamentaux de "l'orchestre endocrinien" par les différentes hormones qu'elle sécrète : thyrostimuline, gonadostimulines, prolactine, corticostimuline, somatotrophine, mélanostimuline.

A cette pluralité d'action physiologique correspond une diversité morphologique des cellules qui la constituent, quelle que soit l'espèce de vertébrés étudiée. Cette diversité a été précisée depuis ROMEIS (1940) par de nombreux auteurs grâce à la mise au point et à l'emploi de nombreuses techniques de colorations histologiques et histochimiques ainsi que par la microscopie électronique : la plupart de ces recherches ayant pour but l'établissement de la signification fonctionnelle de chacune des catégories cellulaires mises en évidence.

L'établissement de la signification fonctionnelle de ces différentes catégories cellulaires repose, en effet, essentiellement sur l'analyse, par ces différentes techniques, de leurs modifications morphologiques, tinctoriales, consécutives à la suppression ou à des modifications fonctionnelles physiologiques, pathologiques ou expérimentales des différents organes effecteurs de la préhypophyse.

Ce problème de l'identification de la nature hormonale de l'activité sécrétrice des différentes cellules préhypophysaires a bénéficié des travaux biochimiques visant à isoler et à analyser la structure des différentes hormones synthétisées par la pars distalis. La connaissance de la nature protéique ou glycoprotéique d'une de ces hormones conduit à admettre que son lieu de synthèse se trouve être dans des cellules que les techniques histochimiques révèlent être à granulations protéiques ou glycoprotéiques suivant la nature biochimique de l'hormone considérée. C'est dans le cadre de l'étude de cette identification que réside l'intérêt de l'emploi des techniques d'ultracentrifugation qui ont pour but de séparer les différents types de granulations chromophiles cytoplasmiques en vue d'analyser la nature hormonale de leur contenu. Les techniques immunologiques ont aussi été largement utilisées pour ce but.

Mais le problème de l'identification de la nature hormonale de l'activité de ces cellules est étroitement lié aux

méthodes d'appréciation des modalités et du degré d'activité sécrétrice et excrétrice de ces cellules. On admet que dans l'activité glandulaire, la sécrétion correspond à la phase de synthèse, ici une substance protéique ou glycoprotéique, l'excrétion correspond au déversement de la substance synthétisée dans le milieu intérieur. Entre ces deux phases, le produit synthétisé peut se trouver sous une forme figurée - granulations - dans le cytoplasme glandulaire, soit parce que dans la cellule les lieux de synthèse et d'excrétion sont éloignés l'un par rapport à l'autre, soit parce que sécrétion et excrétion sont décalées dans le temps. L'augmentation du nombre des granulations intracytoplasmiques dans une même catégorie cellulaire peut résulter, soit d'une intensification globale des processus glandulaires de ces cellules, soit d'une sécrétion augmentée, suivie d'une excrétion lente ou retardée. Par contre, la diminution globale du métabolisme glandulaire ou l'arrêt de la sécrétion ou une excrétion intense, même associée à une sécrétion intense, peuvent entraîner une diminution du nombre des granulations. Il apparaît donc nettement que le nombre de granulations ne peut à lui seul être un critère exact d'appréciation du degré de l'activité glandulaire. C'est pourquoi la connaissance simultanée de la quantité en contenu hormonal de ces cellules, de leur degré d'excrétion dans le milieu intérieur et de leur intensité de synthèse s'avère indispensable : ce qui nécessite la comparaison des résultats obtenus après l'application de procédés permettant la mesure de l'activité physiologique de chacune des hormones avec ceux obtenus par les différentes techniques morphologiques telles que l'histochemie, la microscopie électronique.

Ainsi, la microscopie électronique permet d'apporter un grand nombre de précisions quant aux modalités, à l'échelle ultrastructurale de cette activité glandulaire par l'analyse simultanée de l'état fonctionnel de tous les organites cellulaires à fonction élaboratrice et du produit élaboré sous forme de granulations.

En ce qui concerne l'histochemie dont les techniques sont nombreuses et variées, nous citerons : l'histoenzymologie dont le but est l'identification, la localisation et l'analyse des variations du taux des enzymes qui participent directement ou indirectement à la synthèse de ces hormones ; l'immunofluorescence est utilisée essentiellement pour localiser le lieu de production des hormones ; les colorations histochemiques qui permettent d'identifier la nature et de localiser certains constituants chimiques. Ces différentes techniques histochemiques doivent donc, en premier lieu, être spécifiques de constituants donnés, afin d'être utilisées comme critère quantitatif, direct ou indirect, de l'activité sécrétrice ou excrétrice

des cellules, l'idéal étant que le constituant décelé soit spécifique d'une hormone donnée, par le fait qu'il entre dans la constitution de l'hormone elle-même, tel que l'iode qui peut être radioactif dans la thyroxine (JOLIOT - CURIE et coll., 1944).

Parmi les méthodes histochimiques, nous citerons enfin l'histoautoradiographie, technique qui permet de détecter les radioéléments sur les coupes histologiques et de préciser leur localisation à l'échelle cellulaire et même actuellement ultrastructurale. En effet, l'intérêt de l'emploi en biologie des radioéléments utilisés sous forme de radiomolécules réside dans le fait que ces radiomolécules suivent le sort des molécules chimiquement identiques : d'où la possibilité d'étudier non seulement les mouvements et la répartition de ces molécules dans un organisme ou même dans une cellule, mais aussi, la nature et la cinétique des transformations chimiques dont peuvent être l'objet ces molécules dans un système biologique. C'est donc dans cette possibilité de détection que résident l'avantage et l'intérêt de l'emploi des radiomolécules en biologie. Les différents procédés de détection mettent en oeuvre leurs propriétés physiques ; parmi ces propriétés, nous ne retiendrons que celle du noircissement des émulsions photographiques car c'est cette propriété que les histologistes mettent à profit dans l'histoautoradiographie. Etant donné la transformation métabolique possible et plus ou moins rapide d'une radiomolécule après son injection dans l'organisme, les résultats obtenus avec la technique histoautoradiographique doivent être complétés par une analyse biochimique en vue de rechercher et d'identifier d'éventuels constituants différents de la radiomolécule injectée et possédant le radioélément contenu initialement dans la radiomolécule injectée.

II - CHOIX DU MATERIEL BIOLOGIQUE

Nous avons donc été conduits à utiliser différentes radiomolécules et certaines techniques histochimiques, dont l'histoautoradiographie et le test histochimique de la méthylation, pour tenter d'élucider certains aspects du mode et de la nature du fonctionnement des cellules à granulations glycoprotéiques de la préhypophyse chez différentes espèces de Vertébrés. Nous avons complété ces recherches histochimiques par des analyses biochimiques et par des expériences in vitro.

Nos recherches ont porté sur les espèces suivantes : Cobaye (Cavia Cobaya), Souris blanche (Mus musculus (var. albinos)) et deux Poissons : Cyprin (Carassius auratus L.) et Black Molly (Mollienisia sphenops C.V.).

Les raisons du choix de ces espèces sont variées. En effet, nous avons utilisé en premier le Cobaye car nos recherches antérieures avaient porté sur l'étude cytochimique des acides ribonucléique (DEMINATTI, 1959) et désoxyribonucléique (DEMINATTI et VENDRELY, 1959, 1961) de l'adénohypophyse de cet animal. Mais le Cobaye se prête mal à l'étude du renouvellement du radiosulfate dans l'adénohypophyse car l'analyse biochimique montre la présence de 35-S organique 24 heures après l'injection de radiosulfate.

Par contre, la Souris s'est avérée être un bon matériel, tant du point de vue biochimique que physiologique, pour étudier dans certaines conditions expérimentales le renouvellement du radiosulfate dans la préhypophyse. Mais la préhypophyse de Souris normale, où les cellules riches en radiosulfate sont généralement peu nombreuses par rapport aux autres types cellulaires, nous a paru être un mauvais matériel pour la mise au point des techniques biochimiques d'identification des substances dans lesquelles sont incorporées les molécules de radiosulfate.

C'est sur la préhypophyse du Cyprin que nous avons mené ces recherches d'identification biochimique car, chez ce Poisson, par ailleurs facile à se procurer, les cellules préhypophysaires qui fixent intensément le radiosulfate représentent approximativement la moitié du parenchyme glandulaire et le tissu conjonctif est peu abondant.

Enfin, nous avons étudié la préhypophyse de Mollienisia sphenops C.V. car la préhypophyse de ce Poisson a une structure différente de celle du Cyprin et des recherches sur la "gestation" de ce Poisson ovovivipare nous avaient conduits à examiner des organes maternels dont l'adénohypophyse (DEMINATTI et ZAHND, 1962).

III - PLAN

Le plan de notre exposé est le suivant : afin de situer nos recherches, nous ferons un rappel des données concernant l'anatomie microscopique de l'appareil hypophysaire des espèces étudiées, ainsi que celles portant sur la cytologie, la cytochimie et l'histophysiologie des différentes catégories cellulaires adénohypophysaires.

Puis, pour chacun des types de recherches effectuées : recherches histoautoradiographiques, histochimiques avec le test de la méthylation et biochimiques, nous apporterons des précisions sur les méthodes d'étude, le matériel biologique ainsi que les conditions expérimentales utilisés pour chacune des espèces et la nature des radiomolécules employées. Ces données seront suivies des résultats obtenus.

Enfin, nous dégagerons les conclusions et les perspectives de recherches qu'imposent nos observations.

IV - DONNEES ANATOMO-MICROSCOPIQUES, HISTOCHIMIQUES ET HISTOPHYSIOLOGIQUES SUR LA PREHYPOPHYSE DES DIFFERENTES ESPECES ETUDIEES

Les travaux portant sur l'histochimie et l'histophysiologie des différentes préhypophyses étudiées étant très abondants, nous ne retiendrons que ceux directement en rapport avec nos recherches.

Nous rapporterons donc successivement les techniques cytochimiques d'étude et les données ainsi obtenues sur la préhypophyse de chacune des espèces étudiées. Nous terminerons par une étude comparative des propriétés histochimiques des différentes cellules préhypophysaires de ces espèces. De plus, pour chaque espèce, nous rappellerons les données histophysiologiques portant sur les cellules à granulations glycoprotéiques en rapport avec nos recherches.

1. PREHYPOPHYSE DU COBAYE

a. Anatomie microscopique

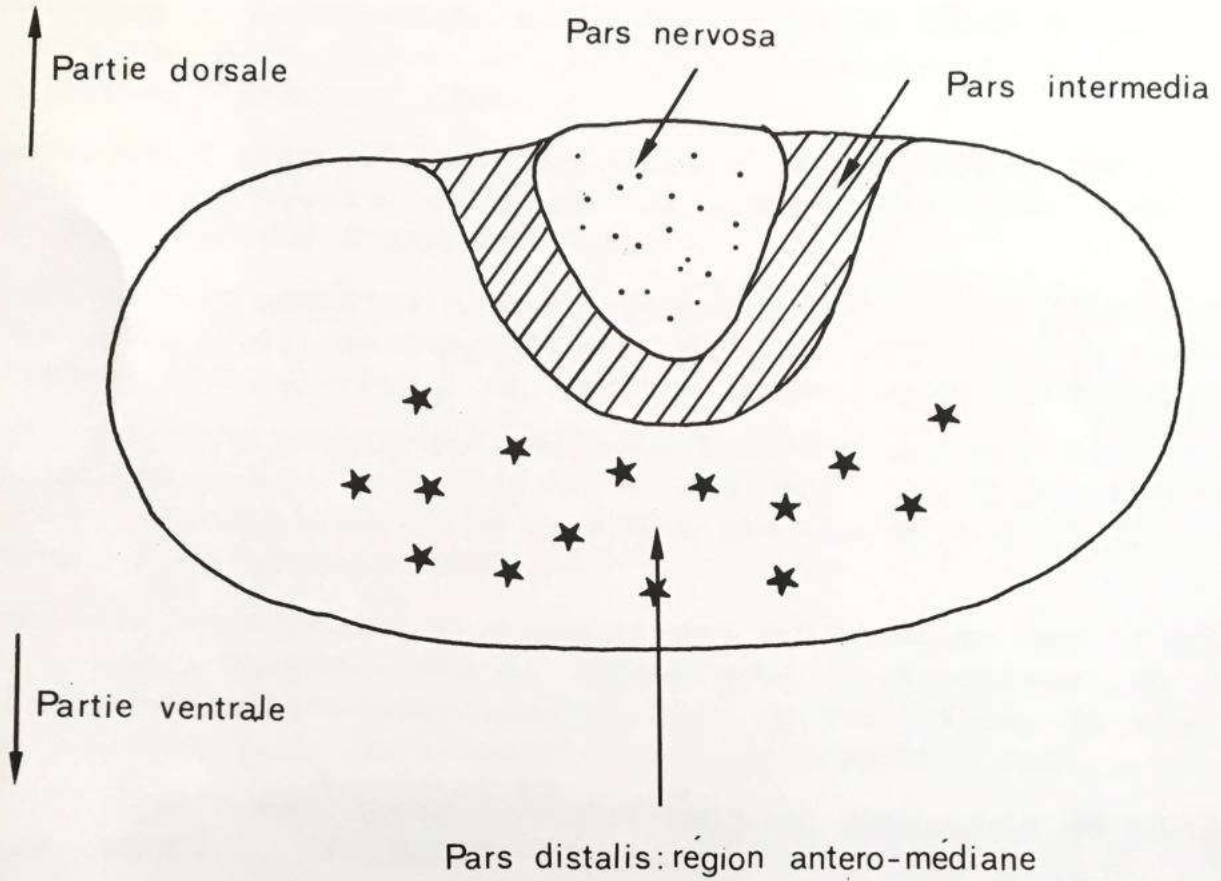
L'appareil hypophysaire du Cobaye est constitué d'arrière en avant : la post-hypophyse, en avant de laquelle se trouve la pars intermedia séparée de la pars distalis par la fente hypophysaire. La pars distalis est formée de 2 lobes latéraux réunis dans la région médiane par une portion glandulaire (Planche I).

b. Les types cellulaires

L'utilisation d'une coloration trichromique telle que celle d'IGNESTI (1946) met en évidence trois types cellulaires :

- des cellules chromophobes ou principales à cytoplasme dépourvu de granulations ;
- des cellules contenant des granulations chromophiles, acidophiles, fuchsinophiles (PETROVIC, 1953), plus ou moins abondantes ;
- des cellules chromophiles cyanophiles à noyau souvent polyploïde (DEMINATTI et VENDRELY, 1959, 1961) appelées incorrectement "basophiles" (DECLIN, 1940 - RACADOT, 1949 - DEMINATTI, 1959, - PETERSON et WEISS, 1955).

C'est grâce à l'analyse comparative des résultats obtenus avec des colorations plus complexes telle la coloration



★ : cellules PAS+ BA+ AF+

∴ : lobe nerveux

/// : lobe intermédiaire

tétrachromique d'HERLANT (1960) et des colorations histochimiques à l'acide périodique-Schiff (PAS), au bleu Alcian à pH 0, 2 (BA) et à l'aldéhyde fuchsine de Gomori (AF) (BIMES et coll., 1953 ; REBEL, 1961) que l'on peut préciser les variétés de granulations chromophiles suivant leurs affinités tinctoriales et leurs caractères histochimiques (PETROVIC, 1961) :

- cellules à granulations ayant une affinité élective pour l'erythrosine, mais PAS et BA-négatives : cellules ζ de la nomenclature d'HERLANT (1960) ;
- cellules à granulations colorables spécifiquement par l'orange G et PAS, BA-négatives comme les précédentes : cellules α de la nomenclature d'HERLANT (1960) ;
- cellules cyanophiles à granulations d'une teinte bleu violacé, PAS-positives, BA-positives et AF-positives : elles correspondent aux cellules β de la classification de ROMEIS (1940) ;
- cellules à granulations colorées électivement par le bleu d'Alizarine avec la coloration tétrachrome d'HERLANT,, légèrement PAS-positives, AF-négatives : ce seraient les cellules γ de la classification de ROMEIS (1940) ;
- cellules cyanophiles à granulations colorées en bleu ciel, PAS-positives, BA-positives et intensément AF-positives. De plus, elles sont métachromatiques au bleu de Toluidine. Il s'agirait de cellules δ de la classification de ROMEIS (1940).

Ces types cellulaires sont retrouvés en microscopie électronique (PETROVIC, 1961).

Ainsi, sur la base de l'analyse histochimique, les cellules préhypophysaires, chez le Cobaye, peuvent être classées en deux groupes :

- . groupe des cellules à mucoprotéines (HERLANT, 1964) ou cellules "mucoides" (PEARSE, 1952)
 - cellules δ : intensément PAS+, BA+, AF+.
 - cellules β : PAS+, BA+, AF+.
 - cellules γ : légèrement PAS+, AF-.
- . groupe des cellules à granulations protéiques
 - cellules α } PAS-, BA-, AF-.
 - cellules ζ }

c. Répartition des types cellulaires.

L'étude de la répartition de ces types cellulaires montre, en ce qui concerne les cellules cyanophiles, qu'elles sont abondantes dans la région antéro-médiane de la préhypophyse,

alors que les régions postérieures des lobes latéraux en sont pratiquement dépourvues : cette répartition particulière a d'ailleurs été utilisée pour l'étude du problème de la signification fonctionnelle des différents types cellulaires (ARON et PETROVIC, 1959, 1960).

d. Signification fonctionnelle des types cellulaires

Les problèmes de cytophysiologie sont loin d'être résolus chez le Cobaye.

Si la sécrétion de la thyroostimuline peut être attribuée aux cellules à granulations AF+ (REBEL, 1961 - PETROVIC, 1961), les observations de D'ANGELO (1953, 1963, 1966) consécutives à la thyroïdectomie chimique seule ou associée à la castration ne sont pas en faveur de cellules AF+, PAS+ différentes produisant respectivement la thyroostimuline et les gonadostimulines. De plus, la thyroïdectomie chirurgicale (REBEL, 1961) ou la thyroïdectomie chimique par le propylthiouracile (PTU) (D'ANGELO, 1963) ne provoquent pas l'apparition de cellules dites de thyroïdectomie dans la préhypophyse, mais entraînent une augmentation du nombre des cellules AF+ qui restent riches en granulations AF+. Alors que REBEL (1961) ne constate pas d'augmentation concomitante du pouvoir thyroostimulant des broyats hypophysaires, du sérum et des urines des animaux thyroïdectomisés, D'ANGELO (1953, 1963), par contre, trouve une excellente corrélation entre le taux des granulations AF+ et le taux d'hormone thyroéotrope.

C'est donc par analogie avec d'autres espèces de Mammifères que l'on attribue la sécrétion d'une hormone donnée à chacun de ces types cellulaires observés chez le Cobaye.

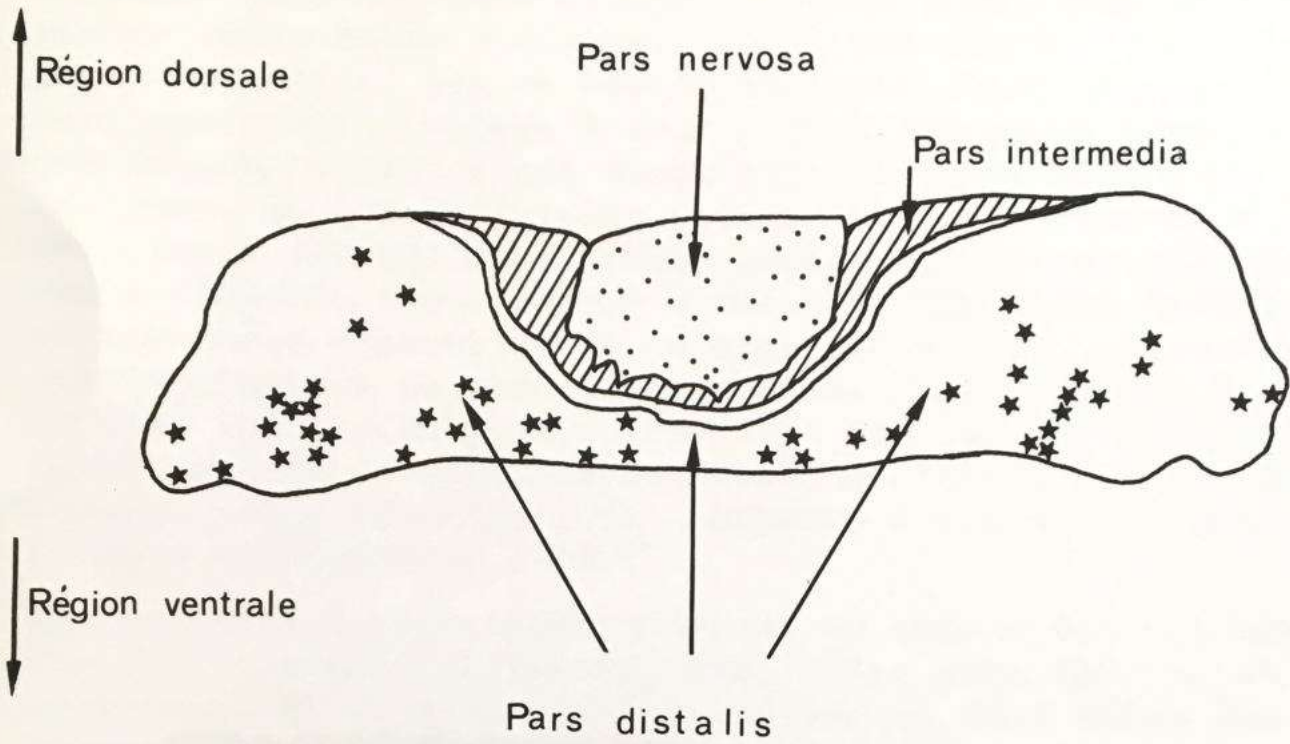
2. PREHYPOPHYSE DE SOURIS

a. Anatomie microscopique (Planche II).

L'appareil hypophysaire de la Souris est analogue à celui du Cobaye.

b. Les types cellulaires

La comparaison des résultats obtenus avec les colorations de microscopie optique et ceux de la microscopie électronique (SANO, 1962 - BARNES, 1962) permet d'identifier, comme chez le Cobaye, cinq types cellulaires qui se classent en cellules cyanophiles à granulations glycoprotéiques et cellules acidophiles à granulations non glycoprotéiques (HALMI, 1952 - SIPERSTEIN, 1955 - ELFTMAN et WEGELIUS, 1959). Ces types



* : cellules PAS+ BA+ AF+

::: : Pars nervosa

/// : Pars intermedia

cellulaires sont désignés soit par la nomenclature de ROMEIS-HERLANT (BARNES, 1962), soit par la nomenclature fonctionnelle (BARNES, 1963).

- Les cellules séreuses α appartiennent au groupe des cellules acidophiles. Elles présentent une forte affinité pour les colorants très acides (érythrosine, fuchsine acide, orange G) employés dans les colorations trichromiques. Lors de la coloration tétrachrome d'Herlant, elles ont une affinité élective pour l'orange G. Les colorants basiques (bleu de méthylène) utilisés seuls révèlent à leur niveau des structures basophiles non métachromatiques qui disparaissent après action de la ribonucléase, ce qui indique la nature ergastoplasmique de ces structures (PETERSON et WEISS, 1955). La microscopie électronique (BARNES, 1963) permet d'observer une forme hyperactive et une forme hypoactive de ce type cellulaire, caractérisé par la présence de granulations d'une taille de 350 à 400 μ et même 500 μ . De plus, elles sont PAS, BA, AF-négatives. Cette variété de cellules est absente chez la Souris génétiquement naine (ORTMAN, 1956 - RENNELS et Mc NUTT, 1958 - ELFTMAN et WEGELIUS, 1959).
- Les cellules ξ appartiennent aussi au groupe des cellules acidophiles ; comme les précédentes, elles sont PAS, BA et AF-négatives. Elles s'en distinguent par le fait qu'en utilisant la coloration tétrachrome d'Herlant (1960), elles ont une affinité élective pour l'érythrosine. BARNES (1962, 1963) les identifie, en microscopie électronique, par la présence dans la zone golgienne de granulations ovales dont les dimensions sont de 200 à 400 μ sur 100 à 200 μ . De plus, la présence de structure ergastoplasmique conduit à admettre qu'elles sont, comme les cellules α , le lieu de synthèse d'une hormone protéique.
- Les cellules β (BARNES, 1962) sont PAS-positives. Avec la coloration associée BA-PAS d'Herlant (1958), elles ont une teinte violette, ce qui indique qu'elles sont faiblement BA+. Les granulations visibles en microscopie électronique (BARNES, 1962) de la taille de 150 à 250 μ n'ont pas de localisation particulière.
- Les cellules γ sont, comme les précédentes, PAS-positives, mais BA-négatives car elles se colorent en rouge avec la coloration associée BA-PAS d'Herlant (1958) ; elles contiennent des granulations de 100 à 200 μ de diamètre, parfois 300 μ , situées le plus souvent à la périphérie du cytoplasme (BARNES, 1962).
- Les cellules δ sont peu abondantes et ont un aspect polygonal. Elles sont PAS, BA, AF-positives (ISRAEL et ELLIS, 1961 MESSIER, 1961). Avec la coloration associée au BA-PAS, elles

présentent une teinte bleue. Elles se différencient des autres cellules cyanophiles par la coloration de PAGET et ECCLESTON (1960) L'étude au microscope électronique montre la présence de granulations intracytoplasmiques de 50 à 100 m μ de diamètre sans localisation spéciale. Elles apparaissent pauvres en mitochondries et le réticulum endoplasmique est peu développé (BARNES, 1962).

Enfin, dans chacune de ces catégories cellulaires, la microscopie électronique permet de décrire une forme hypoactive et une forme hyperactive (BARNES, 1963).

A ces cinq types cellulaires, il faut en ajouter un sixième formé des cellules chromophobes et cellules indifférenciées donc dépourvues de granulations. Ces cellules, abondantes en microscopie optique, sont très rares en microscopie électronique. Ceci, pour la simple raison qu'une cellule très pauvre en granulations sera classée parmi les chromophobes en microscopie optique. Ces cellules chromophobes appartiennent sans doute à chacune des cinq catégories cellulaires précédentes (BARNES, 1962).

Ainsi, sur la base de certains caractères histo-chimiques, les cellules préhypophysaires, chez la Souris, peuvent, comme chez le Cobaye, être classées en deux groupes :

. Groupe des cellules à mucoprotéines

- cellules δ : PAS+, BA+, AF+
bleues en utilisant la coloration associée BA-PAS
- cellules β : PAS+, faiblement BA+ et AF+
violettées en utilisant la coloration associée BA-PAS
- cellules γ : PAS+, BA-, AF-
rouges en utilisant la coloration associée BA-PAS

. Groupe des cellules à granulations protéiques

- cellules α } PAS-, BA-, AF-
- cellules ξ }

c. Répartition des types cellulaires

Les cellules δ (MESSIER, 1965) plus abondantes dans la région ventrale que dans la région dorsale de la glande s'observent principalement dans les lobes latéraux. Peu nombreuses par rapport à l'ensemble des autres cellules (0,43 %), elles

représentent 0,87 % des cellules sur une section passant par la région moyenne des lobes latéraux.

En ce qui concerne les variations numériques des cellules β et γ , BARNES (1962, 1963) a observé non seulement des différences entre les préhypophyses mâle et femelle, mais aussi des fluctuations numériques et fonctionnelles de certaines cellules à granulations glycoprotéiques (β et γ) en rapport avec le cycle oestral chez la Souris femelle. C'est en raison de ces fluctuations chez la femelle que, dans nos expériences, nous avons utilisé surtout des souris mâles adultes, dont la préhypophyse est caractérisée par la présence de cellules β plus nombreuses que les cellules γ , les deux variétés cellulaires se trouvant à différents stades de leur cycle sécrétoire.

d. Signification fonctionnelle des types cellulaires

On attribue aux cellules δ la sécrétion de la thyroestimuline, d'où leur dénomination de cellules thyrotropes (BARNES, 1963 - MESSIER, 1965). En effet, la radiothyroïdectomie par l'I-131 (GOIDBERG et CHAIKOFF, 1951 - BURT et coll., 1954 - MESSIER, 1966) ou la thyroïdectomie chimique avec le propylthiouracile (PTU) (BARNES, 1963) entraînent, dans la préhypophyse, l'apparition de grandes cellules dites "cellules de thyroïdectomie" aux dépens des cellules δ dont le nombre diminue. En effet, de 0,87 % chez les animaux témoins, le nombre des cellules BA+ tombe à 0,11 % entre le 20e et le 30e jour après la radiothyroïdectomie (MESSIER, 1966). Ces "cellules de thyroïdectomie" ou cellules thyrooprives sont caractérisées par la disparition presque totale des granulations spécifiques BA+ (BURT et coll., 1954 - HALMI et GUDE, 1954 - BARNES, 1963 - MESSIER, 1966) ; en même temps, on observe une augmentation du taux sérique de la thyroestimuline (ADAMS, 1946) : ces deux phénomènes sont interprétés comme étant en rapport avec une sécrétion et une excrétion accrues de thyroestimuline sans stockage hormonal intracellulaire. Signalons enfin que cette corrélation entre le pouvoir thyroestimulant de la préhypophyse et le nombre des cellules est confirmée par le fait que, chez les Souris génétiquement naines, la diminution de ce pouvoir thyrotrope est associée à une diminution du nombre et de la taille des cellules δ qui sont pauvres en granulations (ORTMAN, 1956).

Les gonadostimulines folliculostimulante et lutéinisante seraient sécrétées respectivement par les cellules β et α qui subissent des modifications spécifiques et caractéristiques après la castration. En effet, 5 semaines après la castration, chez le mâle, on observe une hypertrophie de ces cellules en rapport avec leur hyperactivité glandulaire. La microscopie électronique (BARNES, 1963) montre, en effet, que les cellules β présentent alors un réticulum endoplasmique abondant constitué de

sacculles de forme irrégulière avec, sur leurs parois externes, des grains de Palade. On note la présence d'inclusions cytoplasmiques granulaires ou amorphes dont la densité est variable. De même, dans les cellules γ , les granulations visibles chez les témoins sont généralement moins nombreuses ; le réticulum endoplasmique apparaît formé de nombreux sacculles distendus mais à parois lisses, contrairement aux cellules β , l'appareil de Golgi est hypertrophié.

3. PREHYPOPHYSE DE CARASSIUS AURATUS L.

a. Anatomie microscopique (Planche III)

L'appareil hypophysaire de Carassius auratus comprend la neurohypophyse ou lobe nerveux et la préhypophyse ou adénohypophyse.

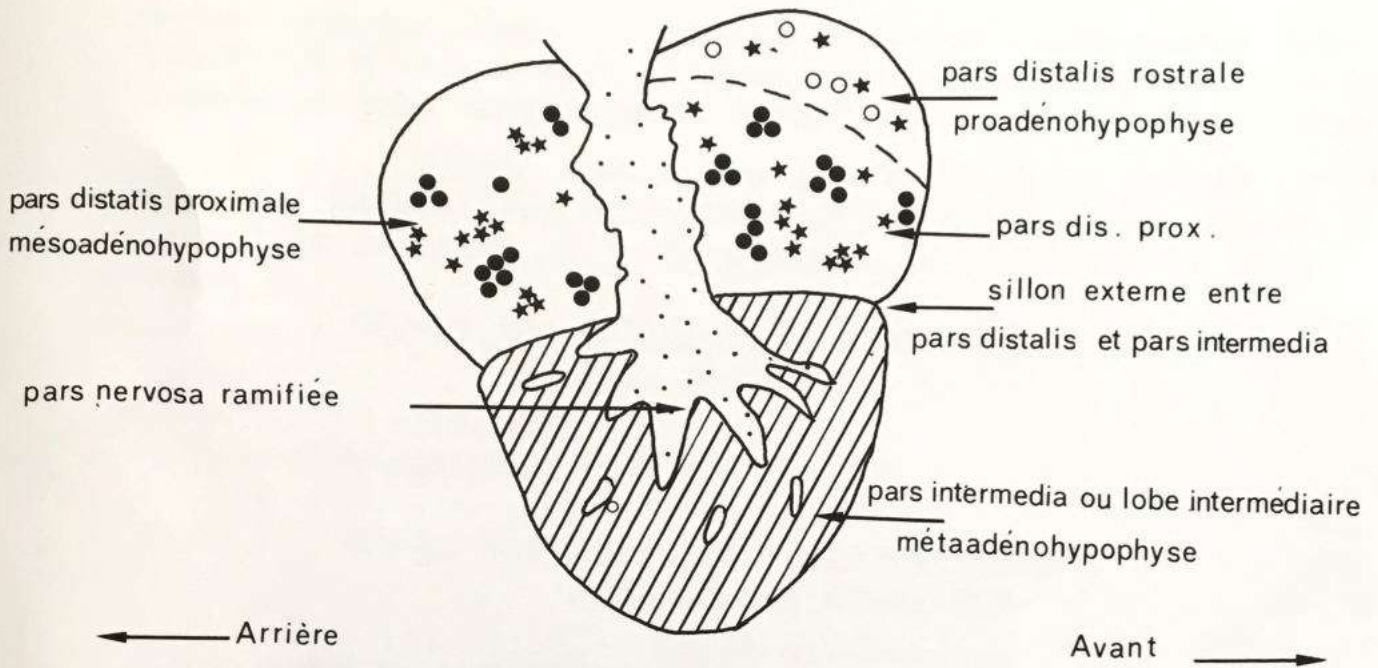
Cette dernière est constituée du lobe intermédiaire ou pars intermedia ou métaadénohypophyse selon la terminologie de PICKFORD et ATZ (1957) et du lobe distal ou pars distalis.

La pars distalis (OLIVEREAU, 1962) comprend : une région rostrale, antéro-dorsale, composée surtout de petites cellules érythro-sinophiles et de quelques cellules PAS+, qui correspond à la proadénohypophyse selon la terminologie de PICKFORD et ATZ (1957) ; une région proximale, médio-ventrale, composée de cellules PAS+ et de cellules colorables par l'orange G et qui correspond à la mésoadénohypophyse de PICKFORD et ATZ (1957).

b. Les types cellulaires

Si trois principaux types cellulaires sont connus depuis les travaux de BELL (1938), LEVENSTEIN (1939) et SCRUGGS (1951), l'application des techniques histologiques (tétrachrome d'Herlant, PAS, BA, AF) utilisées pour l'étude de la préhypophyse de Mammifères a permis de retrouver chez Carassius des variétés cellulaires ayant les mêmes caractères que ceux décrits chez les espèces précédentes (OLIVEREAU, 1962, 1963).

- Les cellules α (OLIVEREAU, 1963) caractérisées par la présence de grosses granulations colorables par l'orange G sont PAS, BA et AF-négatives.
- Les cellules érythro-sinophiles (OLIVEREAU, 1963), dont les granulations sont plus fines que celles des cellules α , sont aussi PAS, BA et AF-négatives.
- Les cellules β et γ (OLIVEREAU, 1963) présentent de grosses granulations PAS, BA et AF-positives. La coloration associée



○ : cellules érythrosinophiles

★ : cellules PAS + , BA + , AF +

● : cellules orangéophiles

Carassius auratus L.

(d'après M.OLIVEREAU communication personnelle)

BA-PAS ne permet pas, d'une façon nette, de distinguer si l'une des variétés cellulaires est, comme chez la Souris par exemple, plus sélectivement colorée par le BA (OLIVEREAU, 1962).

- Les cellules δ sont, comme les cellules β et γ , colorables par le bleu d'alizarine et PAS, BA, AF-positives. Ce sont des cellules anguleuses qui renferment de très fines granulations (OLIVEREAU, 1962).
- Enfin, quelques amas de grosses cellules chromophobes sont localisés à l'entrée des rameaux neurohypophysaires et à la limite du lobe antérieur et intermédiaire (OLIVEREAU, 1962).

Ainsi, comme chez le Cobaye et la Souris, l'application des colorations histochimiques PAS, BA et AF permet de classer les cellules de la pars distalis du Cyprin en deux groupes :

- . Groupe des cellules à mucoprotéines :
PAS, BA, AF-positives
 - cellules δ
 - cellules β et γ
- . Groupe des cellules à granulations
PAS, BA, AF-négatives
 - les cellules érythrosinophiles
 - les cellules orangeophiles
 - les cellules chromophobes.

c. Répartition des types cellulaires (Planche III)

Les types cellulaires décrits ci-dessus se retrouvent dans des zones déterminées de la pars distalis du Cyprin.

C'est dans la région rostrale que l'on trouve les cellules érythrosinophiles et les cellules δ . La région médio-ventrale est constituée de cellules orangeophiles α et de cellules β et γ .

d. Signification fonctionnelle des types cellulaires

Ainsi, nous venons de voir que l'adénohypophyse du Cyprin est homologue du point de vue cytochimique de celle de la Souris et du Cobaye. Mais cette homologie cytochimique ne nous autorise pas à conclure pour un type cellulaire donné à l'homologie fonctionnelle (OLIVEREAU, 1963), ainsi que nous l'avons fait lors de nos premières publications sur ce sujet (DEMINATTI, 1962 a, b, c). Nous avons donc attribué à tort la fonction thyroïdienne à toutes les cellules PAS, BA, AF-positives

du Cyprin par analogie à celles du Cobaye et de la Souris (DEMINATTI, 1962 a). En effet, la radiothyroïdectomie (OLIVEREAU, 1962) entraîne d'une façon constante une hypertrophie et une dégranulation des cellules δ situées dans la partie rostrale (proadénohypophyse) : ces cellules deviennent PAS, BA, AF-négatives. Par contre, la radiothyroïdectomie n'entraîne que de faibles modifications au niveau des autres cellules adénohypophysaires, y compris les cellules PAS+ de la pars distalis proximale (mésoadénohypophyse). Cette réaction élective des cellules δ à la radiothyroïdectomie conduit donc à admettre la localisation de la fonction thyroïdrotrope dans les cellules δ (OLIVEREAU, 1962).

Les résultats de la radiothyroïdectomie (OLIVEREAU, 1962) et l'étude simultanée des variations cytologiques saisonnières de l'ovaire et de la préhypophyse (BEACH, 1959) permettent de localiser la fonction gonadotrope dans les cellules PAS, BA, AF-positives de la région proximale (mésoadénohypophyse) (OLIVEREAU, 1962, 1963), alors que les cellules orangeophiles de cette région seraient très probablement responsables de la fonction somatotrope (OLIVEREAU, 1963 - OLIVEREAU et coll., 1965). La fonction corticotrope (OLIVEREAU, 1964) serait dévolue à des petits îlots cellulaires situés dans la région rostrale (proadénohypophyse) au voisinage du tissu neurohypophysaire. Ces cellules sont colorables par le bleu d'Alizarine et l'hématoxyline au plomb les met spécifiquement en évidence. En effet, OLIVEREAU (1964) observe, après un traitement avec l'aldactone qui stimule la glande interrénale, l'hyperfonctionnement de ces cellules adénohypophysaires caractérisé par leur hypertrophie et un début de dégranulation.

4. PREHYPOPHYSE DE MOLLIENISIA SPHENOPS C.V.

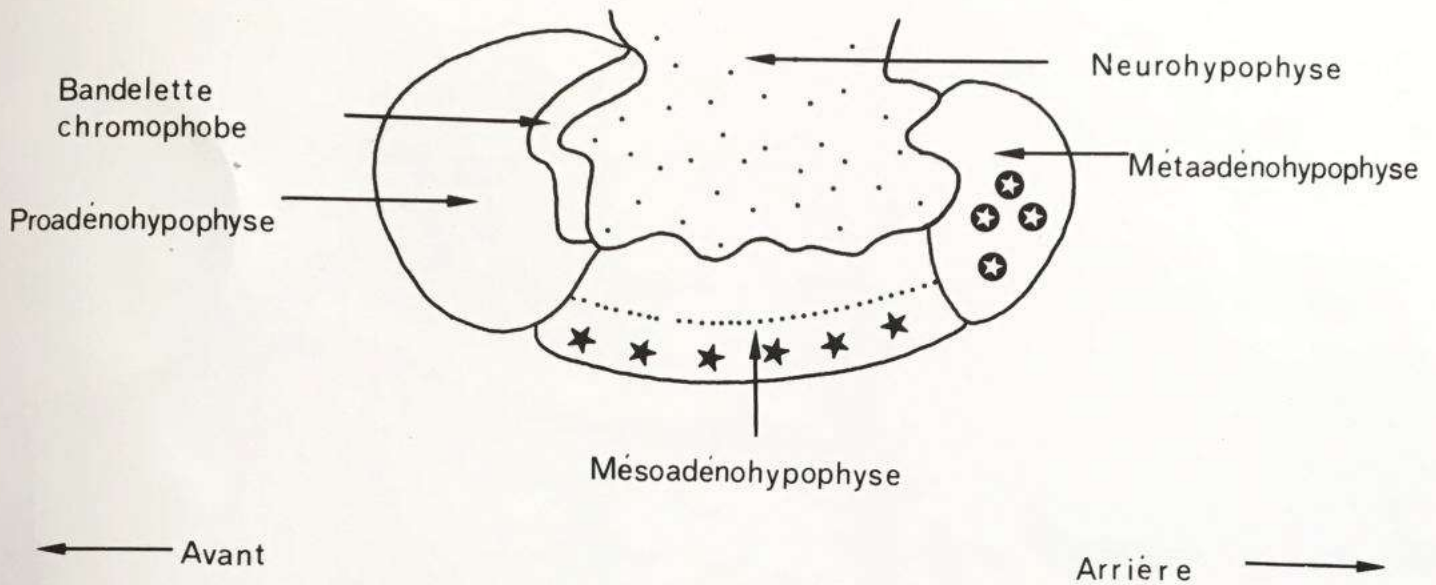
a. Anatomie microscopique (Planche IV)

L'appareil hypophysaire est constitué du lobe nerveux et de l'adénohypophyse. Cette dernière peut être décomposée en utilisant la terminologie de PICKFORD et ATZ (1957) en trois parties (FOLLENIUS, 1963) :

- la partie glandulaire postérieure ou métaadénohypophyse
- la partie glandulaire moyenne ou mésoadénohypophyse
- la partie glandulaire antérieure ou proadénohypophyse, méso-et proadénohypophysés constituant le lobe antérieur ou pars distalis de l'adénohypophyse.

b. Les types cellulaires

Etant donné que nos recherches sur ce Poisson ont été très limitées et que la cytophysiologie des types cellulaires



★ : cellules PAS +, BA +, AF +.

⊙ : cellules PAS +, BA -, AF -.

⋮ : Neurohypophyse.

Mollienisia sphenops C.V.

(d'après E.FOLLENIUS communication personnelle)

n'est pas élucidée chez ce Poisson, nous ne rapporterons que certaines données concernant les propriétés histochimiques et tinctoriales, ainsi que la localisation des types cellulaires (FOLLENIUS, 1963) :

- On observe dans la proadénohypophyse des cellules très acidophiles qui prennent l'orange G ou l'éosine, selon la coloration employée, mais ces cellules sont PAS, BA, AF-négatives (FOLLENIUS, 1963).
- La partie externe de la mésoadénohypophyse est constituée surtout de cellules PAS, BA, AF-positives et de quelques cellules uniquement PAS-positives après application de la coloration associée BA-PAS (DEMINATTI, 1963 b).
- Dans la partie interne de la mésoadénohypophyse, on observe essentiellement des cellules acidophiles PAS-négatives.
- Enfin, parmi les cellules de la métaadénohypophyse, on rencontre quelques cellules PAS-positives, mais BA et AF-négatives.

Ainsi, comme chez les trois espèces précédentes, l'application des colorations histochimiques au PAS, BA, AF, permet de classer les cellules de la pars distalis du Mollienisia sphenops en deux groupes :

- . Groupe des cellules à mucoprotéines
 - les unes PAS+, BA+, AF+
 - les autres PAS+, BA-, AF-
- . Groupe des cellules à granulations
PAS, BA, AF-négatives.

c. Répartition des types cellulaires (Planche IV)

Ainsi que nous l'avons déjà signalé lors de l'étude des types cellulaires, les cellules PAS, BA et AF-positives sont localisées au niveau de la partie externe de la mésoadénohypophyse alors que les cellules PAS-positives, mais BA et AF-négatives s'observent dans la métaadénohypophyse. Les cellules acidophiles du type I constituent la proadénohypophyse et les cellules acidophiles du type II forment la partie interne de la mésoadénohypophyse (FOLLENIUS, 1963).

5. CONCLUSIONS

a. Homologies entre les hypophyses des espèces étudiées

Dans le tableau I, nous présentons les homologies admises en ce qui concerne les différentes parties de l'adéno-

hypophyse des espèces étudiées, leur dénomination et les types cellulaires qui les constituent.

Dans le tableau II, nous résumons l'étude comparative des adénohypophyses des espèces étudiées en ce qui concerne les propriétés histochimiques et tinctoriales des types cellulaires et leur dénomination. Pour les deux Poissons, nous rappelons leur localisation.

Espèce	Localisation	Description des types cellulaires
<i>Carassius auratus</i>	Hypophyse	2 lobes latéraux et une région médiane prédominance des cellules 1 dans la région médiane
<i>Carassius auratus</i>	Hypophyse	2 lobes latéraux et une région médiane cellules 1 et 2 prédominent surtout dans la région médiane de la glande
<i>Carassius auratus</i>	Hypophyse	prédominance de la région médiane ou latérale cellules 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100
<i>Carassius auratus</i>	Hypophyse	prédominance de la région médiane cellules 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100

Tableau I

Espèce	Antéhypophyse - Préhypophyse ou Adénohypophyse	
	Lobe intermédiaire ou <u>pars intermedia</u>	Lobe distal ou <u>pars distalis</u>
<u>Cavia cobaya</u> (Cobaye)	id.	<ul style="list-style-type: none"> - 2 lobes latéraux et une région médiane - prédominance des cellules δ dans la région médiane
<u>Mus musculus</u> (var. albinus) (Souris albinos)	id.	<ul style="list-style-type: none"> - 2 lobes latéraux et une région médiane - cellules δ: se rencontrent surtout dans la région ventrale de la glande
<u>Carassius auratus L.</u> (Cyprin)	Métaadénohypophyse	<ul style="list-style-type: none"> - proadénohypophyse = région rostrale ou antérodorsale <ul style="list-style-type: none"> . cellules érythro-sinophiles . cellules cyanophiles - mésoadénohypophyse = région proximale ou médio-ventrale <ul style="list-style-type: none"> . cellules orangeophiles . cellules cyanophiles
<u>Mollienisia sphenops C.V.</u> (Black Molly)	Métaadénohypophyse (présence d'îlots de cellules PAS+, BA-, AF-)	<ul style="list-style-type: none"> - proadénohypophyse <ul style="list-style-type: none"> . cellules érythro-sinophiles . cellules acidophiles type I - mésoadénohypophyse <ul style="list-style-type: none"> . cellules orangeophiles : . cellules acidophiles type II . cellules cyanophiles

Tableau II

A - Groupe des cellules à mucroprotéines

	Cobaye	Souris	<i>Carassius auratus</i> L.	<i>Mollienisia sphenops</i> C.V.
Cellules PAS + BA + AF +	. cellules δ . cellules β BA+ et AF+ plus faiblement	. cellules δ . cellules β BA+ et AF+ plus faiblement	. cellules δ : dans la proadénohypophyse . majorité des cellules cyanophiles de la mésoadénohypophyse	partie externe de la mésoadénohypophyse
Cellules PAS + BA - AF -	. cellules γ	. cellules γ	. certaines cellules cyanophiles de la mésoadénohypophyse seraient moins BA+ avec la coloration associée BA-PAS (OLIVEREAU, 1962)	quelques cellules visibles dans la métaadénohypophyse

B - Groupe des cellules à granulations protéiques

	Cobaye	Souris	<i>Carassius auratus</i> L.	<i>Mollienisia sphenops</i> C.V.
Cellules orangéophiles	. cellules α	. cellules α	. cellules visibles dans la mésoadénohypophyse	. cellules acidophiles de la mésoadénohypophyse
Cellules érythro-sino- philes	. cellules ϵ	. cellules ϵ	. cellules localisées dans la proadénohypophyse	. cellules acidophiles de la proadénohypophyse

b. Apports des techniques histochimiques sur la connaissance de l'activité sécrétrice des cellules à granulations glycoprotéiques

Ainsi que nous l'avons déjà signalé dans l'introduction, les techniques histochimiques ont en général pour but la détermination de la nature chimique des constituants cellulaires et des modalités quantitatives de fonctionnement des cellules, ceci afin de préciser la signification fonctionnelle de ces cellules.

Nous envisagerons ici les apports dûs essentiellement aux colorations histochimiques mises en oeuvre dans ce travail : la coloration à l'acide periodique Schiff (PAS) précédée ou non de la coloration au bleu Alcian à pH 0,2 (BA/PAS), la coloration au bleu Alcian à pH 0,2 (BA), la coloration à l'aldéhyde fuchsine (AF).

1) Caractéristiques histochimiques des produits sécrétés.

La principale coloration histochimique sur laquelle repose la distinction entre cellules préhypophysaires à granulations mucoprotidiques et à granulations protéiques est la coloration au PAS (PEARSE, 1948 - CATCHPOLE, 1949 - HERLANT, 1949) dont on connaît l'intérêt pour la mise en évidence des hydrates de carbone polysaccharidiques tissulaires (HOTCHKISS, 1948) et des composés tels que la mucine, les glycoprotéines qui contiennent des hydrates de carbone (Mc MANUS, 1946).

Malgré la spécificité relative de cette coloration (voir à ce sujet : LISON, 1960 - CURRAN, 1964), on admet que les cellules préhypophysaires PAS+ synthétisent les hormones de nature glycoprotéique : les hormones gonadostimulantes (FSH et LH) et thyroïdostimulante (TSH) (voir à ce sujet les revues de WERNER, 1963 - HERLANT, 1964 - GOTTSCHALK, 1966). En faveur de cette correspondance, citons les résultats de l'application de la réaction au PAS à des hormones purifiées : FSH présente une réaction PAS positive "in vitro" (MELLORS et HOTCHKISS, 1957 - DEMINATTI et WEILL, 1958) et LH serait faiblement PAS+ pour MELLORS et HOTCHKISS (1957). De plus, l'isolement des granulations cyanophiles PAS+ (HERLANT, 1952) par la méthode des ultracentrifugations différentielles confirme leur teneur en hormones gonadotrope et thyroïdostimulante. ZIEGLER et MELCHIOR (1956), avec la même technique d'ultracentrifugation différentielle, obtiennent 4 fractions à partir de préhypophysaires de Rats : une fraction nucléaire, une fraction de mitochondries, de grands granules et un surnageant. Ils trouvent l'activité hormonale lutéinisante dans la fraction à grands granules, l'activité folliculostimulante principalement dans la fraction à grands granules et le surnageant, mais ils n'ont pas étudié l'activité thyroïdostimulante.

Enfin, les résultats de l'extraction par différents solvants de la totalité ou d'une partie des hormones glycoprotéiques et l'étude comparative de la réactivité au PAS des cellules correspondantes (BARNETT et coll., 1956) sont aussi en faveur de l'existence de rapports étroits entre les granulations et les stimu-
lines synthétisées.

En ce qui concerne la coloration à l'aldéhyde-fuchsine (AF) préparée selon GOMORI (1950) ou selon GABE (1953), son apport quant à l'identification de la nature biochimique du substrat est moins précis que celui de la coloration au PAS. Pour HERLANT (1958), l'AF préparée selon GABE se comporte comme un colorant basique réagissant avec tous les radicaux acides et, dans le cas particulier de la préhypophyse, avec des radicaux COOH qui préexistent ou qui sont créés par l'oxydation au permanganate sulfurique précédant la coloration.

Plus récemment, ORTMAN et coll. (1966) arrivent à la même conclusion en ce qui concerne le mécanisme de la coloration : en effet, le blocage par la méthylation des groupements COOH créés par l'oxydation au permanganate sulfurique entraîne une abolition de l'affinité des cellules pour l'AF, phénomène constaté par HERLANT (1958) ; mais cette affinité peut d'ailleurs être récupérée par un nouveau passage dans une solution de permanganate sulfurique (DEMINATTI, 1963 a) ou de permanganate à 0,5 % (ORTMAN et coll., 1966). Toutes les cellules AF+ étant PAS+, l'existence parmi les cellules PAS+ de cellules AF- indique que les cellules AF- sécrèteraient des glycoprotéines neutres et les cellules AF+ des glycoprotéines acides (HERLANT, 1958).

Les résultats obtenus avec la coloration au bleu Alcian à pH 0,2 (BA) précédée ou non d'une oxydation au permanganate sulfurique conduisent à la même interprétation qu'après la coloration à l'AF, quant à la présence de groupements COOH dans les cellules BA+. L'intensité de la coloration serait fonction de l'abondance de ces groupements carboxyles. C'est pourquoi la méthylation (HERLANT, 1958) ou l'action de la sialidase (RACADOT, 1963) sur ces cellules BA+, qui sont toutes PAS+, sont, l'une par blocage des groupements COOH, l'autre par élimination de l'acide sialique, capables d'abolir l'affinité de ces cellules pour le bleu Alcian.

Il faut signaler deux autres méthodes histochimiques qui ont été appliquées pour l'étude de l'adénohypophyse : la méthode de HALE (1946) et l'étude de la métachromasie (HERLANT, 1943).

La méthode de HALE (BELANGER et MIGICOVSKY, 1962 - CURRAN, 1964 - GABE, 1964) est basée sur l'affinité du fer colloïdal pour les groupes sulfates des mucopolysaccharides sulfatés ou l'acide uronique de l'acide hyaluronique. Les résultats obtenus avec cette méthode sont superposables à ceux obtenus avec

le BA et la métachromasie (GABE, 1964). Toutefois, la spécificité de cette méthode pour les substances contenant des groupements SO₄, COOH ou PO₄ est très discutée (IMMERS, 1954).

En ce qui concerne la métachromasie, qui est signalétique d'un grand nombre de groupements acides (LISON, 1960), SLOTWINSKI (1964) examinant la préhypophyse de différentes espèces (Lapin, Cobaye, Chien, Chat) ne retrouve pas cette métachromasie des cellules "basophiles" notée par HERLANT (1943). De plus, après application d'une technique de coloration au bleu de Célestine qui, pour cet auteur, "n'est pas une méthode chimique dans toute l'importance du mot, mais est presque spécifique pour les mucopolysaccharides acides", les granulations ne sont pas colorées.

GRAUMANN et coll. (1962), après une étude histochimique de la préhypophyse humaine, concluent à l'absence de lipides acides ou de sulfomucopolysaccharides dans les cellules à granulations glycoprotéiques.

CORDIER et HERLANT (1957) étudiant l'adénohypophyse de Xenopus laevis, arrivent aux conclusions suivantes quant à la nature chimique des granulations observées dans les cellules préhypophysaires de ce Batracien : les cellules PAS⁺, BA⁺, AF⁺, sans oxydation préalable et métachromatiques au bleu de Toluidine, renferment une mucoprotéine fortement acide ; les cellules PAS⁺ et BA⁺, AF⁺, après oxydation, faiblement métachromatiques, contiennent une protéine mucopolysaccharidique dont le caractère acide conféré par l'oxydation est de nature indéterminée mais n'est pas dû à la présence de protéines soufrées.

En conclusion, les colorations au PAS, au bleu Alcian (STEDMAN, 1950), au BA / PAS (MOWRY et WINCKLER, 1956), à l'aldéhyde fuchsine qui sont des colorations signalétiques de diverses mucoprotéines (HALMI et DAVIES, 1953) et les résultats de l'étude de la métachromasie (HERLANT, 1943) sont en faveur de la présence de mucoprotéines acides dans les cellules préhypophysaires PAS⁺, BA⁺, AF⁺, moins acides dans les cellules PAS⁺, BA⁺, AF⁻ et neutres dans les cellules PAS⁺, BA⁻, AF⁻ (HERLANT, 1958). Le caractère acide est rapporté à des groupements COOH, principalement de l'acide sialique, lequel entre dans la composition des hormones préhypophysaires glycoprotéiques (voir BATES et CONDLIFFE, 1966).

2) Etudes histochimiques des modalités quantitatives de fonctionnement des cellules à granulations glycoprotéiques.

L'apport des différentes colorations de l'adénohypophyse, quant au taux d'activité glandulaire de ces cellules, est fonction des rapports qui existent entre les granulations

cytoplasmiques et les hormones sécrétées (HERLANT, 1962). S'il existe des arguments en faveur d'une homologation entre granules et hormones, ainsi que nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, il existe aussi des faits opposés à cette identification qui limitent l'emploi des colorations seules pour apprécier le taux d'activité fonctionnelle des cellules.

Ainsi, chez le Cobaye, REBEL (1961), après thyroïdectomie chirurgicale, observe une accumulation considérable de matériel AF+ dans les cellules thyrotropes AF+ dont le nombre augmente. Mais cette accumulation considérable du matériel AF+ ne s'accompagne pas d'une augmentation corrélative du pouvoir thyrostimulant des broyats préhypophysaires. C'est pourquoi cet auteur conclut que le matériel AF+ ne correspond pas nécessairement à une forme active de la thyrostimuline. Rappelons que D'ANGELO (1963), contrairement à REBEL, observe une augmentation corrélative du taux de thyrostimuline hypophysaire : cette observation inverse n'infirme pas la conclusion de REBEL quant à la nature du matériel AF+.

Chez la Souris, l'augmentation du taux de thyrostimuline dans le plasma (ADAMS, 1946), après thyroïdectomie, est concomitante de l'apparition des cellules de thyroïdectomie (HALMI et GUDE, 1954). Ces cellules de thyroïdectomie, pauvres en granulations spécifiques, proviennent de cellules δ qui, normalement PAS+, BA+, AF+, sont devenues faiblement chromophiles : cette diminution de la chromophilie, due à une excrétion rapide, est concomitante d'une sécrétion hormonale accrue. En effet, les observations au microscope électronique de ces cellules (BARNES, 1963) confirment que les granulations chromophiles sont rares et que les organites cellulaires de synthèse sont très développés. Ainsi, chez la Souris, contrairement au Cobaye, la cellule thyrotrope hyperactive et riche en hormone nouvelle synthétisée, a peu d'affinité pour les colorants histochimiques. On est donc en droit d'admettre, comme dans le cas du Cobaye, que les colorations histochimiques ne mettent pas en évidence une forme active de la thyrostimuline.

Chez le Cobaye, l'étude de la teneur en ribonucléoprotéines (RNP) par le test de Brachet au vert de méthyle-pyronine des différents types cellulaires de la préhypophyse nous avait conduits à admettre que l'abondance de granulations chromophiles n'indique pas nécessairement que la cellule est le siège d'une intense synthèse protéique (DEMINATTI, 1959). Au contraire, l'augmentation numérique des granulations cytoplasmiques glycoprotéiques ou protéiques semble s'accompagner d'une diminution du taux des RNP : la cellule chromophobe étant le type cellulaire le plus riche en RNP serait en fait le lieu d'une intense synthèse protéique.

V - BUTS ET NATURE DES RECHERCHES

Ainsi, les différentes méthodes histochimiques indiquent la présence de mucoprotéines plus ou moins acides dans certaines cellules préhypophysaires, sans toutefois apporter de précisions quant à leur composition.

De plus, les exemples cités montrent que, quelle que soit la nature des rapports entre les hormones et les granulations, d'une part, l'intensité des colorations histochimiques est indéniablement fonction du nombre de granulations mais que, d'autre part, le nombre des granulations, donc l'intensité de la coloration, ne permet pas, à elle seule, de juger du degré d'activité glandulaire des cellules à granulations glycoprotéiques.

C'est donc en vue d'étudier certains aspects de l'activité sécrétrice des cellules préhypophysaires à granulations glycoprotéiques que nous avons jugé opportun de procéder à des investigations en utilisant des radiomolécules.

En effet, au début de nos recherches, les auteurs tendaient à admettre la nature COOH des groupements responsables du caractère acide des mucoprotéines contenues dans certaines cellules préhypophysaires. Malgré le fait qu'aucun glucide sulfaté n'est PAS+ (LISON, 1960), nous avons émis l'hypothèse de la présence de groupements sulfates dans les cellules préhypophysaires PAS+, BA+, AF+. Notre hypothèse était justifiée par le fait que, comme le soulignait LISON en 1960, la positivité simultanée, au niveau d'une structure, de la coloration au PAS, au BA, à l'AF, de la métachromasie indique, soit la présence d'un mucopolysaccharide sulfaté PAS+ inconnu, soit la présence d'un mélange de mucopolysaccharide sulfaté et d'une mucoprotéine neutre. L'absence, à cette époque, de techniques histochimiques spécifiques permettant d'identifier et de localiser les groupements SO_4^- en dehors de l'emploi du $^{35}\text{S}-\text{SO}_4$ en histoautoradiographie et le fait que les structures histologiques ayant les caractères histochimiques de ces cellules préhypophysaires contenaient des groupements $^{35}\text{S}\text{O}_4$ (BESCOL - LIVERSAC, 1958, - DZIEWIATKOWSKI, 1958) nous ont conduits à employer le radiosulfate pour élucider ce problème.

Nous avons utilisé d'autres radiomolécules, acides aminés, glucose, acétate, et appliqué différentes conditions expérimentales (étude in vitro, thyroïdectomie, castration) pour confirmer les résultats histoautoradiographiques obtenus avec le radiosulfate et montrer l'intérêt de son emploi dans l'étude du métabolisme des cellules préhypophysaires PAS+, BA+, AF+. Nos études in vitro et nos recherches biochimiques et histochimiques ont eu pour but, d'une part, de confirmer la nature sulfate du ^{35}S décelé sur les histoautoradiographies après injection de

radiosulfate et, d'autre part, de tenter d'identifier le ou les substrats sur lesquels sont fixés les groupements 35-SO_4^- .

CARACTERISTIQUES DES RADIOMOLECULES UTILISEES

- $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$: sulfate de sodium sans entraîneur, en solution injectable.; cette solution contient une proportion de 32-P de 0,2 pour 1000 : c'est pourquoi la solution n'est pas utilisée dès réception, mais après un délai de 1 à 2 semaines pour éliminer cette contamination radioactive du 32-P lors de l'interprétation des résultats.
- D.L.- 35-S -méthionine : activité spécifique : 5 mCi/mM ; en tube scellé et lyophilisé.
- 131-I : iodure de sodium sans entraîneur ; en solution de thiosulfate.
- D.L.-Leucine- 3H-4-5 : activité spécifique : 1000-5000 mCi/mM ; solution aqueuse stérile.
- Acétate- 3H : activité spécifique : 100-1000 mCi/mM acétate de Na en solution aqueuse.
- L-Phénylalanine- 3H-2-3 : activité spécifique : 180 mCi/mM ; en solution aqueuse.
- D-Glucose- 6-3H : activité spécifique : 176 mCi/mM ; en solution éthanolique 90 % (New England Corp.)

MATERIEL BIOLOGIQUE UTILISE ET NATURE DES RECHERCHES EFFECTUEES

Espèce	Nature de la radiomolécule injectée	Conditions expérimentales d'étude de l'incorporation des radiomolécules dans la préhypophyse et techniques d'étude.	
		Etude histoautoradiographique	Etudes biochimiques
<u>Cobaye</u> (<u>Cavia</u> <u>cobaya</u>)	35-SO ₄ Na ₂ 35-S-méthionine	<u>in vivo</u> : témoins mâles et femelles - après traitement au PTU - après thyroïdectomie chirurgicale <u>in vivo</u> : témoins mâles et femelles <u>in vitro</u>	<u>in vivo</u> : recherche de la nature biochimique du 35-S (inorganique ou organique) après injection de 35-SO ₄ Na ₂ .
<u>Souris albinos</u> (<u>Mus musculus</u>) (var. albinos)	35-SO ₄ Na ₂	<u>in vivo</u> 1. témoins mâles et femelles - étude par le test histo- chimique de la méthylation 2. mâles - après traitement au PTU - après radiothyroïdectomie - après castration <u>in vitro</u> : - après 1 à 3 jours de culture - après 27 jours de culture	<u>in vivo</u> : recherche de la nature chimique du 35-S (inorganique ou organique) après injection de 35-SO ₄ Na ₂

Suite du Tableau III

<p><u>Cyprin</u> (<u>Caras-</u> <u>sius</u> <u>auratus</u> <u>L.</u>)</p>	<p>35-SO₄Na₂</p> <p>35-S-méthionine</p> <p>3-H-phénylala- nine</p> <p>3-H-leucine</p> <p>3-H-acétate</p> <p>3-H-6-glucose</p>	<p><u>in vivo</u> : témoins mâles et femelles et étude par le test histochimique de la méthylation</p> <p><u>in vivo</u> id.</p> <p>id. témoins mâles et femelles</p> <p>id. id.</p> <p>id. id.</p> <p>id. id.</p>	<p><u>in vivo</u> : après in- jection de 35-SO₄Na₂</p> <p>1) recherche de la nature organique ou inorganique du 35-S</p> <p>2) identification du ou des substrats biochimiques qui fixent le 35-SO₄</p>
<p><u>Black Molly</u> (<u>Mollienisia</u> <u>sphenops</u> <u>C.V.</u>)</p>	<p>35-SO₄Na₂</p> <p>35-S-méthionine</p>	<p><u>in vivo</u> témoins mâles et femelles</p> <p>id. id.</p>	

VI - RECHERCHES HISTO AUTORADIOGRAPHIQUES

I. TECHNIQUES D'OBSERVATION

a. Techniques histologiques et histo-chimiques

Nous avons appliqué les techniques généralement utilisées pour l'étude morphologique de la préhypophyse. En ce qui concerne la technique histoautoradiographique, nous avons dû adapter cette technique à notre étude, afin de pouvoir établir une correspondance entre la nature histo-chimique des cellules et l'intensité de la radioactivité qu'elles contiennent.

1) Fixation

Les pièces qui devaient être soumises à l'étude histoautoradiographique ont été fixées, soit au formol à 10 % neutralisé par $\text{Na OH } \frac{\text{N}}{10}$, soit au formol-Baker pendant 24 heures.

Sur les pièces fixées au BOUIN-HOLLANDE modifié selon HERLANT (1950) pendant 24 heures, nous avons pratiqué les colorations couramment utilisées pour étudier la préhypophyse dont la coloration tétrachromique d'HERLANT (1960).

Les thyroïdes prélevées ont été fixées au liquide de Helly.

2) Colorations histologiques

Les techniques utilisées ont été la coloration tétrachromique d'HERLANT (1960) pour la préhypophyse et la coloration à l'hématoxyline-éosine pour la thyroïde.

3) Colorations histo-chimiques

Nous avons utilisé les techniques d'analyse que nous avons signalées antérieurement.

- Les colorations au bleu Alcian à pH 0,2 (BA) ou à l'aldéhyde fuchsine préparée selon GOMORI (AF) sont toujours précédées d'une oxydation au permanganate-sulfurique.
- La coloration à l'acide periodique-Schiff (PAS) est réalisée seule ou précédée d'une coloration au bleu Alcian à pH 0,2 (BA/PAS).

Ces techniques histo-chimiques ont été appliquées sur les pièces quelle que soit la nature du fixateur employé.

b. Techniques histoautoradiographiques

La technique histoautoradiographique ou autohistoradiographique (LACASSAGNE et LATTES, 1924) peut se définir comme "étant l'analyse topographique de la répartition des radioisotopes en histologie" (ZAJDELA, 1957).

1) Principe

Elle met à profit la propriété de l'émulsion photographique de noircir sous l'effet d'une radiation. L'émulsion, soit sous forme pelliculaire (méthode du "stripping"), soit sous forme liquide (méthode du "coating"), est appliquée sur les lames histologiques qui portent les coupes d'organes. Après des temps d'exposition variables, on procède au développement, l'examen de la répartition des grains photographiques se faisant au microscope, soit au faible grossissement, soit au fort grossissement, après coloration ou non de la coupe. Le pouvoir de résolution dépend de la nature et de l'intensité du rayonnement, de l'épaisseur de l'émulsion, de la taille des grains de l'émulsion, des modalités de développement et aussi de la taille des cellules (ZAJDELA, 1957).

Cette méthode ne nous renseigne pas, pour un radioélément donné, sur la nature de la molécule dans laquelle ce radioélément est incorporé. A fortiori quand il s'agit d'une radiomolécule, il apparaît indispensable, pour interpréter les résultats, de connaître le devenir biochimique de la molécule étudiée. C'est pour cette raison que nous avons dû compléter nos études avec cette technique par des analyses biochimiques et le test de la méthylation.

Enfin, le fixateur et les manipulations histologiques utilisés doivent conserver "intact" le substrat histochemique que l'on étudie en le rendant insoluble et immobile. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé le formol comme fixateur, qui présente aussi l'avantage de ne pas modifier la sensibilité de l'émulsion.

2) Modalités de mise en oeuvre

α- Autoradiographie en microscopie photonique

Dans ce paragraphe, après avoir donné les méthodes de préparation des lames et d'application des émulsions, nous exposerons les procédés d'observation que nous avons utilisés :

- Préparation des lames

Pour chaque organe, les coupes sériées d'une épaisseur de 3 μ sont étalées avec l'eau gélatinée à 1 % sur des lames histologiques préalablement trempées dans de l'eau gélatinée à 1 % et séchées à l'abri de la poussière. Les lames sont mises à

.../...

sécher à l'étuve à 37° pendant 12 heures. Passé ce délai, les lames, après déparaffinage, puis lavage à l'eau distillée durant 5 minutes, sont mises à sécher avant la pose de l'émulsion qui se fait en lumière inactinique.

- Application de l'émulsion

. Méthode du "coating" (FICQ et coll., 1954) :

Nous avons utilisé des émulsions G5 et K5 (ILFORD). Les lames sont déposées sur une platine chauffante (longueur 79,5 cm, largeur 24,5 cm) dont la température varie d'une extrémité (40°C) à l'autre (20°C). L'horizontalité de cette platine est vérifiée par deux niveaux à bulles. Une goutte d'émulsion (chauffée à 40°C) est déposée à une extrémité de la lame, puis étalée avec une raclette (type BESCOL-LIVERSAC, 1958) qui elle-même séjourne dans de l'eau tiédie. Après étalement de l'émulsion, les lames sont poussées vers l'extrémité froide de la platine. Après gélification de l'émulsion dont l'épaisseur est alors de 5 u ; les lames sont placées dans des boîtes étanches en présence d'actigel et stockées à 4°C.

. Méthode du "stripping" :

Nous avons utilisé des émulsions pelliculaires AR 50 et AR 10 (Kodak), cette dernière étant à grains fins. L'émulsion est posée selon la méthode de PELC (1957) ; les lames, après séchage pendant 12 heures, sont placées dans des boîtes étanches, stockées à + 4°C, en présence d'actigel.

- Développement

Après des durées d'exposition variables de 2 jours à 5 mois, suivant les cas, on procède au développement avec le révélateur D 19 ou D 19 B Kodak. Après des temps de développement de 5 à 15 minutes à + 18°C, les lames sont fixées (fixateur acide Kodak), lavées plusieurs fois dans l'eau distillée et séchées.

- Méthodes d'analyse des autoradiographies et colorations

Les méthodes d'analyse ont été variables ; elles sont d'ailleurs fonction non seulement du but recherché, mais aussi du type de préhypophyse et de l'intensité de la radioactivité. Ainsi, l'étude topographique de la répartition de la radioactivité ou l'appréciation globale de son intensité ne nécessite pas de coloration de la coupe sous-jacente à l'émulsion. Par contre, la détermination de l'intensité de la radioactivité en fonction des types cellulaires nécessite la coloration de la coupe. Les coupes peuvent être colorées avant la pose de l'émulsion ou après le développement. De plus, avec l'émulsion AR 10, il est possible d'enlever l'émulsion et de la conserver, puis de colorer la coupe : cette méthode ne permet qu'une étude topographique de la répartition de la radioactivité, mais

.../...

permet d'éliminer les risques de perte de radioactivité ou de grains photographiques.

Les colorations suivantes ont été utilisées : glychémalun de Mayer, vert de méthyle-pyronine, PAS, BA et AF.

. Colorations avant la pose de l'émulsion :

- PAS
 - AF ou BA à pH 0,2 : après oxydation au permanganate-sulfurique
- Le risque de perte de radioactivité au cours de l'oxydation et de la coloration limite l'emploi de cette méthode, les résultats ainsi obtenus n'étant valables que s'il existe des lames "témoins" du même cas.

. Colorations après le développement de l'émulsion :

- coloration au glychémalun de Mayer ou au BA (sans oxydation) - glychémalun : Après ces colorations, il est possible de procéder à la prise de clichés photographiques de certaines cellules ou groupes cellulaires ; puis, après enlèvement de l'émulsion avec de l'eau tiède ou après passage dans une solution de permanganate-sulfurique des lames qui entraîne en même temps la disparition des grains photographiques et oxyde les coupes, on peut colorer les lames au BA ou à l'AF. La coloration au PAS nécessite une élimination préalable de l'émulsion ; ainsi, la comparaison des photographies des mêmes cellules colorées sans oxydation et colorées après l'oxydation permet d'apprécier l'intensité de la radioactivité de ces cellules en fonction de leur affinité pour le BA, AF, PAS.

- coloration au vert de méthyle-pyronine : nous avons utilisé le colorant Biolyon, selon les modalités préconisées par BRACHET (1942) ; ici aussi, il est possible de comparer les clichés des mêmes cellules colorées au vert de méthyle-pyronine, puis colorées au BA, AF ou au PAS.

- coloration au BA-glychémalun des lames oxydées avant la pose de l'émulsion : cette façon de procéder permet de connaître directement l'intensité de la radioactivité et l'affinité des cellules pour le BA. Il faut toujours tenir compte d'une perte éventuelle de radioactivité consécutive à l'oxydation car, si la perte totale ou importante de radioactivité est facile à déceler en comparant avec des lames témoins, par contre, la perte ou la diminution sélective du fait d'une structure cellulaire plus labile est difficile à constater, ce qui limite la généralisation de cette méthode.

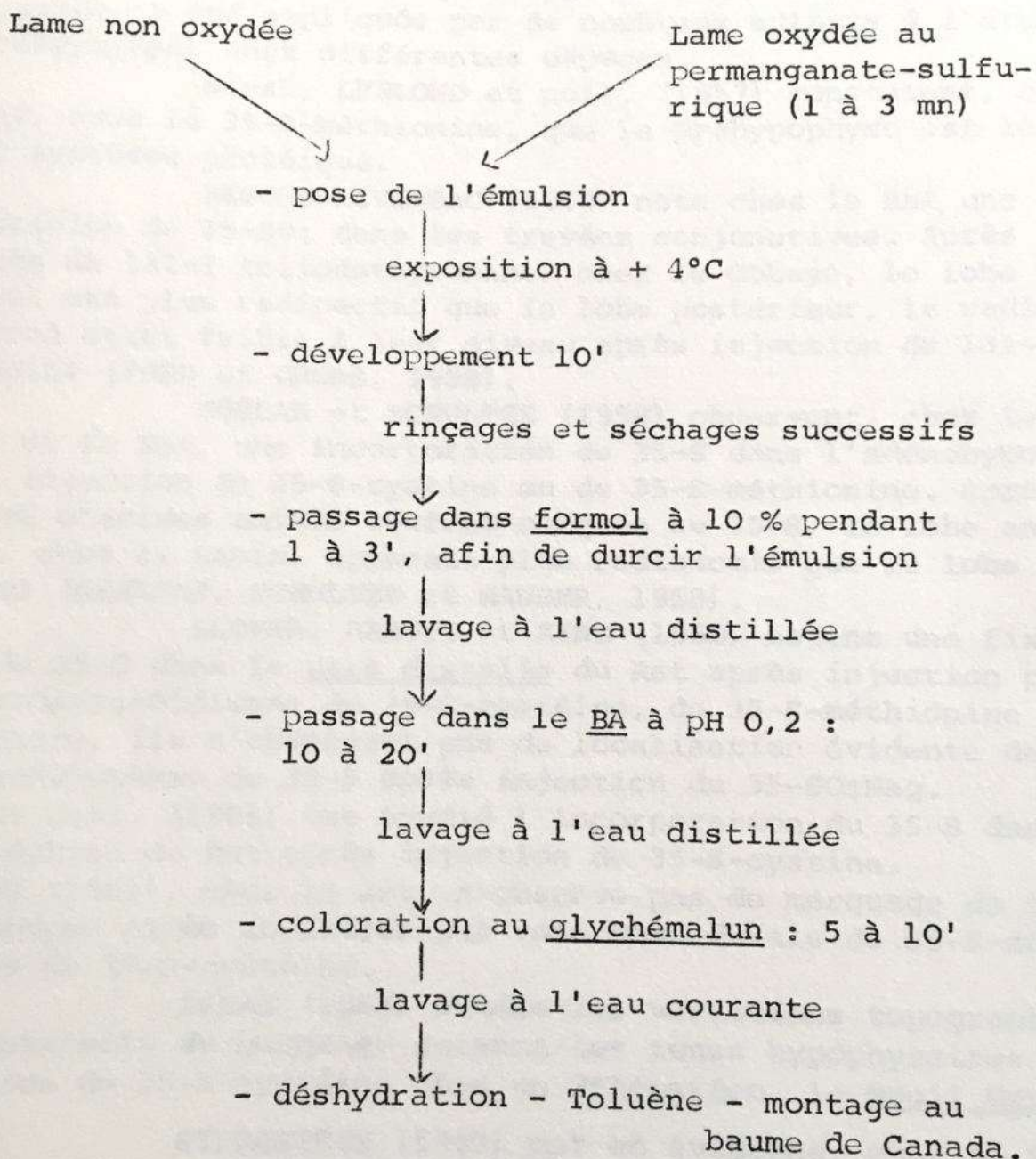
En conclusion, pour chaque cas, nous nous sommes efforcés de répartir les coupes d'un organe sur 4 à 6 lames dont :

- 1 à 2 lames sont oxydées au permanganate-sulfurique, avant

de l'émulsion

- 1 lame colorée au BA ou AF ou PAS avant la pose de l'émulsion
- 2 à 4 lames non oxydées, non colorées avant la pose de l'émulsion.

La coloration au BA à pH 0,2 ayant été la plus utilisée pour colorer les autoradiographies, nous donnons ci-après le processus technique que nous avons appliqué pour cette coloration :



β - Autoradiographie en microscopie électronique

Nous avons utilisé, sans aucune modification, la technique de GRANBOULAN (1965) tant pour la préparation des lames, l'application de l'émulsion L4 ILFORD, que la coloration des coupes au nitrate de Plomb selon REYNOLDS (1963).

Nous avons, au préalable, identifié les cellules BA+, AF+, en procédant à l'analyse comparative de plusieurs coupes voisines : l'une semi-fine est examinée au microscope photonique, après oxydation au permanganate-sulfurique et coloration au BA ou à l'AF, l'autre coupe fine est soumise à l'examen au microscope électronique après coloration (Planche IX).

3) Ses applications à l'étude de l'adénohypophyse

Cette technique, appelée plus simplement autoradiographie, a été appliquée par de nombreux auteurs à l'étude de la préhypophyse chez différentes espèces.

Ainsi, LEBLOND et coll. (1957) constatent, chez le Rat, avec la 35-S-méthionine, que la préhypophyse est le lieu d'une synthèse protéique.

BESCOL-LIVERSAC (1958) note, chez le Rat, une incorporation de 35-SO₄ dans les travées conjonctives. Après injection de 131-I triiodothyronine, chez le Cobaye, le lobe antérieur est plus radioactif que le lobe postérieur, la radioactivité étant faible à leur niveau après injection de 131-I-thyroxine (FORD et GROSS, 1958).

GOSLAR et SCHULTZE (1958) observent, chez le Lapin et le Rat, une incorporation de 35-S dans l'adénohypophyse après injection de 35-S-cystine ou de 35-S-méthionine. Après injection d'acides aminés soufrés marqués au 35-S, le lobe antérieur, chez le Lapin, apparaît plus radioactif que le lobe postérieur (OEHLERT, SCHULTZE et MAURER, 1958).

SLOPER, ARNOTT et KING (1960) notent une fixation de 35-S dans la pars distalis du Rat après injection par voie sous-rachidienne de 35-S-cystéine, de 35-S-méthionine ; par contre, ils n'observent pas de localisation évidente dans l'adénohypophyse de 35-S après injection de 35-SO₄Na₂.

FORD et coll. (1961) ont étudié l'incorporation du 35-S dans la préhypophyse du Rat après injection de 35-S-cystine.

FLAMENT (1961), chez le Rat, n'observe pas de marquage de l'adénohypophyse après injection par voie sous-durale de 35-S-méthionine ou de 35-S-cystéine.

LERAY (1963) étudie les variations topographiques de l'intensité du marquage suivant les zones hypophysaires après injection de 35-S-cystéine chez un Téléostéen, le Mugil Cephalus L.

SIPERSTEIN (1963) met en évidence, chez le Rat, en utilisant la glycine tritiée, un renouvellement rapide des protéines dans les "cellules d'adrénalectomie". De même, dans les cellules thyrotropes du Rat, l'incorporation de proline tritiée est augmentée, mais diminuée dans les cellules gonadotropes après thyroïdectomie (DUCOMMUN, 1965). KNUTSON (1966), en utilisant la 14-C-adénine conclut que, chez le Rat, les cellules

chromophobes sont impliquées dans la synthèse de la cortico-stimuline.

FAND et SPENCER (1965) trouvent une discrète incorporation de testostérone dans les cellules préhypophysaires humaines in vitro.

Avec la 3-H-cytidine, DHOM et STOCKER (1965) montrent, chez le Rat, que le taux de synthèse des ribonucléoprotéines est élevé dans les cellules chromophobes, faible dans les cellules acidophiles et a une valeur intermédiaire dans les cellules thyrotropes et gonadotropes ; la castration entraîne une augmentation de ce taux de synthèse dans les cellules gonadotropes, mais la thyroïdectomie diminue celui des cellules thyrotropes après thyroïdectomie.

DHOM et STOCKER (1964) ont étudié avec la 3H-thymidine le renouvellement des cellules préhypophysaires chez le Rat.

NAKAMURA et coll. (1963), avec la 3H-thymidine, montre que l'hépatectomie partielle chez le Rat entraîne une augmentation des mitoses au niveau des cellules adénohypophysaires.

PETROVIC (1965), en utilisant la C-14-thymidine et des acides aminés tritiés (tryptophane, leucine, phénylalanine), conclut que, dans la préhypophyse de Cobaye placée en culture, les cellules se divisent et les cellules à prolactine sont le lieu de la plus intense synthèse protéique.

L'autoradiographie en microscopie électronique n'a été que peu utilisée jusqu'à présent.

Citons RACADOT et coll. (1965) qui, de l'étude de l'incorporation de 3H-leucine, chez le Rat, concluent que, dans les cellules préhypophysaires, les grains de sécrétion prennent naissance dans l'appareil de Golgi à partir des protéines synthétisées auparavant dans l'ergastoplasme.

Avec la 3H-thymidine, FOLLENIUS (1964) a étudié les sites d'activité mitotique de l'hypophyse d'un Poisson, Lebistes reticulatus R.

FOLLENIUS (1967) observe, après injection de DL-noradrénaline 3H-7, chez l'Épinoche femelle adulte (Gasterosteus aculeatus), un marquage autoradiographique sélectif des cellules acidophiles de la mésoadénohypophyse.

Chez ce même Poisson, après injection de 3H-phénylalanine, l'intégration de cet acide aminé est élevée dans les cellules à grains denses de la partie rostrale, dans celles de la pars distalis proximale ainsi que dans les cellules claires de la pars intermedia (FOLLENIUS, 1968).

TIXIER-VIDAL et PICART (1967) ont étudié l'utilisation de DL-leucine tritiée par les cellules de l'hypophyse du Canard in vitro.

2. ETUDE HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'ADENOHYPOPHYSE DE COBAYE

a. Buts des recherches

C'est pour vérifier notre hypothèse de la présence de groupements sulfate dans les cellules PAS+, BA+, AF+ (voir p.6) que nous avons étudié, avec la technique histoautoradiographique, la répartition du 35-S dans la préhypophyse de Cobaye normal ou thyroïdectomisé, après injection de 35-SO₄Na₂. Mais à la suite de la constatation de 35-S organique dans l'adénohypophyse après injection de 35-SO₄Na₂ par l'analyse biochimique, nous avons décidé d'arrêter nos recherches sur cette espèce après avoir étudié, avec la technique histoautoradiographique, la répartition du 35-S injecté sous la forme organique de la 35-S-méthionine, les recherches in vitro avec la 35-S-méthionine ayant l'avantage d'offrir au parenchyme préhypophysaire une quantité importante de radiomolécules.

Il sera donc fait état dans ce chapitre de nos recherches histoautoradiographiques sur l'incorporation du 35-S dans la préhypophyse du Cobaye, tant in vivo qu'in vitro, en utilisant du 35-S sous forme de 35-SO₄Na₂ ou de 35-S-méthionine.

b. Matériel biologique et méthodes expérimentales

1) Choix et nombre d'animaux

Nous avons utilisé, pour l'ensemble des expériences, menées sur cette espèce, 57 Cobayes mâles et femelles de 150 à 360 gr.

2) Nature des radiomolécules utilisées, conditions expérimentales, techniques d'étude

α- Sulfate de sodium marqué au S-35

Les doses de 35-SO₄Na₂ injectées par voie intrapéritonéale ont été de 1 à 5 microcuries par gramme de poids corporel.

Nous avons utilisé 27 Cobayes mâles et femelles, dont 6 avaient été thyroïdectomisés chirurgicalement 20 jours avant l'injection et 4 avaient subi un traitement préalable au propylthiouracile *(PTU) sous forme de poudre mélangée à la nourriture pendant 3 semaines.

Les autopsies ont été pratiquées à des délais variables : 4 h, 6 h, 24 h après l'injection. Les hypophyses ainsi que d'autres organes (moelle osseuse, thyroïde, pancréas, intestin) ont été fixés au formol à 10 % ou au formol-Baker en vue de leur étude histoautoradiographique.

β - DL-méthionine marquée au S-35

Cette radiomolécule a été utilisée dans des expériences in vivo et in vitro.

. Etudes in vivo : nous avons utilisé 24 Cobayes mâles et femelles. Les doses de 35-S-méthionine injectées ont été de 1 μ C à 0,5 μ C par gramme de poids corporel. Les autopsies ont été pratiquées à des temps variables : 10 mn, 20 mn, 1 h, 3 h, 4 h, 24 h, 3 jours, 4 jours, 5 jours après l'injection intrapéritonéale. Les hypophyses ont été fixées au formol à 10 % ou au formol-Baker en vue de leur étude histoautoradiographique.

. Etudes in vitro : de petits fragments prélevés dans les différentes zones de la pars distalis de la préhypophyse de 6 Cobayes ont été mis en survie soit dans du liquide de "TYRODE" soit sur un milieu de culture gélosé préparé selon WOLFF et HAFFEN (1952). La quantité de 35-S-méthionine ajoutée aux milieux de culture a été de 1 μ C par ml de milieu. Après des délais de survie de 1 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, les fragments de préhypophyse ont été fixés au formol à 10 % ou au formol-Baker en vue de leur étude histoautoradiographique.

c. Résultats expérimentaux

1) après injection de 35-SO₄Na₂ (DEMINATTI, 1961 a 1962 a)

L'examen, à un faible grossissement, du complexe hypophysaire des animaux témoins, met en évidence une radioactivité plus intense au niveau des lobes antérieur et intermédiaire que postérieur.

L'étude des coupes exposées durant de longs délais permet de constater, uniquement dans la région antéro-médiane du lobe antérieur, la présence de zones qui sont le lieu d'une concentration de 35-S attestée par l'abondance des grains photographiques dans l'émulsion photographique. Ces zones sont d'autant plus évidentes que le délai entre l'injection et l'autopsie est plus long et que la dose de radiosulfate injectée est plus forte. Sur une même coupe, ces zones, dont l'intensité du noircissement diffère, sont de taille variable et leur nombre généralement faible varie d'une coupe à l'autre. En dehors de ces zones, les grains photographiques sont en nombre plus faible et ont une répartition uniforme. L'analyse de ces zones intensément radioactives montre qu'elles correspondent à des cellules isolées ou groupes cellulaires qui sont colorables par le BA, l'AF et le

Fig. 1 - Histoautoradiographie d'une partie de région antéromédiane de la préhypophyse d'un Cobaye de 280 gr. après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$ (100 uC). Autopsie 24 h après l'injection. Gross.: X 600

Fig. 2 - Même région que fig. 1 après coloration à l'AF. La comparaison des clichés 1 et 2 permet de constater que les zones où les grains photographiques sont les plus abondants correspondent à des zones AF+. Gross. : X 600

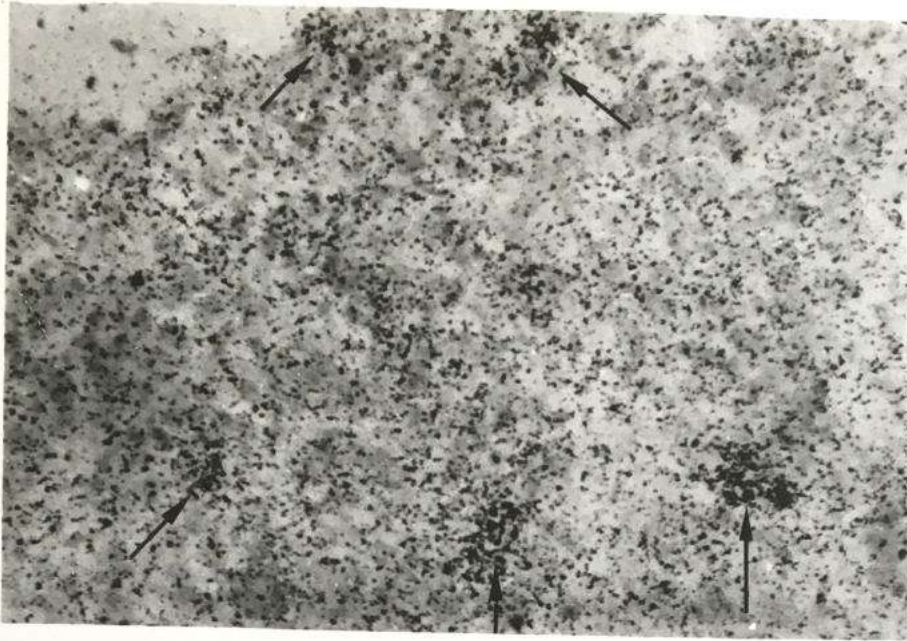


fig.1



fig.2

PAS. Par ailleurs, sur une même coupe, on rencontre aussi des cellules ayant ces propriétés histochimiques au-dessus desquelles le nombre des traces est faible (Planche V).

Enfin, la thyroïdectomie chirurgicale ou chimique ne modifie pas ce phénomène du point de vue de la nature des cellules qui fixent intensément le 35-S. Précisons que la recherche de variations quantitatives de cette incorporation dans les cellules BA+, avec la technique autoradiographique, nous est apparue aléatoire chez cette espèce, à la suite des résultats de l'analyse biochimique des préhypophyses indiquant la présence de 35-S organique en quantité notable et variable après injection de radiosulfate.

2) après injection de 35-S-méthionine (DEMINATTI, 1961 b)

L'examen, à un faible grossissement, des autoradiographies du complexe hypophysaire montre, comme dans le cas des injections de radiosulfate, que la radioactivité est plus intense dans le lobe antérieur et intermédiaire que postérieur. Au niveau du lobe antérieur, la répartition des grains photographiques correspond à la structure cordonale de ce lobe et présente des densités variables.

Après coloration au vert de méthyle-pyronine, il est facile de constater que, quel que soit le délai après l'injection, les zones cellulaires à plus forte densité de grains sont les plus riches en matériel pyroninophile. Ainsi, le noircissement de l'émulsion est plus intense au niveau des régions postéro-latérales qui sont, par ailleurs, les plus riches en matériel pyroninophile. De plus, contrairement à ce que l'on observe après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$, nous ne retrouvons pas de zones intensément radioactives, quels que soient les délais expérimentaux, dans la région antéro-médiane où les cellules AF+ sont localisées.

3) étude in vitro en présence de 35-S-méthionine (DEMINATTI, 1961 a)

Les résultats sont identiques à ceux obtenus in vivo, quels que soient l'origine du fragment (zone antéro-médiane ou postéro-latérale), les délais expérimentaux et les conditions de culture; l'intensité de l'incorporation du 35-S est fonction de la pyroninophilie cytoplasmique.

d. Conclusions générales

Ainsi, dans la préhypophyse de Cobaye, l'incorporation de 35-S injecté sous forme de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$ est plus intense dans les cellules PAS+, BA+, AF+ que dans les autres variétés cellulaires. Par contre, l'incorporation du 35-S injecté sous

forme de 35-S-méthionine ou in vitro a lieu principalement dans les cellules chromophobes riches en ribonucléoprotéines, témoins d'une intense synthèse protéique et non dans les cellules AF+. L'étude comparative de ces résultats indique une participation préférentielle du S sous forme de SO_4 au métabolisme des cellules AF+, contrairement aux autres variétés cellulaires.

Cette même intense incorporation de 35-S, après injection de $35-SO_4Na_2$ dans les cellules AF+ d'animaux thyroïdectomisés, nous permet de préciser que la thyroïdectomie ne modifie pas qualitativement ce phénomène et que les cellules concernées ont la fonction thyroïdienne (voir page 8)

Mais, avant d'entreprendre une étude de la vitesse du renouvellement du $35-SO_4$, il nous a paru opportun de procéder à une analyse biochimique de la préhypophyse afin d'identifier la forme chimique du 35-S après injection de $35-SO_4Na_2$. En fait, les résultats de l'analyse biochimique que nous rapporterons dans le chapitre VIII nous ont conduits à ne pas poursuivre nos recherches chez le Cobaye. Mais les résultats biochimiques n'infirmant pas la notion d'une participation des groupements SO_4 au métabolisme des cellules AF+. En effet, l'étude d'autres organes, lieux d'une intense synthèse protéique, dont les acini pancréatiques, montre que l'injection de $35-SO_4Na_2$, contrairement à l'injection de 35-S-méthionine, n'est jamais suivie d'une intense incorporation de 35-S dans ces organes, ce qui montre bien qu'après injection de radiosulfate, la majeure partie du 35-S décelé sur les histoautoradiographies correspond à du $35-SO_4$.

3. ETUDE HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'ADENOHYPOPHYSE DE SOURIS

a. Buts des recherches

Comme pour le Cobaye, nos recherches chez la Souris ont eu pour but de vérifier notre hypothèse de la participation de groupements sulfate au métabolisme des cellules préhypophysaires PAS+, BA+, AF+. L'analyse biochimique (voir p. 68) et les résultats du test histo chimique de la méthylation (voir p. 63) nous permettant d'affirmer cette participation, nous avons jugé opportun d'étudier cette participation dans certaines conditions expérimentales : après thyroïdectomie ou castration.

Ces recherches, chez la Souris thyroïdectomisée ou castrée, ont aussi été entreprises en vue de préciser la nature fonctionnelle des cellules BA+ riches en groupements $35-SO_4$. A cet effet, nous avons mis à profit l'existence de variations fonctionnelles consécutives à la thyroïdectomie ou à la castration, lesquelles entraînent un hyperfonctionnement respectivement des cellules thyroïdennes et gonadotropes (voir p. 11).

Le but des recherches in vitro avec le radio-sulfate a été, d'une part, de déterminer la nature organique ou inorganique du ^{35}S décelé dans les cellules BA+ et, d'autre part, de rechercher les variations de l'incorporation du $^{35}\text{SO}_4$ dans les cultures à long terme qui entraîne une diminution de la sécrétion hormonale (SCHABERG, 1961 - PETROVIC, 1963).

b. Matériel biologique et méthodes expérimentales

1) Choix et nombre d'animaux

Nous avons utilisé au total 574 Souris. Seules les préhypophyses de Souris mâles ont été étudiées après thyroïdectomie chimique, radiothyroïdectomie ou castration, ceci pour des raisons invoquées lors de l'étude histophysiologique de la préhypophyse de cette espèce.

2) Nature des radiomolécules utilisées, conditions expérimentales

α- Recherches in vivo

- Sulfate de sodium marqué au ^{35}S

. Souris normales

Cette étude porte sur 398 Souris mâles et femelles de 18 à 25 gr.

Les doses de radiosulfate injectées par voie intrapéritonéale sont très variables, soit $1\ \mu\text{C}$, $5\ \mu\text{C}$, $10\ \mu\text{C}$ par gramme de poids corporel, soit $100\ \mu\text{C}$, $150\ \mu\text{C}$, $200\ \mu\text{C}$, $300\ \mu\text{C}$ par animal. Mais la dose injectée est identique pour un groupe de 5 à 10 Souris qui sont autopsiées, soit après un même délai, soit à des délais variables, les délais utilisés dans les deux cas étant de 15 mn, 30 mn, 1 h, 5 h, 24 h, 48 h et 72 h. Cette façon de procéder permet, d'une part, de mettre en évidence des variations individuelles éventuelles et, d'autre part, d'étudier les variations de l'incorporation du radiosulfate en fonction du temps. Lors de l'autopsie, nous avons prélevé, en vue de l'étude histoautoradiographique, l'hypophyse et un fragment de la portion terminale du tube digestif : ces organes sont fixés au formol à 10 % ou au formol-Baker. Les coupes d'hypophyse et de rectum du même animal sont placées côte à côte sur les mêmes lames.

Parmi ces cas, 10 ont été utilisés en vue de l'étude histochimique par le "test de la méthylation" (voir techniques histochimiques).

. Souris thyroïdectomisées

La thyroïdectomie chimique a été réalisée chez

118 Souris mâles de 18 à 22 gr. en utilisant le propylthiouracile (PTU) * sous forme de poudre mélangée aux graines (blé) à la dose approximative de 0,1 %. Des lots de 5 à 10 Souris gardées dans une même cage ont ainsi été traitées pendant 21 jours, 1 mois et 2 mois. A 5 ou 10 Souris traitées et provenant d'une même cage, ainsi que des Souris témoins, on injecte simultanément une quantité identique de la même solution de radiosulfate : 100 μC , 200 μC ou 300 μC par animal, suivant les lots. Les autopsies des Souris traitées et témoins sont pratiquées à des délais variables : 15 mn, 30 mn, 1 h, 5 h, 24 h, 48 h, 72 h. Dans les cas de lots ne comprenant que 5 Souris ou moins traitées, les autopsies sont faites, soit après un même délai, soit à des délais extrêmes de 15 mn, 30 mn, 1 h et 72 h. Dans chaque cas, l'hypophyse et le rectum ont été prélevés et fixés au formol à 10 % ou au formol-Baker en vue de leur étude histoautoradiographique, ainsi que la thyroïde qui est prélevée et fixée pour vérifier histologiquement l'action du PTU.

La radiothyroïdectomie par l'I-131 est obtenue après injection de 200 μC de 131-I.

29 Souris mâles de 18 à 24 gr. ainsi traitées ont reçu une injection unique de radiosulfate un mois après l'injection de radioiode. A chacun des groupes formés de 5 à 6 Souris traitées et de 5 à 6 Souris témoins, approximativement de même poids, nous avons injecté la même dose de radiosulfate : 200 ou 300 μC par animal suivant les groupes. Les délais expérimentaux, le matériel fixé ainsi que les modalités de fixation et d'étude, sont par ailleurs identiques à ceux appliqués aux Souris thyroïdectomisées par voie chimique.

. Souris castrées

29 Souris mâles, un mois après la castration et réparties par groupes de 5, ont reçu, en même temps que des Souris mâles normales, une injection unique intrapéritonéale de radiosulfate. Les doses injectées ont été de 100 μC , 200 μC ou 300 μC suivant les groupes. Lors des autopsies des Souris témoins faites 15 mn, 30 mn, 1 h, 5 h, 24 h, 72 h après l'injection, l'hypophyse et une portion du tube digestif terminal sont prélevées en vue de leur étude histoautoradiographique. De plus, un lobe thyroïdien est prélevé pour contrôler histologiquement l'activité fonctionnelle de la thyroïde.

β - Recherches in vitro

La connaissance de la présence éventuelle de 35-S organique provenant du métabolisme des bactéries intestinales, après injection de radiosoufre sous forme de sulfate, chez les Mammifères (PEARSON, 1956), nous a conduits à étudier, par la

.../...

technique histoautoradiographique, la préhypophyse de Souris placée dans les conditions de la culture organotypique sur milieu semi-synthétique additionné de radiosulfate, ce qui permet d'éliminer cet apport éventuel de $^{35}\text{-S}$ organique.

De plus, la constance de l'apport en groupements $^{35}\text{-SO}_4$ dans les explants permet de rechercher les modifications éventuelles de l'intensité de l'incorporation du $^{35}\text{-SO}_4$ dans les cellules en fonction de la durée de la culture.

Au cours de ces expériences, nous avons utilisé la technique de culture organotypique sur gélose de WOLFF et HAFFEN (1952) ou en tubes tournants (8 révolutions par heure) sur milieu semi-synthétique selon PETROVIC (1961) additionné de 20 microcuries de radiosulfate par ml. Ce milieu comporte 10 % de sérum de Poulain et 90 % d'une solution synthétique préconisée par LEPINE et ses collaborateurs (1956), qui comprend la solution saline de HANKS, un hydrolysate enzymatique acide de caséine et de lactalbumine, enrichi de glutamine et de cystéine, ainsi que des vitamines hydrosolubles.

Nous avons réalisé des cultures à court terme et des cultures à long terme à partir de 90 préhypophyses. Pour les cultures à court terme, les fragments de pars distalis provenant de la même préhypophyse sont placés d'emblée en présence du milieu additionné de radiosulfate et après des délais de 24 h, 48 h ou 3 jours, les fragments sont fixés soit au formol à 10 %, soit au BOUIN-HOLLANDE modifié selon HERLANT (1950). Dans les cas de cultures à long terme, nous n'avons utilisé que la technique sur gélose. Après des délais de 24 à 27 jours, les explants sont placés pendant 3 jours sur des milieux additionnés de 20 microcuries de radiosulfate par ml, puis fixés comme ci-dessus.

Dans tous les cas, seuls les explants fixés au formol ont été soumis à l'étude autoradiographique. Sur les fragments fixés au BOUIN-HERLANT, nous avons pratiqué les colorations au PAS, BA et tétrachrome d'Herlant.

c. Résultats expérimentaux

1) Etude histoautoradiographique de l'incorporation du radiosulfate dans la préhypophyse, *in vivo* et *in vitro*, chez la Souris normale

↳ Etude *in vivo* (Planche III) (DEMINATTI, 1962 a - 1965)

Comme chez le Cobaye, l'examen comparatif des autoradiographies et des coupes colorées de préhypophyses permet de constater, après injection de radiosulfate, une incorporation de $^{35}\text{-S}$ dans l'ensemble du parenchyme et l'existence

de zones parenchymateuses éparses plus radioactives dans les lobes latéraux et médian qui correspondent à des cellules BA+, PAS+, AF+.

Certaines précisions quant à l'intensité de cette incorporation peuvent être apportées, d'une part, par l'examen des autoradiographies colorées au BA ou au PAS et, d'autre part, par l'étude de préhypophyses de Souris d'un même lot, c'est-à-dire autopsiées à des temps variables après l'injection d'une même dose de radiosulfate et dont la durée d'exposition des coupes a été identique.

- Ainsi, 15 mn après l'injection, on observe quelques rares grains photographiques sans localisation précise et, parfois avec des doses de 300 μ C, l'examen à un fort grossissement montre quelques rares cellules polygonales BA+ au niveau desquelles les grains photographiques sont plus nombreux. Cette intensité excessivement faible de la radioactivité dans la préhypophyse contraste avec celle déjà importante des cellules à mucus de l'intestin, où la radioactivité est d'ailleurs localisée à la base des boules de mucus.

- 30 mn et 1 h après l'injection, la quantité de 35-S décelé dans la préhypophyse reste encore faible et, avec des fortes doses de radiosulfate, une plus forte concentration de 35-S peut déjà, à un faible grossissement, être décelée dans quelques-unes des cellules BA+ visibles. Mais la quantité de 35-S incorporée dans ces cellules BA+ est encore très faible par rapport aux cellules à mucus de l'intestin au niveau desquelles le 35-S est encore localisé à la base des boules de mucus. L'étude des autoradiographies de cas de 15mn, 30 mn et 1 h colorés au PAS avant la pose de l'émulsion photographique montre nettement que l'incorporation de 35-S n'intéresse pas toutes les cellules PAS+. De plus, il n'existe pas de corrélation constante entre l'intensité de la radioactivité et l'intensité de la coloration au PAS.: les cellules riches en 35-S sont les unes faiblement PAS+, les autres intensément PAS+.

- 5 h après l'injection, l'augmentation globale du noircissement de l'émulsion indique l'augmentation du taux de 35-S incorporé dans l'ensemble du parenchyme préhypophysaire.

Dans les cas d'injection de 100 μ C, 200 ou 300 μ C, la présence de quelques zones plus radioactives est toujours observée. Ces zones correspondent à des cellules PAS+, intensément BA+, qui présentent des degrés de noircissement variables au niveau d'une même coupe. On peut rencontrer une ou deux zones dont le noircissement est comparable à celui des boules de mucus de l'intestin, lesquelles sont d'ailleurs entièrement cachées par les grains photographiques.

Enfin, pour une même dose injectée, on observe des différences d'un animal à l'autre en ce qui concerne l'intensité du noircissement et le nombre des zones intensément

radioactives.

- 24 h après l'injection, le noircissement de l'émulsion est, pour l'ensemble du parenchyme, plus important que celui des cas autopsiés 5 h après l'injection. En ce qui concerne les cellules PAS+ et BA+, on note qu'au niveau d'une même préhypophyse, l'intensité de la fixation de 35-S diffère d'une cellule à l'autre : en effet, comme dans les cas de 5 h, on rencontre des cellules intensément radioactives, des cellules plus faiblement radioactives et des cellules dont l'intensité de la radioactivité est égale à celle des cellules BA-.

Comme dans les cas de 5 h, en plus de ces variations de l'intensité du noircissement d'une cellule BA à l'autre au niveau d'une même préhypophyse, il faut signaler, pour une même dose de radio-sulfate et un même temps d'exposition, les variations du nombre des cellules BA+ intensément radioactives et de cette intensité d'un animal à l'autre. Mais l'intensité du noircissement de l'émulsion au niveau des cellules BA+, les plus riches en 35-S, n'apparaît pas plus importante que celle des cas autopsiés après 5 h ; de plus, elle reste inférieure à celle très élevée des cellules à mucus de l'intestin.

- Enfin, l'étude des cas autopsiés 48 ou 72 h après l'injection ne montre pas de faits nouveaux. Mais précisons que dans les cas de 72 h, les cellules les plus radioactives sont intensément BA+ et sont nettement discernables car l'intensité de leur radioactivité est toujours très importante et que le noircissement de l'émulsion en rapport avec le reste du parenchyme a diminué d'intensité. Dans ces cas, la comparaison du degré de noircissement de ces cellules BA+ et des cellules à mucus de l'intestin indique que l'intensité de la radioactivité de certaines cellules BA+ préhypophysaires peut être supérieure ou égale à celle, d'ailleurs très diminuée, de nombreuses cellules à mucus de l'intestin. Enfin, comme après les autres délais utilisés, la coloration au PAS confirme que cette intense incorporation de 35-S n'intéresse pas toutes les cellules PAS+.

Conclusions

L'ensemble de ces résultats, chez la Souris normale, nous permet de constater que l'injection de radiosulfate est suivie d'une incorporation de 35-S dans toutes les cellules préhypophysaires, mais qu'une fixation plus intense a lieu dans certaines cellules qui sont BA+, PAS+, AF+. Pour une même préhypophyse, l'intensité de la fixation de 35-S dans ces cellules BA+, est variable d'une cellule à l'autre. Cette intensité, faible ou nulle, si le délai entre l'injection et l'autopsie est trop bref (15 mn, 30 mn, 1h), est encore élevée 72 h après l'injection, contrairement à ce que l'on observe au niveau des cellules à mucus de l'intestin (JENNINGS et FLOREY, 1956). Cette différence entre la

préhypophyse et l'intestin est en faveur d'un renouvellement du 35-S plus lent dans ces cellules BA+ préhypophysaires que dans les cellules à mucus de l'intestin. De plus, le fait que la presque totalité du radiosulfate injecté est éliminée de l'organisme 48 h et à fortiori 72 h après l'injection (DZIEWIATKOWSKI, 1949 a, b) est aussi un argument en faveur d'un renouvellement lent du 35-S dans ces cellules préhypophysaires.

En ce qui concerne la nature fonctionnelle de ces cellules préhypophysaires qui fixent intensément le 35-S, nous ne pouvons, sur la seule base des critères morphologiques, histochimiques ou numériques, affirmer leur nature fonctionnelle. Précisons toutefois que ces cellules intensément BA+, AF+, PAS+ ont le plus souvent une forme polyédrique, caractères qui sont en faveur de leur nature thyroïdienne. C'est donc en vue de préciser la nature fonctionnelle de ces cellules que nous avons recherché l'existence de variations du taux d'incorporation du radiosulfate (thyroïdectomie, castration, et in vitro) en fonction de modifications expérimentales du métabolisme des différentes cellules BA+.

β- Etude in vitro (DEMINATTI, 1965, 1967)

. Etude histologique des explants

Dans les cas de cultures à court terme sur gélose ou en tubes tournants, l'application des techniques de coloration tétrachromique d'Herlant, PAS, BA, montre la conservation de toutes les variétés cellulaires chromophiles.

Dans les cas de cultures à long terme, les colorations utilisées nous permettent de constater que les explants sont formés de nombreuses cellules dépourvues de granulations chromophiles, de cellules orangéophiles et de quelques cellules PAS+, BA+ isolées ou groupées, plus ou moins abondantes suivant les explants. Les explants sont toujours délimités par une "membrane" formée de cellules de nature glandulaire identique à celle observée par PETROVIC (1961) chez le Cobaye. Le vieillissement des explants est caractérisé par une réduction de leur volume et histologiquement on note l'abondance dans certains explants de noyaux pycnotiques associée à une diminution du volume des cellules. Ainsi, après plusieurs semaines de culture, presque tous les explants préhypophysaires de Souris contiennent comme la préhypophyse in situ des cellules colorables en bleu par le tétrachrome d'Herlant, PAS+ et BA+.

. Etude histoautoradiographique des explants

Cultures à court terme (Planche VI, fig. 5 et 6)

Quel que soit le procédé de culture utilisé, sur gélose ou en tubes tournants, l'examen des autoradiographies

Fig. 1 - Histoautoradiographie d'une coupe non colorée du lobe latéral d'une préhypophyse de Souris mâle ayant reçu 100 uC de radio-sulfate. Autopsie 24 h après l'injection. Lame recouverte par l'émulsion photographique sans oxydation préalable au permanganate sulfurique. Noter la présence dans ce cas de nombreuses zones radioactives. Gross. : X 60

Fig. 2 - Histoautoradiographie (même cas que la fig. 1) colorée au BA à pH 0,2. La coupe a été oxydée au permanganate sulfurique avant l'application de l'émulsion photographique. Noter, en comparant avec la fig. 1, que ni l'oxydation au permanganate sulfurique, ni la coloration au BA n'ont entraîné de diminution du nombre des grains photographiques. Gross. : X 60

Fig. 3 - Fragment de préhypophyse de Souris mâle après 27 jours de culture. Fixation au BOUIN-HERLANT. Coloration au PAS-glychémalun.

Fig. 4 - Histoautoradiographie d'un explant préhypophysaire de Souris mâle après 27 jours de culture dont les 3 derniers jours en présence de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$. Gross. : X 80

Fig. 5 - Fragment de préhypophyse de Souris mâle fixé au BOUIN-HERLANT, après 72 heures de culture. Coloration au PAS-glychémalun.

Fig. 6 - Histoautoradiographie d'une coupe de fragment de préhypophyse de Souris mâle après 3 jours de culture en présence de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$. Noter la différence de l'intensité de la radioactivité entre les figures 4 et 6. Gross. : X 80

Planche VI

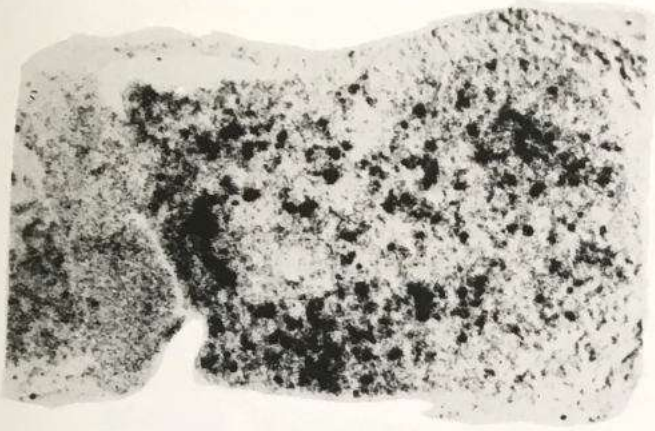


fig. 1



fig. 2



fig. 3



fig. 4

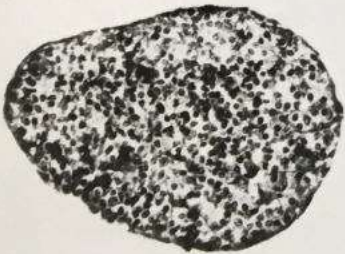


fig. 5

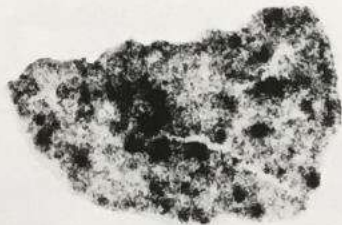


fig. 6

montre la présence, au niveau de presque tous les explants, de zones intensément radioactives dont le nombre varie d'un explant à l'autre. Ces zones intensément radioactives sont en rapport avec des cellules PAS+, BA+, AF+.

Comme in vivo, ces zones ne présentent pas toutes la même intensité de radioactivité et toutes les cellules PAS+, BA+ ne sont pas le lieu d'une intense fixation de $^{35}\text{SO}_4$. De plus, l'intensité de la radioactivité ne varie pas d'une façon significative en fonction de la durée de la culture (24 h - 3 jours).

Cultures à long terme (Planche VI, fig. 3 et 4)

Comme dans les cas à court terme, certains explants ne présentent pas de zones intensément radioactives. Au niveau d'autres explants, on observe des zones plus radioactives qui correspondent à des cellules BA+. De plus, il apparaît que le noircissement de ces zones est moins intense qu'au niveau d'explants provenant de cultures à court terme.

Conclusions

Etant donné que les tissus de Mammifères sont incapables de métaboliser le S sous forme de SO_4 en S organique (TRAVER et SCHMITT, 1939), ces expériences nous permettent donc d'affirmer la participation intense de groupements SO_4 au métabolisme des cellules PAS+, AF+, BA+ de la préhypophyse de Souris.

En ce qui concerne la diminution de l'incorporation du radiosulfate dans les cultures à long terme, étant donné que la culture n'a pas entraîné la disparition des cellules BA+, cette diminution peut s'interpréter comme résultant d'une participation plus faible des groupements SO_4 au métabolisme de ces cellules BA+ en rapport soit avec un ralentissement global du métabolisme cellulaire, soit avec une diminution spécifique de la synthèse des molécules dont font partie les groupements SO_4 .

2) Etude histoautoradiographique de l'incorporation du radiosulfate dans la préhypophyse chez la Souris thyroïdectomisée ou castrée.

α- après thyroïdectomie (Planche VII)

Précisons de suite que les résultats autoradiographiques obtenus après thyroïdectomie chimique ou radiothyroïdectomie sont identiques. La seule différence est l'obtention régulière et constante de cellules de thyroïdectomie dans la préhypophyse après radiothyroïdectomie, alors qu'après traitement au PTU dans plusieurs cas, nous n'avons pas obtenu de cellules thyroïdoprives caractéristiques, malgré l'aspect hyperactif de la thyroïde : ces cas ont donc été éliminés.

- 15 mn après l'injection de radiosulfate, contrairement aux animaux témoins, on observe déjà sur les autoradiographies de nombreuses concentrations de grains photographiques, réparties dans les différents lobes de la préhypophyse. La coloration au BA montre nettement que ces zones radioactives BA- correspondent à des cellules de thyroïdectomie qui sont nombreuses et volumineuses. A l'échelle cellulaire, la répartition des grains peut être diffuse ou localisée dans le cytoplasme parfois au voisinage du noyau. Sur les coupes colorées au PAS, on peut vérifier que ces cellules riches en 35-S sont PAS-. Mais toutes les cellules de thyroïdectomie ne sont pas "marquées" et, de plus, l'intensité du "marquage" varie d'une cellule à l'autre. Enfin, à côté des cellules de thyroïdectomie très radioactives, la plupart des cellules BA+ et l'ensemble du parenchyme, comme chez les témoins, n'ont pas fixé intensément du 35-S.

- 30 mn et 1 h après l'injection, les zones radioactives sont plus nombreuses et le noircissement de l'émulsion est plus intense que dans les cas précédents et à fortiori que chez les témoins. Après coloration au BA ou au PAS, ces zones intensément radioactives correspondent à des cellules thyroïdoprives BA- et PAS-. De plus, on observe des cellules BA+, PAS+ qui, comme chez les témoins, ont fixé du 35-S.

- 5 h après l'injection, le noircissement de l'émulsion très intense intéresse l'ensemble du parenchyme ; il est, de ce fait, plus difficile de distinguer une plus forte fixation de 35-S dans les cellules thyroïdoprives ou BA+. Dans plusieurs cas, par contre, les grains photographiques sont nettement moins abondants au-dessus de la majorité des "cellules de thyroïdectomie" que des autres cellules.

- 24 h, 48 h, 72 h après l'injection, on est frappé par l'existence de larges zones très faiblement radioactives à la périphérie desquelles le "marquage" est plus important ; on rencontre de très rares cellules très radioactives.

La coloration au BA ou au PAS nous révèle que les larges zones correspondent à des cellules thyroïdoprives PAS- et BA- et que les petites zones les plus riches en grains photographiques sont en rapport avec des cellules BA+ et PAS+.

En ce qui concerne l'évolution de la radioactivité en fonction du temps dans les cellules à mucus de l'intestin, nous n'avons pas observé de différences entre animaux traités et témoins.

β - après castration

Alors que dès l'examen à un faible grossissement des autoradiographies des préhypophyses même non colorées, il est possible de préciser non seulement que le cas étudié concerne un animal thyroïdectomisé, mais aussi le délai entre l'injection et l'autopsie, il est impossible de distinguer, lors de l'examen

comparatif des autoradiographies des préhypophyses des Souris castrées et témoins, l'origine castrat ou témoin de la préhypophyse.

De même, l'étude comparative des autoradiographies de préhypophyses colorées au BA ou au PAS ne montre pas de différences entre Souris témoins et castrées, non seulement quant à la nature histochimique des cellules intensément radioactives, mais aussi en ce qui concerne les variations de l'intensité de la radioactivité de ces cellules en fonction du délai entre l'injection de $^{35}\text{-SO}_4$ et l'autopsie. Cette absence de différence entre Souris mâles, témoins et castrées est due au fait que la castration n'entraîne pas de modifications numériques ou fonctionnelles des cellules PAS+, BA+, AF+, ainsi que nous l'avons vu lors de l'étude histophysiological (voir p. 11).

Conclusions

Les recherches après thyroïdectomie nous permettent donc de constater que les "cellules de thyroïdectomie" préhypophysaires chez la Souris, après injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$, fixent intensément du $^{35}\text{-S}$, lequel se trouve sous la forme de groupements radiosulfate vu les délais expérimentaux très courts (15 mn à 1 h). Après castration, comme chez les Souris témoins, ce sont les cellules PAS+, BA+, AF+ qui fixent le plus intensément le radiosulfate.

L'étude comparative des autoradiographies des préhypophyses d'animaux témoins thyroïdectomisés ou castrés montre que cette intense incorporation de radiosulfate est plus précoce et de plus courte durée dans les cellules thyroéoprives qu'au niveau des cellules BA+ des animaux témoins castrés ou thyroïdectomisés, ce qui peut s'expliquer par un renouvellement plus rapide du radiosulfate dans les cellules thyroéoprives.

d. Conclusions générales

L'ensemble des résultats obtenus par la technique histoautoradiographique sur la préhypophyse de Souris normale, thyroïdectomisée, castrée, permet d'admettre la nature thyroéotrope (cellules δ) des cellules qui, parmi les cellules préhypophysaires, fixent le plus intensément du $^{35}\text{-S}$ après injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$. Les études in vitro indiquent que le $^{35}\text{-S}$ décelé dans ces cellules thyroéotropes correspond à des groupements $^{35}\text{-SO}_4$.

S'il existe, ~~une~~ concordance, quelles que soient les conditions expérimentales et le délai après l'injection, entre l'affinité des cellules préhypophysaires pour le PAS, BA, l'AF et l'intensité de la fixation du $^{35}\text{-SO}_4$ par rapport aux autres

Histoautoradiographies de préhypophyses et de tubes digestifs terminaux de Souris appartenant à un même lot : injection le même jour d'une même dose de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ (100 μC), durée d'exposition identique.

Fig. 1 - Histoautoradiographies d'un lobe latéral de préhypophyse et d'une partie du tube digestif terminal d'une Souris mâle radiothyroïdectomisée. Autopsie 15 mn après l'injection de radio-sulfate.

Fig. 2 - Histoautoradiographies d'un lobe latéral de préhypophyse et d'une partie du tube digestif terminal d'une Souris mâle radiothyroïdectomisée. Autopsie 1 heure après l'injection.

Fig. 3 - Histoautoradiographies d'un lobe latéral de préhypophyse et d'une partie du tube digestif terminal d'une Souris mâle témoin. Autopsie 24 h après l'injection.

Hypophyses : gross. X 80

Tubes digestifs : gross. X 90.

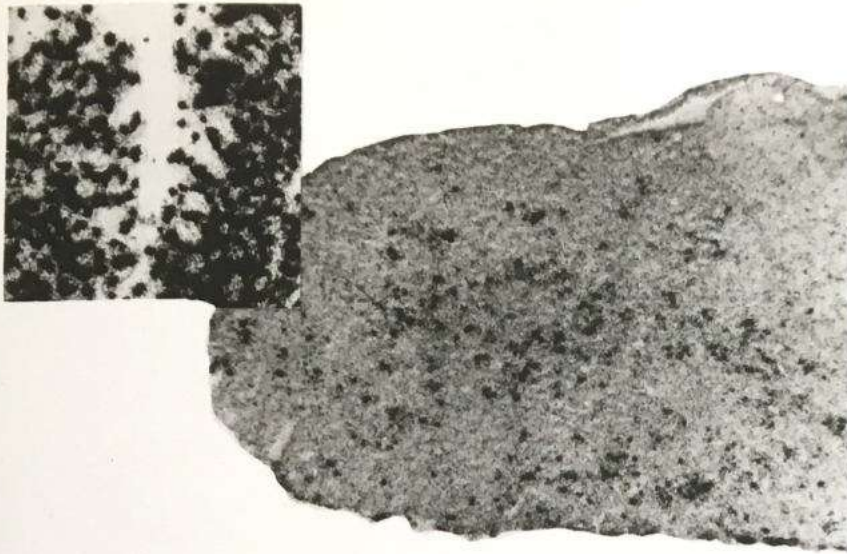


fig 1

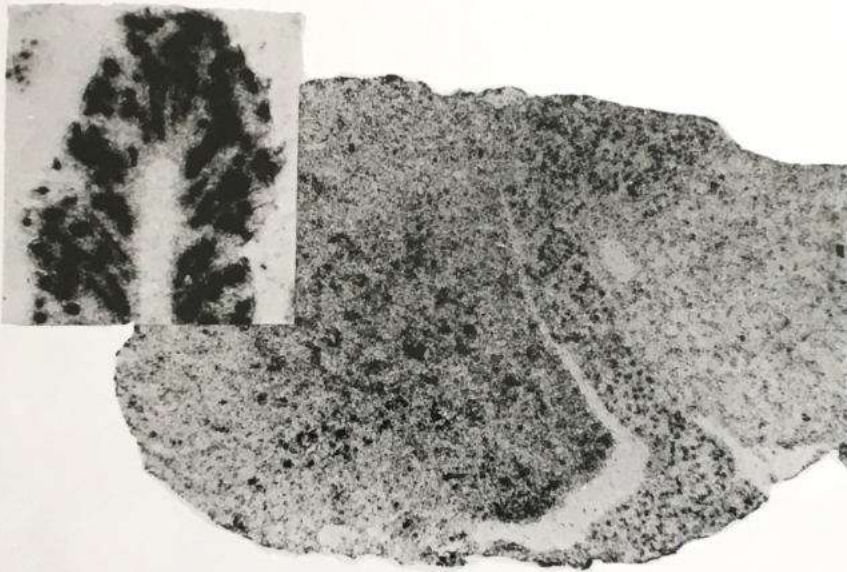


fig 2

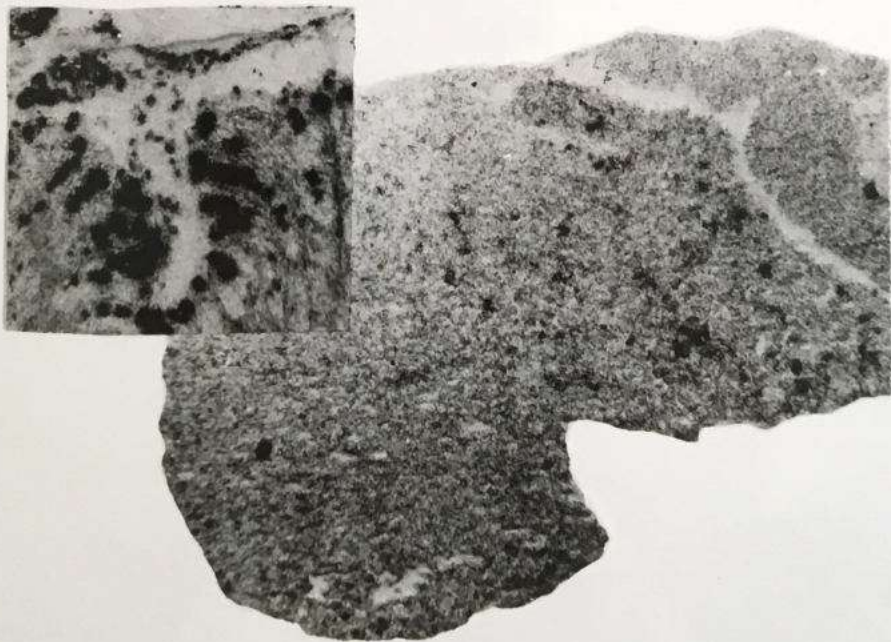


fig 3

types cellulaires, il faut souligner que l'absence de cette concordance, dans le cas des cellules de thyroïdectomie (PAS-, BA-, AF-), est associée à un renouvellement plus rapide des groupements radiosulfates. Ce renouvellement rapide dans les cellules de thyroïdectomie est attesté par la précocité (15 mn à 1 h après l'injection) et la courte durée (5 h environ après l'injection) de la fixation intense du radiosulfate. Etant donné que la thyroïdectomie entraîne une hyperactivité glandulaire des cellules PAS+, BA+, AF+ qui deviennent PAS-, BA-, AF-, il apparaît nettement que l'augmentation de la vitesse du renouvellement du radiosulfate dans ces cellules est liée à l'augmentation de leur activité glandulaire, donc de leur taux de synthèse hormonale. A l'inverse dans les cultures à long terme qui sont caractérisées par une diminution du taux de synthèse hormonale, on note une diminution de l'incorporation du radiosulfate. Ainsi, il apparaît que la vitesse et le taux du renouvellement des groupements sulfates dans les cellules thyroïdotropes est fonction du degré d'activité glandulaire de ces cellules, donc de leur taux de synthèse hormonale.

Mais nous ne pouvons, avec la technique autoradiographique, apporter de précisions quant à la nature des substrats qui fixent du $^{35}\text{SO}_4$, c'est-à-dire si ces groupements sulfates sont incorporés dans des polysaccharides constitutifs de l'hormone thyroïdoprotropique. Par ailleurs, la présence de polysaccharides sulfatés dans ces cellules n'exclut pas la synthèse simultanée de polysaccharides d'une autre nature.

4. ETUDE HISTO AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'ADENOHYPOPHYSE DE CARASSIUS AURATUS L.

a. Buts des recherches

Ainsi que nous l'avons vu précédemment (voir p.12), le Cyprin qui, par ailleurs, est facile à se procurer et à conserver au laboratoire, présente une adénohypophyse particulièrement riche en cellules PAS+ AF+, BA+. Il nous est donc apparu être un bon matériel pour vérifier notre hypothèse quant à la présence de groupements SO_4 dans ces cellules. Comme pour le Cobaye et la Souris, nous avons procédé à l'étude de l'adénohypophyse par la technique histautoradiographique après injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$. L'étude autoradiographique en microscopie électronique a été réalisée en vue d'analyser les origines différentes du ^{35}S à l'échelle ultrastructurale, ceci pour corroborer les résultats de l'étude biochimique (voir chapitre VIII). Nous avons aussi analysé, par la technique histautoradiographique, la répartition d'autres radiomolécules :

.../...

l'emploi de la 35-S-méthionine permet de réaliser une étude de la répartition de 35-S injecté sous forme organique. Nous avons confirmé les résultats obtenus avec la 35-S-méthionine en les comparant à ceux obtenus avec deux autres acides aminés marqués, dont l'un est cyclique : la phénylalanine et la leucine.

De plus, la connaissance des travaux de PETERSON et LEBLOND (1964) sur les lieux de synthèse mucopolysaccharidique avec le D-glucose-6-3-H nous ont conduits à procéder à une étude du même type sur l'adénohypophyse de Cyprin.

Enfin, nous avons étudié la répartition de la radioactivité dans l'adénohypophyse de Cyprin après injection de radioacétate. En effet, SCHILLER et coll. (1956) ont montré l'identité de la vitesse du renouvellement des molécules de glucose, sulfate, acétate lors de la synthèse des molécules mucopolysaccharidiques, ceci non pas avec la technique histoautoradiographique, mais après isolement biochimique des molécules mucopolysaccharidiques. Nous espérons, comme dans le cas du glucose marqué, observer, quelques minutes après l'injection, une localisation sélective de la radioactivité dans les cellules PAS+, BA+, AF+. Nous verrons que les ions acétate injectés participent, en fait, essentiellement à l'anabolisme protéique et que la technique histoautoradiographique ne convient pas pour démontrer la participation des ions acétates à la biosynthèse mucopolysaccharidique des cellules AF+ préhypophysaires.

b. Matériel biologique et méthodes expérimentales

1) Choix et nombre des animaux

Nous avons utilisé au total 272 Cyprins mâles et femelles d'une taille de 6 cm à 13 cm, dont 134 ont servi à nos recherches sur l'incorporation du radiosulfate.

Nos observations ont été faites à différentes périodes de l'année, sauf au mois d'Août. Les Cyprins sont conservés à la température du laboratoire (18 à 20°C) avec un éclairage naturel quelques jours avant l'injection d'une des radiomolécules. Après l'injection, soit ils sont placés dans l'eau courante, soit l'eau est renouvelée toutes les 12 heures.

2) Nature des radiomolécules utilisées, conditions expérimentales.

Toutes les recherches effectuées sur ce matériel ont été réalisées in vivo et les radiomolécules, après dilution dans l'eau distillée, ont été injectées par voie intrapéritonéale, sans anesthésie avec une aiguille intradermique.

Contrairement à la Souris ou au Cobaye, nous avons constaté et vérifié, en injectant une substance colorée,

que fréquemment le liquide injecté ressort par l'orifice d'injection soit au moment même du retrait de l'aiguille, soit dans les minutes qui suivent l'injection : ceci est un inconvénient majeur pour une éventuelle étude quantitative. Mais nous n'avons pas à tenir compte de ce fait, puisque nos recherches sur ce matériel ne sont pas quantitatives.

Les radiomolécules utilisées ont été les suivantes : $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$, $^{35}\text{-S}$ -méthionine, 3-H-phénylalanine, 3-H-leucine, 3-H-6-glucose, 3-H-acétate de Na.

Injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$

. Etude histoautoradiographique en microscopie photonique

Les Poissons répartis en groupes de 5 à 10 poissons ont reçu une dose de 2 à 10 μC de radiosulfate par gramme de poids corporel.

Les autopsies ont été pratiquées 30 mn, 1h, 5 h, 24 h, 48 h, 72 h après l'injection. L'hypophyse et le tube digestif sont prélevés, puis fixés au formol à 10 % ou au formol-Baker. Après inclusion à la paraffine, ces organes sont débités en coupes sériées d'une épaisseur de 3 μ en vue de leur étude histoautoradiographique.

Parmi ces cas, 15 cas autopsiés 24 h après l'injection de 10 μC de radiosulfate par gramme de poids corporel ont été utilisés pour des recherches sur le test histochimique de la "méthylation".

. Etude autoradiographique en microscopie électronique

Les deux préhypophyses ont été examinées 24 h après l'injection d'une millicurie de radiosulfate.

La durée d'exposition n'a été que d'un mois, ceci afin d'obtenir un faible nombre de grains photographiques.

Injection de D-L-méthionine marquée au $^{35}\text{-S}$

Cette étude porte sur 35 Cyprins normaux auxquels nous avons administré 0,5 μC de $^{35}\text{-S}$ -méthionine par gramme de poids corporel.

Les autopsies ont été pratiquées 24 h après une injection unique intrapéritonéale. Les hypophyses ont été fixées au formol à 10 % ou au formol-Baker, puis débitées en coupes sériées en vue de leur étude histoautoradiographique. Parmi ces cas, 6 ont été utilisés pour des recherches sur le test histochimique de la "méthylation" (voir techniques histochimiques).

Injection de 3-H-phénylalanine

Nous avons étudié les hypophyses de 32 Cyprins normaux, 24 h après l'injection intrapéritonéale de 1 à 5 μC par gramme de poids corporel de 3-H-phénylalanine. Les hypophyses prélevées, après l'injection, ont été fixées au formol-Baker, puis les coupes sériées soumises à l'étude histoautoradiographique.

Injection de 3-H-Leucine

Cette étude histoautoradiographique porte sur 23 Cyprins normaux auxquels nous avons administré 100 à 200 μC par poisson. Les autopsies ont été pratiquées 15 mn, 30 mn, 1 h, 5 h, 24 h après l'injection. L'hypophyse et une portion du tube digestif terminal ont été, dans chaque cas, fixés au formol-Baker ou au formol à 10 % puis coupées en séries en vue de leur étude histoautoradiographique.

Injection de D-glucose-6-3-H

Nous avons utilisé 9 Cyprins normaux auxquels nous avons injecté par voie intrapéritonéale la dose unique de 500 μC de D-glucose-6-3-H. Les autopsies ont été pratiquées 15 mn, 1 h 30, 24 et 48 h après l'injection. Après fixation au formol-Baker, les hypophyses et un fragment du tube digestif terminal de chaque cas sont coupés en séries et soumis à l'étude histoautoradiographique.

Injection de 3-H-acétate de Na

Cette étude porte sur 39 Cyprins normaux auxquels nous avons administré la dose de 500 à 700 μC d'acétate de Na marqué au tritium par poisson. Les autopsies ont été pratiquées 5 mn, 15 mn, 1 h, 6 h, 24 h après l'injection intrapéritonéale. Les hypophyses fixées au formol à 10 % ou au formol-Baker sont coupées en séries en vue de leur étude histoautoradiographique.

c. Résultats

1) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprins après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$

α - Microscopie photonique (Planche VIII)
(DEMINATTI, 1962a, 1962b, 1962d)

L'étude des autoradiographies de l'ensemble de l'adénohypophyse montre, quels que soient les délais expérimentaux,

qu'une incorporation de 35-S a lieu dans les différents lobes (pro-, méso-, métaadénohypophyse) et que les ramifications du lobe nerveux sont toujours les moins "marquées".

Au niveau de la métaadénohypophyse, la répartition des grains photographiques est toujours uniforme ; le noircissement est aussi moins intense qu'au niveau du reste de l'adénohypophyse.

Au niveau des lobes pro- et mésoadénohypophysaires, on observe, quel que soit le délai après l'injection, une répartition inégale des grains photographiques due à la présence de zones plus riches en grains. L'étude comparative des autoradiographies et des coupes colorées au PAS, BA ou AF, ainsi que l'examen des coupes colorées au BA ou au PAS, permettent de constater que ces zones plus radioactives correspondent à des cellules BA+, PAS+, AF+, visibles dans la pro- et la mésoadénohypophyse. Il existe des différences quantitatives importantes quant à l'intensité de l'incorporation du 35-S d'une cellule BA+ à l'autre présente dans ces deux lobes d'une même préhypophyse.

De plus, le noircissement de l'émulsion située au-dessus des cellules BA+ de la mésoadénohypophyse est souvent plus intense que celui des cellules BA+ de la proadénohypophyse : cette différence est sans doute due au fait que les cellules BA+ mésoadénohypophysaires sont presque toujours par groupes de 2 à 5 cellules et sont plus nombreuses, plus volumineuses, que celles de la proadénohypophyse qui sont plus petites et généralement dispersées dans ce lobe.

Enfin, le "marquage" des cellules BA+, toujours faible dans les cas autopsiés après un court délai, ne présente pas d'augmentation significative d'intensité pour des délais supérieurs à 24 h après l'injection. Signalons que dans quelques cas, 48 h après l'injection les cellules BA+ de la proadénohypophyse sont plus faiblement radioactives.

En ce qui concerne les autres variétés cellulaires PAS-, BA-, AF-, qui entrent dans la constitution des lobes pro- et mésoadénohypophysaires, l'incorporation du 35-S n'est pas négligeable, mais quel que soit le délai expérimental, elle reste toujours nettement inférieure à celle observée dans les cellules BA+.

β - en microscopie électronique

Cette étude nous apporte des résultats complémentaires quant à la localisation du 35-S à l'échelle ultrastructurale 24 h après l'injection de radiosulfate.

Ainsi, au niveau des cellules BA+ (Planches IX à XII) de la mésoadénohypophyse caractérisées par la présence de granulations de taille variable, leur pauvreté en structure ergastoplasmique sacculaire et l'abondance de vésicules cytoplasmiques, le 35-S se rencontre dans les structures cellulaires suivantes :

.../...

l'appareil de Golgi, les granulations de petite et grande taille et quelquefois intracytoplasmiques.

Au niveau des cellules orangéophiles, reconnaissables par leur richesse en structure ergastoplasmique sacculaire et leurs granulations, du 35-S est décelé au niveau des différents organites cellulaires, dont l'ergastoplasme.

Comme en microscopie photonique, ce sont les cellules BA+ qui sont les plus riches en 35-S.

Conclusions

Ainsi, comme chez le Cobaye et la Souris, l'injection de radiosulfate est suivie d'une incorporation de 35-S plus intense dans les cellules BA+, AF+, PAS+ que dans les autres variétés cellulaires de la proadénohypophyse et de la mésoadénohypophyse de *Carassius*.

2) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprin après injection de 35-S-méthionine, 3-H-phénylalanine ou 3-H-leucine (Planches XII et XIII) (DEMINATTI, 1962b, 1962c).

Quel que soit l'acide aminé injecté, 24 h après l'injection, les cellules ou groupes cellulaires de la pars distalis correspondant aux zones les plus faiblement radioactives ont les propriétés histochimiques suivantes : PAS+, BA+, AF+.

Inversement, les zones préhypophysaires au niveau desquelles l'intensité de la radioactivité est la plus élevée n'ont jamais présenté les propriétés histochimiques énumérées ci-dessus : les cellules BA- de la proadénohypophyse étant moins radioactives que celles de la mésoadénohypophyse.

Précisons que dans le cas de la 3-H-leucine, on observe au niveau de la préhypophyse, 15 mn après l'injection, une faible radioactivité déjà localisée essentiellement dans les cellules BA-. Au niveau des cellules à mucus de l'intestin, la radioactivité est toujours de très faible intensité, quel que soit le délai expérimental et l'acide aminé injecté.

Conclusions

De ces résultats autoradiographiques, il ressort qu'il existe une nette différence entre les cellules BA+ et BA- quant à leur degré de synthèse protéique : les cellules BA-, principalement celles de la mésoadénohypophyse étant le lieu d'une intense synthèse protéique ainsi que leur richesse en structures ergastoplasmiques le laissait supposer.

Par ailleurs, le fait qu'après injection de

.../...

35-S organique sous forme de 35-S-méthionine, le 35-S est décelé en plus grande quantité dans les cellules BA- que dans les cellules BA+, contrairement aux résultats obtenus après injection de 35-SO₄, est un argument en faveur de la nature minérale du 35-S décelé dans les cellules préhypophysaires BA+ après injection de 35-SO₄Na₂.

3) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprins après injection de D-glucose-6-3-H.
(Planche XIV) (DEMINATTI, 1966)

- 15 mn après l'injection, au niveau des cellules à mucus de l'intestin, la radioactivité très intense correspond à la zone de Golgi, comme cela a déjà été décrit chez le Rat par PETERSON et LEBLOND (1964a) et NEUTRA et LEBLOND (1966 a et b). Au niveau de la préhypophyse, la radioactivité est de faible intensité et c'est au-dessus des cellules BA+ que les grains photographiques sont les plus abondants. Ces grains sont généralement localisés au-dessus du cytoplasme et nous n'avons pas observé de concentrations dans certaines zones du cytoplasme.

- 1 h 30 après l'injection, l'examen des autoradiographies montre qu'au niveau de la majorité des cellules à mucus, les grains photographiques forment un croissant situé au pôle inférieur de la boule de mucus. Au niveau de la préhypophyse, les grains photographiques quoique très nombreux dans les cellules BA+, sont plus abondants au-dessus des cellules BA- qui, nous l'avons observé par ailleurs, sont le lieu d'une intense synthèse protéique attestée par l'importance de l'incorporation d'acides aminés marqués.

- 24 h et 48 h après l'injection, on observe des cellules à mucus de l'intestin présentant une intense radioactivité localisée dans la boule de mucus. Au niveau de l'adénohypophyse, la répartition différente de l'intensité de la radioactivité entre les cellules BA+ et BA- déjà notée après 1 h 30, apparaît plus nette.

Conclusions

Ainsi, les cellules BA+ de l'adénohypophyse de Cyprin, qui sont les plus radioactives 15 mn après l'injection de D-glucose-6-3-H, apparaissent, 1 h 30, 24 et 48 h après l'injection, moins radioactives que les cellules BA-.

Comme il est démontré que la localisation autoradiographique du D-glucose-6-3-H, quelques minutes après son injection, correspond aux lieux de synthèse de glycoprotéines ou de mucopolysaccharides (PETERSON et LEBLOND, 1964b - COIMBRA et LEBLOND, 1966) le fait que la radioactivité soit décelée dans les cellules BA+ préhypophysaires quelques minutes après l'injection de cette

radiomolécule est un argument en faveur de la synthèse de mucopolysaccharides ou de glycoprotéines dans ces cellules. Le fait qu'après un certain délai ce sont les cellules BA- qui sont les plus radioactives peut s'expliquer par la participation du glucose à d'autres métabolismes, dont, la synthèse protéique.. Cette interprétation est confirmée par l'étude de la répartition de la radioactivité dans l'adénohypophyse après injection d'acétate tritié : les ions acétate étant, en effet, un produit du métabolisme glucidique qui peuvent participer au processus d'anabolisme protidique (in POLONOWSKI, (1965)).

4) Etude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprins après injection de 3-H-acétate (DEMINATTI, 1964).

L'étude des autoradiographies des adénohypophyses montre, quel que soit le délai après l'injection, une répartition inégale de la radioactivité.

L'analyse comparative des autoradiographies et des coupes colorées au PAS permet de constater que, comme dans les cas d'injections d'acides aminés, les zones intensément radioactives correspondent aux cellules PAS- et les zones faiblement radioactives aux cellules PAS+.

Parmi les cellules PAS-, ce sont les cellules de la mésoadénohypophyse qui présentent la plus intense radioactivité. C'est pourquoi la différence d'intensité de la radioactivité entre les cellules PAS+ et PAS-, est plus marquée non seulement avec des délais expérimentaux plus longs, mais aussi au niveau de la mésoadénohypophyse que de la proadénohypophyse.

Conclusions

Ces résultats nous permettent donc de constater que, comme dans les cas d'injections d'acides aminés ou comme dans les cas d'injections de D-glucose., après des délais égaux ou supérieurs à 1 h 30, la participation des molécules d'acétate au métabolisme cellulaire est plus intense dans les cellules PAS-, qui sont le lieu d'une intense synthèse protéique.

Ainsi, la constatation que dès 1 h 30 après l'injection de D-glucose-6-3-H, la radioactivité est plus intense dans les cellules PAS- peut trouver son explication dans une dégradation progressive du glucose après son injection, ce qui a pour conséquence une répartition différente de la radioactivité, suivant le délai entre l'autopsie et l'injection ainsi que suivant la nature du métabolisme des différentes cellules préhypophysaires.

Planche VIII

Fig. 1 - Histoautoradiographie d'une hypophyse de Cyprin après administration de 5 μ C par gramme de poids corporel de radiosulfate. Autopsie 24 h après l'injection. Gross. : X 90

Fig. 2 - Même coupe que la fig. 1 après coloration à l'AF. On voit nettement que toutes les zones fortement radioactives de la mésoadénohypophyse correspondent à des cellules riches en matériel AF++.

Fig. 3 - Histoautoradiographie d'une hypophyse de Cyprin après administration de 0,5 μ C par gramme de poids corporel de 35-S-méthionine. Autopsie 24 h après l'injection. Gross. : X 90.

Fig. 4 - Même coupe que la fig. 3 après coloration à l'AF. Les zones radioactives de la mésoadénohypophyse visibles sur cette coupe sont AF+.

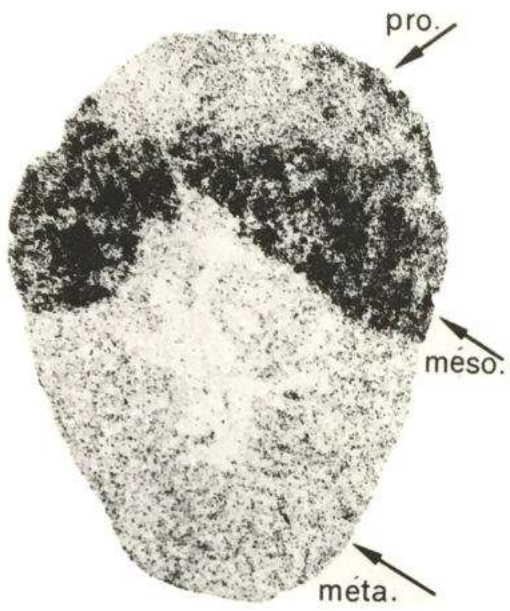


fig. 1



fig. 2

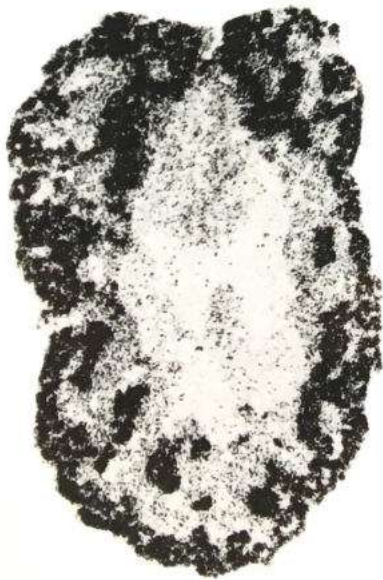


fig. 3



fig. 4

Fig. 1 - Préhypophyse de Cyprin fixée au BOUIN-HERLANT et colorée au tétrachrome d'HERLANT. Le cliché correspond à une portion de la mésoadénohypophyse au niveau de laquelle on voit que les granulations des cellules β ou γ , parfois volumineuses, sont intensément colorées par le Bleu d'Alizarine.

Fig. 2 - Coupe semi-fine d'une région de la mésoadénohypophyse de Cyprin colorée à l'AF, examinée au microscope photonique.

Fig. 3 - Coupe ultra-fine (Gross. : X 1800) sus-jacente à la coupe de la fig. 2 examinée au microscope électronique. La comparaison des fig. 2 et 3 permet l'identification au microscope électronique des cellules AF+. (Cap. = capillaire).

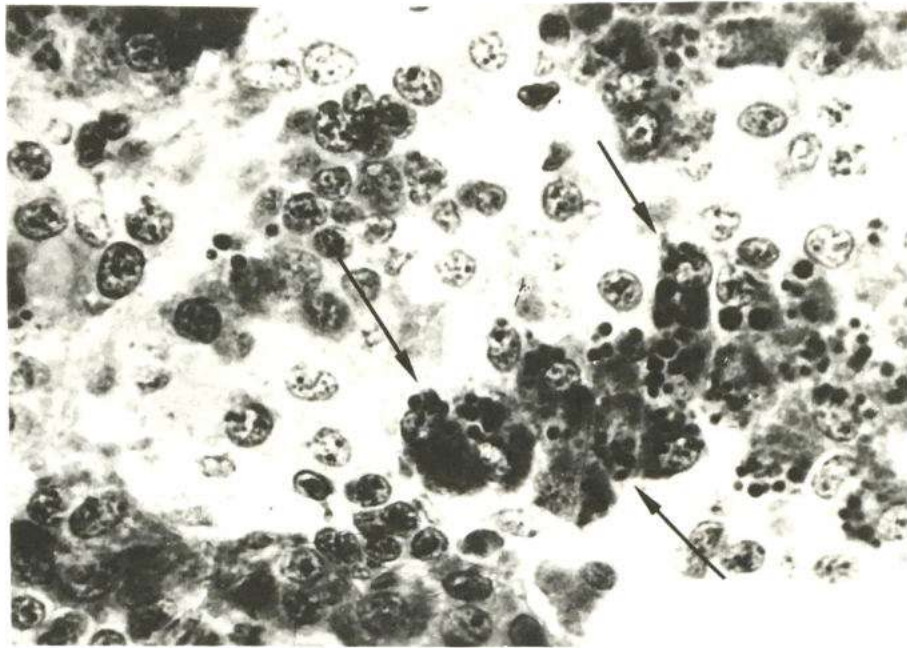


fig. 1

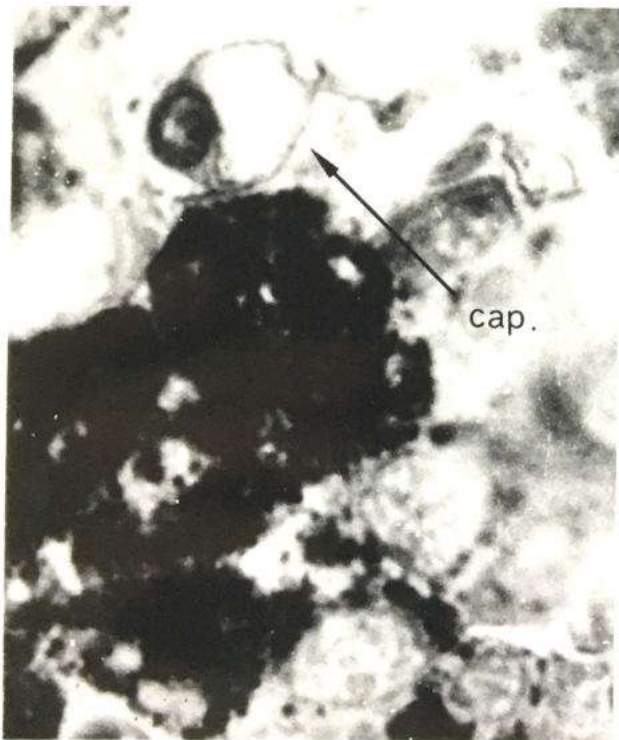


fig. 2



fig. 3

Fig. 1 - Préhypophyse de Cyprin. Cellules AF+ de mésoadénohypophyse (flèche). Noter les variations de taille des granulations (Gross. : X 4000).

Fig. 2 - Cellules AF+ de la mésoadénohypophyse du Cyprin. Autoradiographie en microscopie électronique obtenue après injection de radio-sulfate (prélèvement 24 h après l'injection). Le marquage intéresse aussi bien les petites que les grosses granulations. N = noyau, M = mitochondries. Gross. : X 30.000

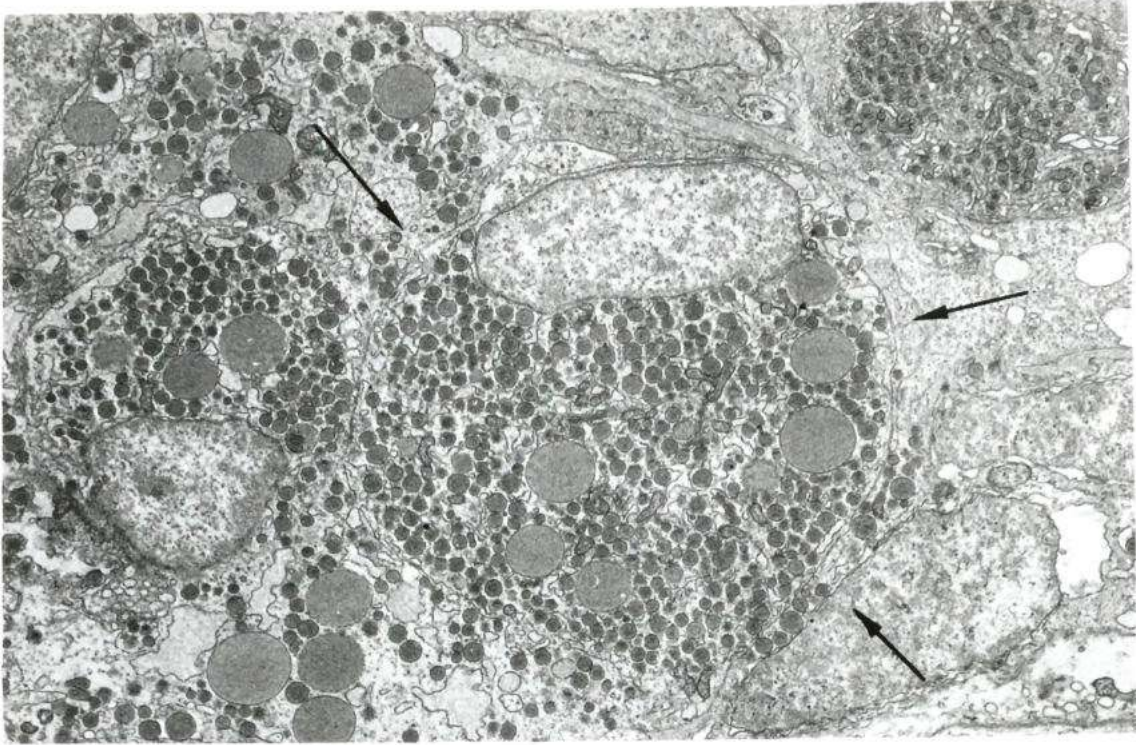


fig. 1

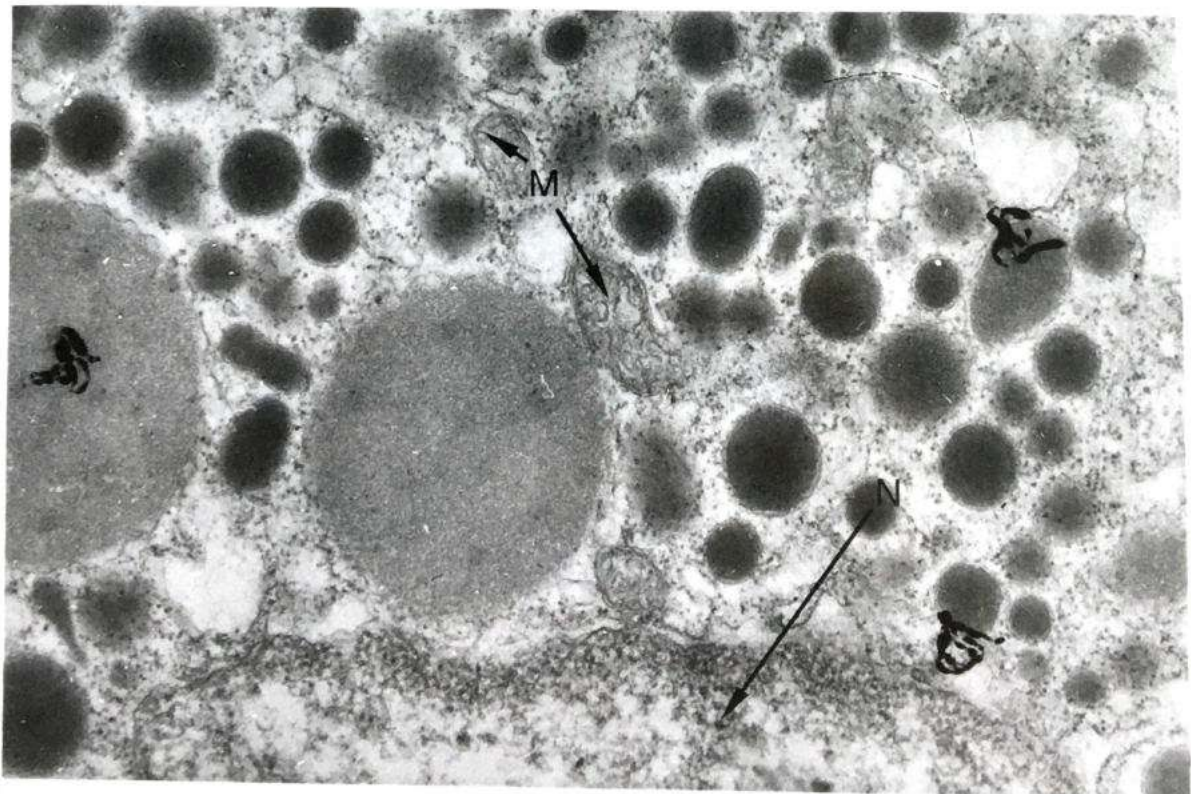


fig. 2

Planche XI

Autoradiographie en microscopie électronique. Même cas que la planche X . Cellules AF de la mésoadénohypophyse de Cyprin.

Fig. 1 - Le marquage intéresse aussi bien les granulations que les sacs ergastoplasmiques (flèche) Gross. : X 30.000.

Fig. 2 - Noter la présence d'un marquage au niveau de l'appareil de Golgi (flèche). Gross. X 30.000

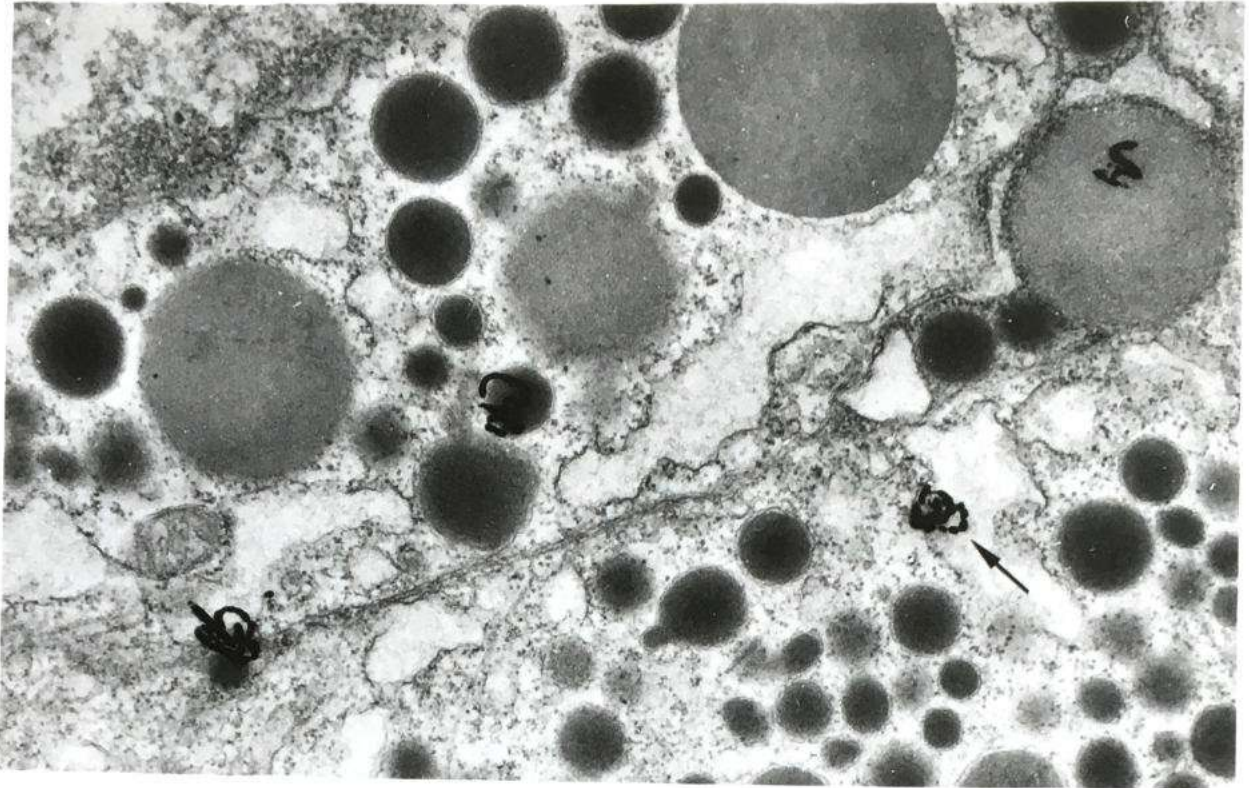


fig. 1

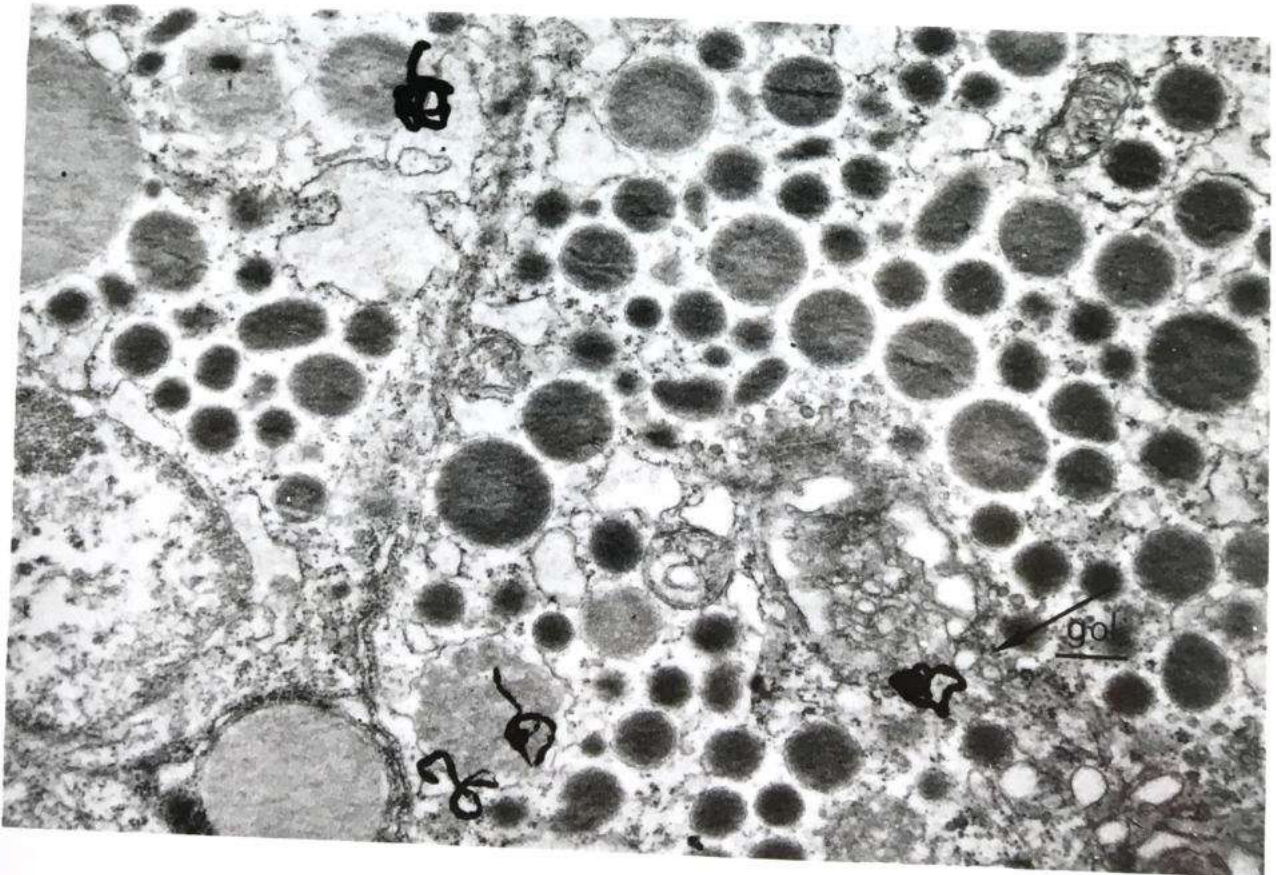


fig. 2

Planche XII

Autoradiographie en microscopie électronique de la préhypophyse de Cyprin. Même technique que la planche X.

Cellules AF+ de la mésoadénohypophyse. Le marquage intéresse différentes structures. Noter aussi l'hétérogénéité dans la taille et la densité des différentes granulations. Gross. X 30000

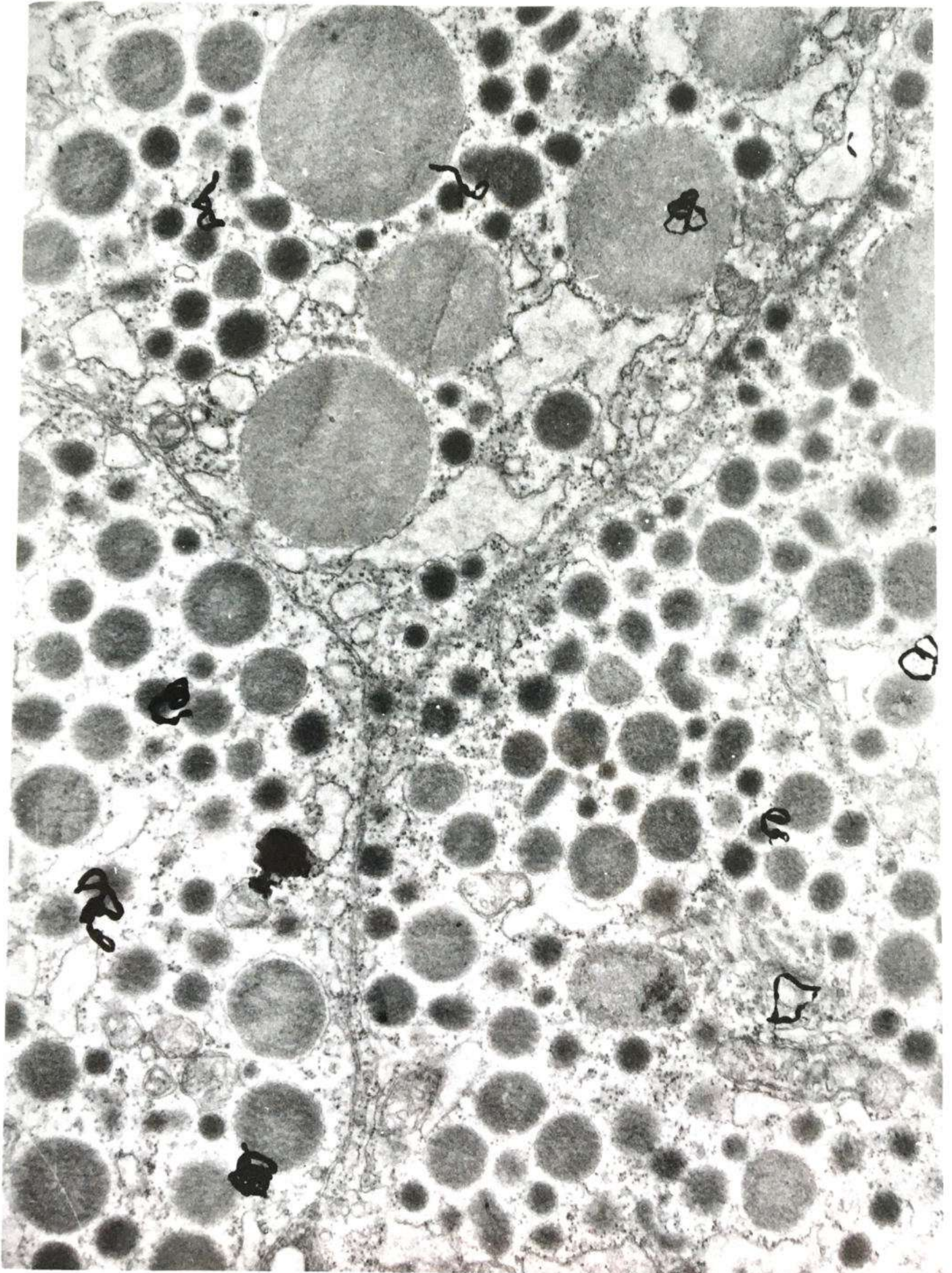


Planche XIII

Adénohypophyse de Cyprin

Fig. 1 et 2 - Autoradiographie (fig. 1) et coupe correspondante colorée à l'AF (fig. 2) d'une partie de la mésoadénohypophyse. 24 heures après l'injection de L-phénylalanine-3-H-2-3. Noter que les zones les plus radioactives sont AF-négatives (exemple : flèches) Gross. : X 128.

Fig. 3 et 4 - Autoradiographie (fig. 3) et coupe correspondante colorée à l'AF (fig. 4) 1 heure après l'injection de DL-Leucine-3-H-4-5. Les cellules AF+ sont les plus faiblement marquées (exemple : zone de la mésoadénohypophyse encadrée par flèches). Gross. X 90

més = mésoadénohypophyse

Fig. 5 et 6 - Autoradiographie (Fig. 5) et coupe correspondante colorée à l'AF (fig. 6) 24 heures après l'injection d'acétate 3-H. Les cellules AF + apparaissent les moins marquées. Gross. X 90.

Planche XIII

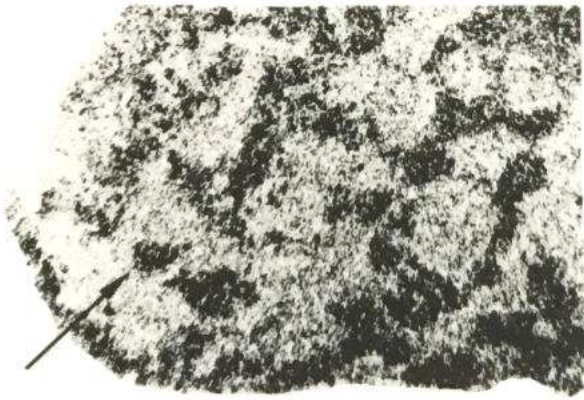


fig.1



fig.2

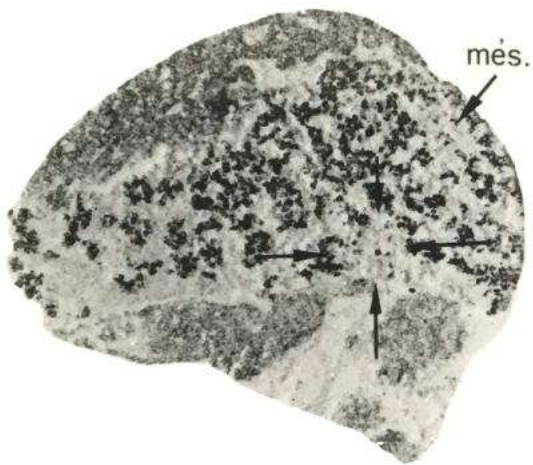


fig.3

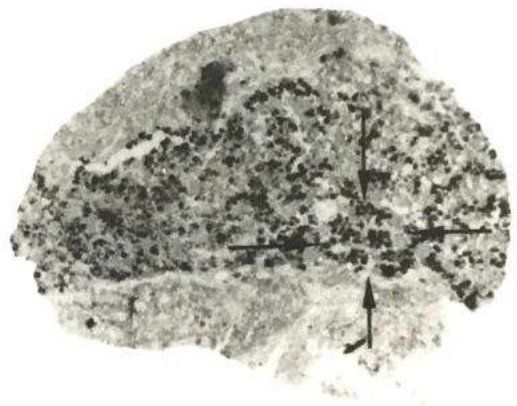


fig.4



fig. 5



fig.6

Planche XIV

Fig. 1 - Autoradiographie colorée au glychémalun d'une partie de la mésoadénohypophyse de Cyprin 15 mn après l'injection de D-Glucose-6-3-H. Gross. : X 400.

Fig. 2 - Autoradiographie colorée au glychémalun d'une partie de tube digestif terminal de Cyprin. Même cas que la fig. 1. Noter l'intense marquage situé à la base des cellules à mucus (flèches). Gross. : X 440.

Fig. 3 - Autoradiographie colorée au glychémalun d'une partie de la mésoadénohypophyse de Cyprin 24 heures après l'injection de D-Glucose-6-3-H. Les zones les plus radioactives correspondent à des cellules AF-négatives. Gross. : X 400.

Fig. 4 - Autoradiographie du tube digestif terminal. Même cas que fig. 3. La radioactivité est concentrée au niveau des boules de mucus. Gross. : X 400.

Planche XIV

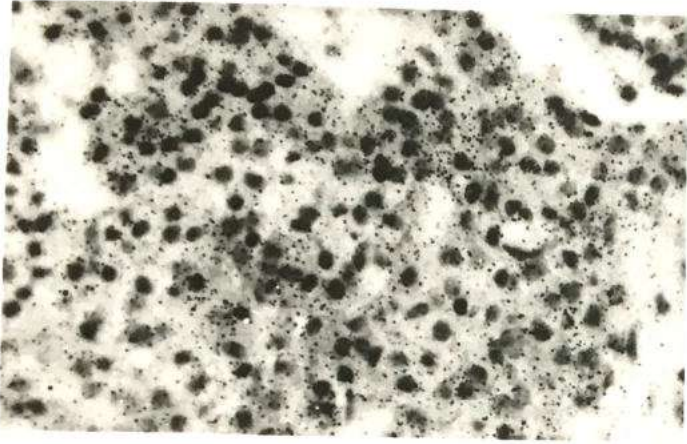


fig. 1



fig. 2



fig. 3



fig. 4

d. Conclusions générales

Ainsi, l'étude histoautoradiographique de l'adénohypophyse de Cyprin, après injection de différentes radiomolécules, met nettement en évidence les différences de nature métabolique qui distinguent les cellules BA+ et BA- : participation intense du 35-S au métabolisme des cellules BA+, PAS+, AF+, s'il est administré sous forme de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$; les résultats obtenus après injection de D-glucose-6-3- H^4 sont en accord avec les propriétés histochimiques des cellules BA+, PAS+, AF+, qui permettent de les classer dans le groupe des cellules à granulations glycoprotéiques. Les études autoradiographiques après injection de 35-S-méthionine, d'acides aminés (phénylalanine, leucine) ou d'acétate de Na marqués au tritium confirment aussi cette différence métabolique entre les cellules BA+ et BA- en montrant que le lieu de la plus intense synthèse protéique se situe dans les cellules BA-, principalement de la mésoadénohypophyse.

5. ETUDE HISTOAUTORADIOGRAPHIQUE DE L'ADENOHYPOPHYSE DE MOLLIENTISIA SPHENOPS, C.V.

a. Buts des recherches

La cytophysiologie adénohypophysaire de ce Poisson étant mal connue, nous avons cherché uniquement à vérifier l'intense incorporation de 35-SO_4 dans les cellules PAS+, BA+, AF+, constatée chez le Cobaye, la Souris et le Cyprin. Cette étude est, en effet, facilitée par le fait que ces cellules sont localisées dans la partie externe de la mésoadénohypophyse (voir p.14).

Comme chez le Cyprin et le Cobaye, nous avons procédé à l'étude histoautoradiographique de l'adénohypophyse après injection de 35-S organique, sous forme de 35-S-méthionine, afin de vérifier si la totalité, sinon la presque totalité du 35-S décelé dans les cellules AF+ après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$ correspond à des groupements 35-SO_4^- .

b. Matériel biologique et méthodes expérimentales

1) Choix et nombre des animaux

Au total, 51 Poissons ont été utilisés appartenant tous à la variété Black-Molly.

2) Nature des radiomolécules utilisées, conditions expérimentales

α - Sulfate de sodium marqué au 35-S

Nous avons étudié l'incorporation du radiosulfate, par la technique histoautoradiographique, dans l'adénohypophyse de cette variété de poisson ovovipare dont 13 étaient des mâles et 26 des femelles en vitellogénèse ou en période de "gestation". Les Poissons maintenus à la température de 20 à 22°C ont reçu une dose de 5 μ C de radiosulfate par gramme de poids corporel. Les hypophyses prélevées 24 h après l'injection unique intrapéritonéale sont fixées au formol à 10 % ou au formol-Baker, puis coupées en séries en vue de leur étude histoautoradiographique.

β - D-L-méthionine marquée au 35-S

Les 12 Poissons, dont 6 mâles et 6 femelles en vitellogénèse ou en période de "gestation" ont reçu une dose de 0,5 μ C par gramme de poids corporel. Les autopsies ont été faites 24 h après l'injection et les hypophyses, après fixation au formol à 10 % ou au formol-Baker, ont été coupées en séries en vue de leur étude histoautoradiographique.

c. Résultats

1) Après injection de radiosulfate (Planche XV, fig.1)
(DEMINATTI, 1963b)

L'examen des autoradiographies permet de constater une répartition inégale de la radioactivité suivant les différentes régions de l'adénohypophyse.

Au niveau de la proadénohypophyse, la radioactivité est de très faible intensité avec des zones plus radioactives en rapport avec le tissu conjonctif. C'est au niveau des cellules BA+, PAS+, AF+ de la partie externe de la mésoadénohypophyse et à un degré moindre au niveau des cellules PAS+, BA- de la métaadénohypophyse que la radioactivité est la plus intense. Une radioactivité de faible intensité s'observe au niveau de la partie interne de la mésoadénohypophyse.

Enfin, signalons que, chez 6 mâles, contrairement aux autres cas, les cellules PAS+, BA- métaadénohypophysaires apparaissent plus radioactives que les cellules PAS+, BA+ mésoadénohypophysaires.

2) après injection de 35-S-méthionine (Planche XV, fig. 2 et 3)

Dans tous les cas étudiés, contrairement à ce que nous avons constaté après injection de radiosulfate, ce sont les

cellules PAS+ de la méso- et de la métaadénohypophyse qui présentent la plus faible intensité radioactive. La proadénohypophyse étant la région la plus riche en 35-S.

d. Conclusions

Comme chez le Cyprin, ce sont les cellules à granulations PAS+ qui sont le lieu de la plus intense incorporation de 35-S après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$.

De plus, le fait que du 35-S injecté sous forme de 35-S-méthionine soit faiblement incorporé dans ces cellules par rapport aux autres variétés cellulaires est en faveur d'une participation intense de 35-S, sous forme de groupements SO_4 , au métabolisme de ces cellules.

Adénohypophyse de Mollienisia sphenops C.V.

Fig. 1 - Autoradiographie 24 heures après l'injection de 100 uCi de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$. Gross. : X 80.

Fig. 2 et 3 - Autoradiographie (fig. 2) et coupe correspondante colorée à l'AF (fig. 3) 24 heures après injection de 35-S-méthionine. Gross. : X 110.

Pro = proadénohypophyse
Mésos = mésoadénohypophyse
Méto = métoadénohypophyse.

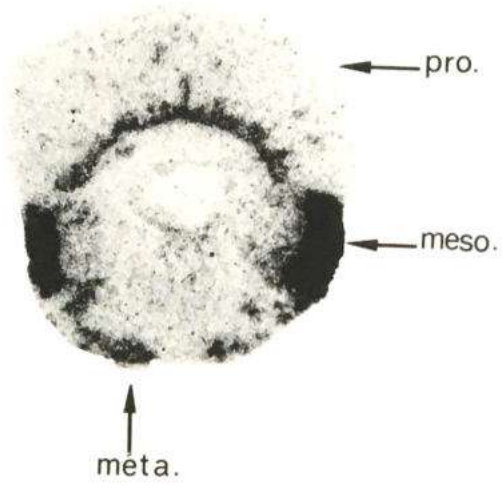


fig.1



fig. 2

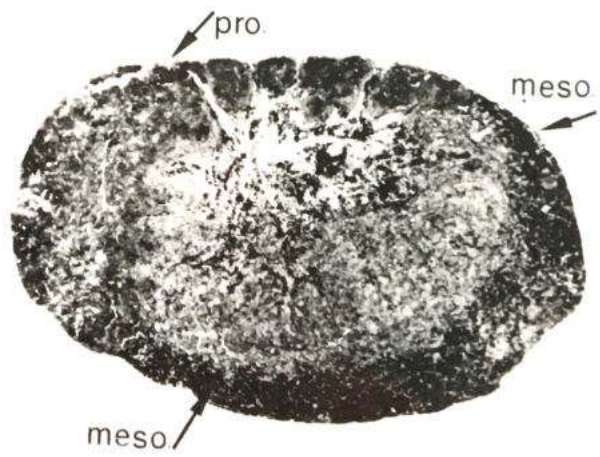


fig. 3

VII - RECHERCHES HISTOCHIMIQUESI. BUTS DES RECHERCHES

Ces recherches ont eu pour but essentiellement la détermination de la nature organique ou inorganique du ^{35}S détecté par la technique autoradiographique, au niveau des cellules BA+ préhypophysaires après injection de radiosulfate et aussi d'apporter quelques précisions quant au mécanisme des colorations au BA ou à l'AF.

Ces recherches ont été réalisées chez la Souris et le Cyprin en utilisant le test histochimique de la méthylation.

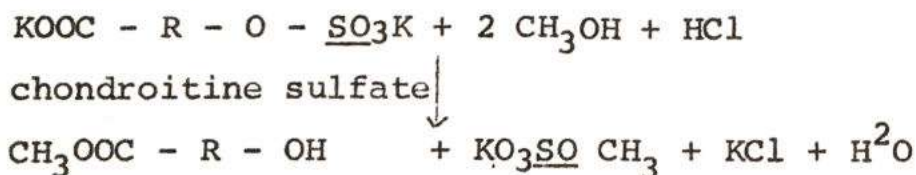
2. PRINCIPE DU TEST HISTOCHIMIQUE DE LA METHYLATION

La présence de groupements sulfates dans les produits de sécrétion de différentes variétés cellulaires a été établie par la visualisation autoradiographique de l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4$ chez différentes espèces, tant in vivo qu'in vitro (DZIEWIATROWSKI, 1951, 1958 - BOSTROM, et ODEBLAD, 1953 - BELANGER, 1954 - CURRAN et KENNEDY, 1955 - DAVIES et YOUNG, 1954 - JENNINGS et FLOREY, 1956 - DRENCKHAHN et MEISSNER, 1956 - BESCOL-LIVERSAC, 1958 - SPICER et coll., 1961 - Mc CARTHY et REID, 1964 - LANE et coll., 1964 - FEWER et coll., 1964 - BEACKELAND, 1966 - HAVEZ et coll., 1967 a et b).

Les études biochimiques ont montré que le $^{35}\text{SO}_4$ décelé est un composant de différentes glycoprotéines (voir chapitre VII D) et des études histochimiques ont établi les rapports entre les propriétés histochimiques de ces substances et la présence de groupements SO_4 (SPICER, 1960, 1962) : métachromasie (LISON, 1935), affinité pour le BA (STEEDMAN, 1950 - LISON, 1954) pour l'AF (GOMORI, 1950 - GABE, 1953 - HALMI et DAVIES, 1953) et le PAS (BESCOL-LIVERSAC, 1958).

Par ailleurs, KANTOR et SCHUBERT (1957) ont montré que le chondroïtine sulfate de potassium perd ses groupements SO_4 quand il est soumis à l'action de l'alcool méthylique dans lequel on fait barboter un courant d' HCl gazeux.

L'élimination des groupements SO_4 se ferait selon le processus suivant :



Le liquide de méthylation agit donc en provoquant à la fois la transestérification du SO_4 sans entraîner de diminution de la

longueur des chaînes d'acide chondroïtine, et la méthylation des groupements carboxyles. VILTER (1967) admet que le blocage des groupements COOH est dû à un processus de lactonisation avec des fonctions glycols et non à une méthylation. Ainsi, à la fin du traitement, l'acide chondroïtine ayant perdu ses propriétés acides perd aussi les propriétés histochimiques en rapport avec ses groupements carboxyles ou sulfuriques.

Cette désulfatation, sous l'action du liquide de méthylation préparé selon FISHER et LILLIE (1954) a été confirmée par SPICER et coll., (1961) : ces auteurs constatent par la technique autoradiographique une élimination de la radioactivité due au $^{35}\text{-SO}_4$ après méthylation de coupes de différents organes de Souris injectées de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$.

Rappelons qu'en ce qui concerne les cellules préhypophysaires des espèces étudiées l'affinité de certaines cellules pour le BA et l'AF nécessite une oxydation préalable, laquelle provoquerait l'apparition de groupements acides carboxyles (HERLANT, 1958). De ce fait, la méthylation des coupes selon le procédé de FISHER et LILLIE ferait disparaître cette affinité en bloquant les groupements carboxyles créés par l'oxydation (HERLANT, 1958).

Ainsi, nos recherches sur le test de la méthylation se trouvent justifiées par ses effets sur les groupements SO_4 qui se trouvent éliminés spécifiquement et par son action neutralisante sur l'affinité de certaines cellules préhypophysaires vis-à-vis du BA ou de l'AF.

3. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

Cette étude porte sur 21 Cyprins et 10 Souris.

15 Cyprins ont reçu une dose unique de $10\ \mu\text{C}$ de radiosulfate par gramme de poids corporel et 6 autres ont reçu $0,5\ \mu\text{C}$ de $^{35}\text{-S}$ -méthionine par gramme de poids corporel. Chez les 10 Souris, les doses de radiosulfate ont été de 5 ou $10\ \mu\text{C}$ par gramme de poids corporel.

Les autopsies ont été pratiquées 24 h après l'injection unique intrapéritonéale. Les hypophyses de Cyprins et de Souris, ainsi qu'un fragment de rectum chez la Souris ont été fixés au formol et débités en coupes sériées.

Les coupes d'hypophyses de chacun des Cyprins sont disposées sur les lames réparties en trois groupes :

1) les lames du groupe I sont simplement séchées après déparaffinage et ne subissent aucun traitement avant d'être recouvertes par l'émulsion photographique.

2) les lames du groupe II sont, après déparaffinage, les unes placées dans de l'eau distillée à 60° pendant 5 mn

ou 5 h, les autres méthylées pendant 12 ou 24 h.

3) les lames du groupe III sont traitées de la même façon que celles du groupe II, mais après avoir été soumises à l'oxydation par l'acide permanganate-sulfurique (2 mn).

Les coupes d'hypophyses et de rectum de chacune des Souris ont été réparties sur 9 lames :

1) 3 lames, après déparaffinage, sont séchées et servent de témoins. Elles correspondent aux lames du groupe I des Cyprins.

2) des 6 lames restantes, 3 sont soumises à la méthylation pendant 12 à 24 h et 3 placées dans de l'eau distillée à 60° pendant 12 à 24 h. Ces lames correspondent à celles du groupe II des Cyprins.

La méthylation a été réalisée en laissant séjourner les lames pendant 12 ou 24 h à 60° dans le mélange méthanol + 0,1 HCl N, selon le procédé de FISHER et LILLIE, (1954)

Puis toutes les lames ont été recouvertes par une émulsion photographique pelliculaire (ARLO Kodak). Après des durées d'exposition de 1 à 2 mois, on procède au développement simultané de toutes les lames d'un même cas afin de pouvoir comparer les intensités du noircissement des émulsions photographiques des différentes lames.

L'appréciation sur un groupe de cellules donné de l'intensité de la radioactivité et de la coloration à l'AF ou au BA, est réalisée en prenant des clichés photographiques des autoradiographies, puis, les coupes photographiées sont débarrassées de l'émulsion photographique et colorées au BA ou à l'AF après oxydation à l'acide permanganate-sulfurique, si les coupes n'avaient pas été oxydées avant la pose de l'émulsion. Les coupes oxydées avant la pose de l'émulsion sont placées tout d'abord dans un des deux colorants, afin d'étudier l'affinité des cellules pour ces colorants après la méthylation, puis soumises à une nouvelle oxydation avant la coloration.

Sur quelques coupes, nous avons étudié l'action de la méthylation, précédée ou non d'une oxydation au permanganate-sulfurique, sur l'intensité de la coloration au PAS.

4. RESULTATS EXPERIMENTAUX

a) Chez le Cyprin (DEMINATTI, 1963 a)

1) Après administration de 35-SO₄Na₂

↳ Etude de l'action du lavage par l'eau distillée

Les lames du groupe I témoin, nous permettent d'apprécier pour chaque cas l'intensité de la radioactivité et de la coloration des cellules PAS+, AF+ et BA+ correspondantes.

.../...

La plupart des lames du groupe II (non oxydées avant le lavage) ne présentent pas de diminution significative de l'intensité de la radioactivité. Nous n'avons pas noté dans ces cas de diminution appréciable de l'intensité de la coloration des cellules pour le BA, l'AF ou le PAS.

Les lames du groupe III (oxydées avant le lavage), ayant séjourné 5 mn dans l'eau distillée à 60°, présentent une faible mais nette diminution de l'intensité de la radioactivité sans modification notable de l'intensité de la coloration à l'AF et au BA des cellules correspondantes. Après lavage à l'eau distillée, pendant 5 h, on note simultanément un important affaiblissement de l'intensité de la radioactivité et de la coloration à l'AF ou au BA.

β - Etude de l'action de la méthylation

On observe au niveau des lames des groupes II (non oxydées avant la méthylation) et III (oxydées avant la méthylation) une disparition complète de la radioactivité, ainsi qu'en témoigne l'examen des lames du groupe I (témoin) : cette perte de radioactivité concerne l'ensemble du parenchyme préhypophysaire.

Les cellules AF+, BA+ des coupes du groupe II (non oxydées avant la méthylation) ne présentent pas de modification de leur colorabilité par le BA, l'AF et le PAS.

Les coupes du groupe III (oxydées avant la méthylation) présentent une perte ou une forte diminution de l'intensité de la coloration des cellules aussi bien pour l'AF, le BA que pour le PAS. Une réoxydation après la méthylation n'entraîne pas une récupération complète de l'affinité de ces cellules pour le BA, l'AF et le PAS.

2) Après administration de 35-S-méthionine

Quel que soit le traitement auquel ont été soumises les lames, nous n'avons pas noté de diminution significative de la radioactivité qui, d'ailleurs, se localise essentiellement au-dessus des zones cellulaires dépourvues de matériel AF+, BA+, PAS+.

Tableau IV : Cyprin

Traitement	Oxydation préalable (+ ou -)	Intensité de la radio-activité	Colorabilité par l'AF, le BA ou le PAS après traitement	
			sans (ré)oxydation	avec (ré)oxydation
Témoins	-	++++	0	++++
Lavage à l'eau	5 mn	++++	0	++++
	+	+++	++++	
5 h	-	++++ (ou +++)	0	++++ (ou +++)
	+	+	+	++
Méthylation	-	0	0	++++
	+	0	0	+ ou 0

b. Chez la Souris après administration de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$
(tableau V) (DEMINATTI, 1965)

1) Etude de l'action du lavage à l'eau

Les coupes de préhypophyses placées dans l'eau distillée à 60° présentent, comme les coupes témoins, des zones intensément radioactives correspondant à des cellules BA+ dont l'affinité pour cette coloration n'est pas modifiée.

Il en est de même pour les cellules à mucus du tube digestif au niveau desquelles les intensités de la radioactivité et de la coloration ne sont pas modifiées.

2) Etude de l'action de la méthylation

On constate au niveau des coupes de préhypophyses soumises à l'action de la méthylation l'absence totale de zones intensément radioactives associée à une disparition quasi totale de la radioactivité aussi bien au niveau des coupes d'hypophyses que des cellules à mucus de l'intestin.

De plus, l'affinité pour le BA des cellules préhypophysaires BA+ et à mucus de l'intestin n'est pas modifiée, si l'on procède à une oxydation avant le passage des coupes dans le colorant.

Enfin, il faut noter que la coloration des cellules à mucus par le BA ou l'AF qui, contrairement aux cellules préhypophysaires, ne nécessite pas d'oxydation préalable, disparaît après la méthylation mais leur colorabilité par le BA et l'AF réapparaît quand on procède à une oxydation avant la coloration.

Tableau V : Souris

Traitement	Intensité de la radioactivité	Colorabilité par l'AF ou le BA (après traitement)	
		sans oxydation	après oxydation
<u>Témoins</u>			
- Préhypophyse	++	0	++
- Cellules à mucus de l'intestin	+++++	+++++	+++++
<u>Lavage à l'eau</u>			
- Préhypophyse	++	0	++
- Cellules à mucus	+++++	+++++	+++++
<u>Méthylation</u>			
- Préhypophyse	0 ou ±	0	++
- Cellules à mucus	0 ou ±	0	+++++

5. CONCLUSIONS

Ainsi, la spécificité du test de la méthylation vis-à-vis des groupements SO_4 qui sont ainsi éliminés, est confirmée par la comparaison des résultats obtenus sur la préhypophyse de Cyprin après injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$ et de $^{35}\text{-S}$ -méthionine. La spécificité du test de la méthylation nous autorise à conclure que le radiosoufre décelé sur les autoradiographies au niveau des cellules BA+ préhypophysaires du Cyprin et de la Souris après injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$ correspond à des groupements $^{35}\text{-SO}_4$.

L'observation d'une diminution de la radioactivité par le lavage à l'eau des coupes oxydées de préhypophyse de Cyprin injecté de radiosulfate ne nous permet pas d'apporter de précisions ni sur le mécanisme d'action de l'oxydation, ni sur la nature des substrats riches en $^{35}\text{-SO}_4$ qui sont rendus solubles par l'oxydation.

Par ailleurs, la récupération de l'affinité pour le BA et l'AF des cellules préhypophysaires non préalablement oxydées et des cellules à mucus de l'intestin, malgré la méthylation, à condition de procéder à une oxydation avant la coloration, montre nettement que la coloration au BA ou à l'AF après oxydation n'est pas en rapport avec la présence de groupements SO_4 qui seraient démasqués ou créés par l'oxydation. Mais cela n'infirmes pas la notion que la perte de l'affinité pour ces colorants soit liée à l'élimination des groupements SO_4 dans le cas des cellules à mucus de l'intestin qui sont BA+ ou AF+ sans oxydation préalable.

VIII - RECHERCHES BIOCHIMIQUES

Certaines de ces recherches ont eu pour but d'identifier la nature chimique du ^{35}S décelé sur les histoautoradiographies des préhypophyses de Cobayes, Souris et Cyprins, après injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$. En d'autres recherches, nous avons tenté d'apporter certaines précisions quant à la nature biochimique du ou des substrats auxquels sont fixés les groupements SO_4 dans les cellules BA+ chez le Cyprin.

I. RECHERCHES BIOCHIMIQUES EN VUE DE L'IDENTIFICATION DE LA NATURE CHIMIQUE DU ^{35}S FIXE DANS LA PREHYPOPHYSE APRES INJECTION DE $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ (COBAYE, SOURIS, CYPRIN)

a) Buts des Recherches

On sait que le sulfate injecté sous forme de radio-sulfate de Na est l'objet de deux types de transformations :

- d'une part, il est activé à l'état de "sulfate actif", c'est-à-dire de phosphoadénosinephosphosulfate (PAPS) (LIPMAN, 1958). Le "sulfate actif" peut entrer dans la constitution de différentes substances par l'intermédiaire de liaisons esters du type $\text{R-O-SO}_3\text{H}$ ou $\text{R-NH-SO}_3\text{H}$. Ces liaisons esters peuvent être coupées par hydrolyse sous l'influence d'enzymes spécifiques (sulfatases) (DODGSON, 1956) ou sous l'influence de l'acide chlorhydrique à chaud;

- d'autre part, l'ion sulfate excrété dans le tube digestif (BLOCK et coll., 1951 - DZIEWIATKOWSKI, 1954 - PEARSON, 1956) - peut être réduit par la flore intestinale et transformé en cystéine et en méthionine, amino-acides qui sont réabsorbés.

Aussi, est-il possible que la radioactivité présente au niveau de la préhypophyse, après injection de radiosulfate, soit due à du radiosoufre à la fois sous forme d'ions sulfate libres, d'esters et sous forme d'acides-amino. La proportion des formes organique et ester augmente avec le délai écoulé entre l'injection et le sacrifice de l'animal.

b) Principe de la méthode

Afin d'identifier la nature chimique du ^{35}S décelé sur les histoautoradiographies, nous avons analysé les préhypophyses préalablement soumises aux étapes que nécessite la technique histoautoradiographique : fixation, déshydration, toluène, lavage à l'eau, sauf l'inclusion à la paraffine. Les préhypophyses sont ensuite traitées par l' HCl 6N pour libérer les

différents constituants cellulaires en ces éléments constitutifs (aminoacides, etc ...) et rompre les liaisons esters du SO_4 .

Les hydrolysats préhypophysaires, après avoir été déposés sur des bandes de papier, sont soumis à l'analyse électrophorétique permettant une séparation sélective des groupements SO_4 et des amino-acides soufrés dans les conditions suivantes : acide formique 2N, 10 volts par cm pendant 1 h 30 environ. On obtient ainsi la migration des groupements SO_4 vers l'anode, alors que les acides aminés soufrés moins acides ont une vitesse de migration plus lente ou quasi nulle (Planche XVI, fig. 1). L'étude de bandes électrophorétiques témoins de 35-SO_4 traitées simultanément montre que la surcharge en 35-SO_4 entraîne une très légère augmentation de leur vitesse de migration et un élargissement de la zone radioactive. La détection de la radioactivité sur les bandes électrophorétiques est obtenue par l'analyse autoradiographique après application d'un film photographique (film Kodirex).

c) Matériel et méthodes

Cette étude porte sur 169 Cyprins, 37 Souris et 15 Cobayes.

Les doses de radiosulfate injectées ont été de 100 à 200 μCi chez le Cyprin et la Souris, de 300 μCi chez le Cobaye. Les préhypophyses ont été prélevées 24 h après l'injection intrapéritonéale : 5 à 10 préhypophyses sont analysées ensemble chez le Cyprin, alors que chez la Souris et le Cobaye, nous avons le plus souvent étudié une préhypophyse à la fois. Les préhypophyses (sans les lobes postérieur et intermédiaire chez le Cobaye et la Souris) ainsi qu'un fragment de foie pour la Souris, sont traités comme pour l'examen histologique, puis soumis à l'hydrolyse acide en tube scellé (HCl , 6 N pendant 24 h à 110°). Les hydrolysats radioactifs sont débarrassés de l' HCl par lyophilisation. Les hydrolysats secs sont repris dans 0,05 ml d'eau. La solution de chacun des hydrolysats est répartie sur deux bandes de papier à électrophorèse (Arches n° 302). Puis les deux bandes sont soumises à l'analyse électrophorétique dans les conditions suivantes : acide formique 2 N, 10 volts par cm pendant 1 h à 1 h 30.

Pour nous assurer de l'élimination complète, au cours de la fixation histologique, des ions radiosulfate libres présents dans les organes analysés, nous avons procédé de la façon suivante : après les différents traitements histologiques, le broyat est réparti sur deux bandes de papier. Sur une des deux bandes, nous avons ajouté du $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$; puis les deux bandes sont analysées par électrophorèse dans les mêmes conditions que ci-dessus. Enfin, des broyats de préhypophyses non fixés et non hydrolysés ont été soumis à l'analyse électrophorétique, ceci afin de nous assurer

qu'il existe bien du $^{35}\text{S}\text{-SO}_4$ libre et non libre avant la fixation histologique.

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 15 jours à 5 mois).

d) Résultats

1) Chez la Souris (DEMINATTI, 1965)

Les autoradiographies des bandes de papier à électrophorèse des broyats de préhypophyses et de fragments de foie fixés, mais non hydrolysés par HCl, montrent une zone radioactive localisée au trait de départ sur le papier (Planche XVII, fig. 1), ce qui indique bien que le ^{35}S est sous une forme non libre. On exclut l'impossibilité éventuelle de migration des groupements sulfates contenus dans le broyat par le fait que du $^{35}\text{S}\text{-SO}_4\text{Na}_2$ ajouté aux broyats avant l'électrophorèse migre dans ces mêmes conditions approximativement comme le radiosulfate témoin. La vitesse de migration plus lente du radiosulfate témoin ajouté sur les bandes avec broyats est sans doute due à la présence du broyat qui freine, au début, cette migration.

Après hydrolyse, dans 33 cas, l'unique zone radioactive décelable par autoradiographie sur les bandes d'électrophorèse de préhypophyses correspond à une substance qui migre de la même façon que le radiosulfate ajouté à l'hydrolysate avant l'électrophorèse (Planche XVII, fig. 2). De plus, cette unique zone radioactive est de nature non protidique ainsi qu'en témoigne la négativité de la réaction à la ninhydrine à ce niveau.

Par contre, dans un cas, nous avons observé une zone radioactive supplémentaire de très faible intensité, de vitesse plus lente que celle du $^{35}\text{S}\text{-SO}_4$ et ninhydrine-positives.

Sur les autoradiographies des bandes d'électrophorèse de foies fixés, puis hydrolysés, on observe en plus de la zone radioactive correspondant aux ions $^{35}\text{S}\text{-SO}_4$ plusieurs bandes radioactives de vitesses plus lentes et ninhydrine-positives (Planche XVII, fig. 3).

Ainsi ces résultats indiquent que le ^{35}S décelé sur les histoautoradiographies de préhypophyses de Souris, après injection de $^{35}\text{S}\text{-SO}_4\text{Na}_2$, correspond à du radiosulfate non libre, mais aussi, pour une très faible part, compte tenu de l'étude du foie et du cas unique cité ci-dessus, à du soufre organique de nature protidique.

Ces résultats, ceux obtenus avec le test de la méthylation (voir p.63) et nos observations in vitro (voir p.43), nous autorisent à affirmer que les ions sulfates participent intensément au métabolisme de certaines cellules BA+ de la préhypophyse de la Souris.

Il apparaît donc évident, du fait de la stabilité des molécules de radiosulfate injectées, que, chez la Souris, une analyse de certains aspects du métabolisme des cellules préhypophysaires PAS+, BA+, AF+, est possible en utilisant le radiosulfate.

2) Chez le Cobaye

L'étude des autoradiographies des bandes de papier électrophorétiques montre, dans tous les hydrolysats préhypophysaires examinés, la présence de plusieurs fractions radioactives : la plus mobile, ninhydrine-négative, correspond aux groupements 35-SO_4 ; les trois autres sont ninhydrine-positives (Planche XVI, fig. 2).

De plus, d'un animal à l'autre, on note des différences d'intensité radioactive entre les fractions. Ainsi, il apparaît nettement que, chez le Cobaye, contrairement aux faits observés chez la Souris, après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$, une partie importante du 35-S décelé sur les histoautoradiographies de la préhypophyse correspond à du 35-S organique. Nos résultats histoautoradiographiques, après injection de 35-S -méthionine, nous autorisent cependant à admettre l'incorporation de 35-S sous forme de 35-SO_4 dans les cellules BA+ après injection de radiosulfate.

Il n'en reste pas moins vrai que ces observations biochimiques limitent l'emploi du 35-SO_4 comme moyen d'analyse qualitative ou quantitative du métabolisme des cellules BA+ préhypophysaires in vivo chez le Cobaye.

3) Chez le Cyprin (DEMINATTI, 1962 d)

Sur les autoradiographies des bandes électrophorétiques de préhypophysés fixées, broyées mais non hydrolysées, on constate que la radioactivité reste localisée au point de départ, ce qui indique qu'après la fixation et les autres étapes du traitement histologique, il n'y a plus d'ions SO_4^{2-} libres dans l'hypophyse. Comme précédemment, on exclut leur éventuelle impossibilité de migration par le fait que du $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$ ajouté au broyat avant l'électrophorèse a, dans les mêmes conditions, la mobilité du radiosulfate témoin (Planche XVIII, fig. 1 et 2).

Sur les autoradiographies des bandes électrophorétiques de préhypophysés non fixées et non hydrolysées, la fraction radioactive la plus rapide correspond à du 35-SO_4^{2-} libre ; les autres fractions correspondent à différents substrats ayant incorporé du radiosoufre (Planche XVIII, fig. 4).

Après hydrolyse, au contraire, l'unique zone radioactive décelable par autoradiographie sur les bandes d'électrophorèse correspond à une substance qui migre de la même façon que le radiosulfate ajouté à l'hydrolysat avant l'électrophorèse (Planche XVIII, fig. 2 et 3).

De plus, la nature non protidique de cette unique zone radioactive est démontrée par le fait qu'elle est dépourvue de substance ninhydrine-positive. Ainsi, le radiosoufre présent dans l'hydrolysate de préhypophyses fixées est sous forme de radio-sulfate.

Ces résultats sont donc en accord avec ceux obtenus avec le test de la méthylation (voir p.61) quant à la présence de groupements SO_4^- non libres dans les cellules BA+ de la préhypophyse de Cyprin.

e) Conclusions

De l'ensemble de ces recherches biochimiques et des études histochimiques, nous pouvons affirmer, en ce qui concerne le Cyprin et la Souris, que le 35-S décelé par la technique histoautoradiographique dans les cellules BA+ après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$ se trouve sous la forme d'ions 35-SO_4 non libres. Par contre, chez le Cobaye, le 35-S décelé sur les histoautoradiographies de la préhypophyse, après injection de radiosulfate, correspond pour une grande part, d'ailleurs très variable, à du 35-S organique. Mais dans les cellules BA+, il s'agit néanmoins de 35-SO_4 , ainsi qu'en témoignent nos observations histoautoradiographiques après injection de 35-S-méthionine.

Ainsi, après injection d'une dose précise de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$ chez le Cyprin et la Souris, contrairement au Cobaye, il est possible, en cas de variation quantitative de l'incorporation de 35-S dans les cellules BA+, d'interpréter sur les histoautoradiographies cette variation de l'intensité de la radioactivité en termes d'ions 35-SO_4 non libres.

2. RECHERCHES BIOCHIMIQUES EN VUE DE L'IDENTIFICATION DE LA NATURE CHIMIQUE DU OU DES SUBSTRATS QUI FIXENT DES GROUPEMENTS 35-SO_4 DANS L'ADENOHYPOPHYSE DE CYPRIN.

a) Buts des recherches

Les recherches précédentes nous ont permis de démontrer l'incorporation de 35-S dans les cellules préhypophysaires PAS+, BA+, AF+ des espèces étudiées après injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$. L'étude biochimique que nous rapportons ici a eu pour but de rechercher la nature du ou des substrats auxquels sont fixés ces groupements 35-SO_4 dans ces cellules préhypophysaires.

Nous avons retenu pour cette étude le Cyprin chez qui les cellules BA+ représentent approximativement la moitié du parenchyme préhypophysaire. Nous avons en plus la certitude, chez ce Poisson, d'obtenir 24 h après l'injection de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$, une

Fig. 1 - Autoradiographie d'une bande électrophorétique d'un mélange de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$ et de $^{35}\text{-S}$ -méthionine (sans entraîneur). Conditions de l'électrophorèse : acide formique 2N, 10 volts par cm pendant 1 h 30.

Fig. 2 - Autoradiographie (N° 2) d'une bande électrophorétique d'une pré-hypophyse de Cobaye après fixation et hydrolyse 24 heures après l'injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$. Durée de l'électrophorèse : 1 heure. Durée d'exposition : 1 mois.
Noter la présence de plusieurs zones radioactives en plus de celle correspondante aux groupements $^{35}\text{-SO}_4^-$.

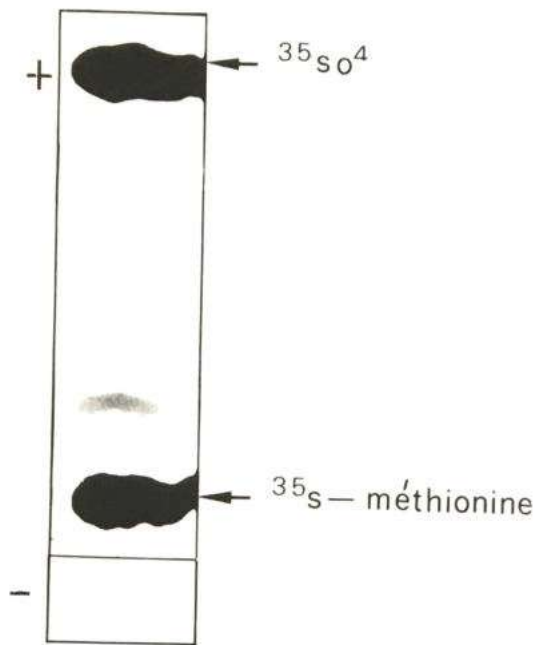


fig 1

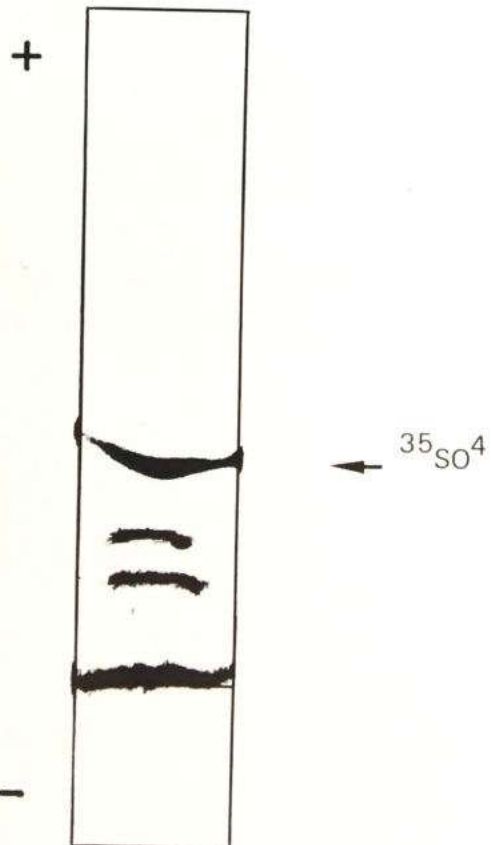


fig 2

Planche XVII

Fig. 1 - Autoradiographie (n° 95) de bandes électrophorétiques d'une préhypophyse (d et e) et d'un fragment de foie (a et b) fixés et non hydrolysés, provenant d'une même Souris, 24 heures après l'injection de radiosulfate. Durée d'exposition : 2 mois.

Bande a : moitié du broyat hépatique

" b : autre moitié du broyat hépatique + $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ témoin

" c : $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ témoin

" d : moitié du broyat préhypophysaire + $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$

" e : autre moitié du broyat préhypophysaire.

Fig. 2 - Autoradiographie (n° 105) de bandes électrophorétiques de l'hydrolysate d'une préhypophyse de Souris 24 heures après l'injection de $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$.

Bande a : $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$ témoin

" b : moitié de l'hydrolysate préhypophysaire + $^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$

" c : l'autre moitié de l'hydrolysate préhypophysaire.

Fig. 3 - Autoradiographie (n° 108) (à gauche) et bande électrophorétique (à droite) correspondante, colorée à la ninhydrine, de l'hydrolysate d'un fragment de foie provenant du même animal que la fig. 2. Noter la présence de zones radioactives ninhydrine-positives.

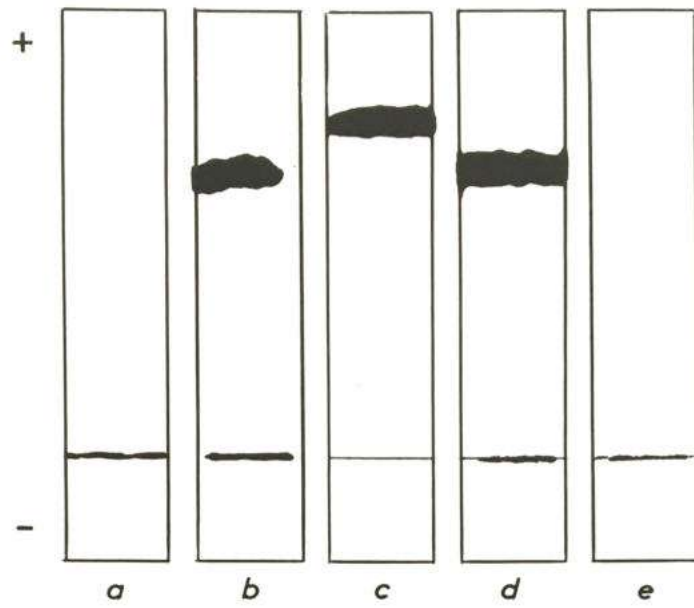


fig. 1

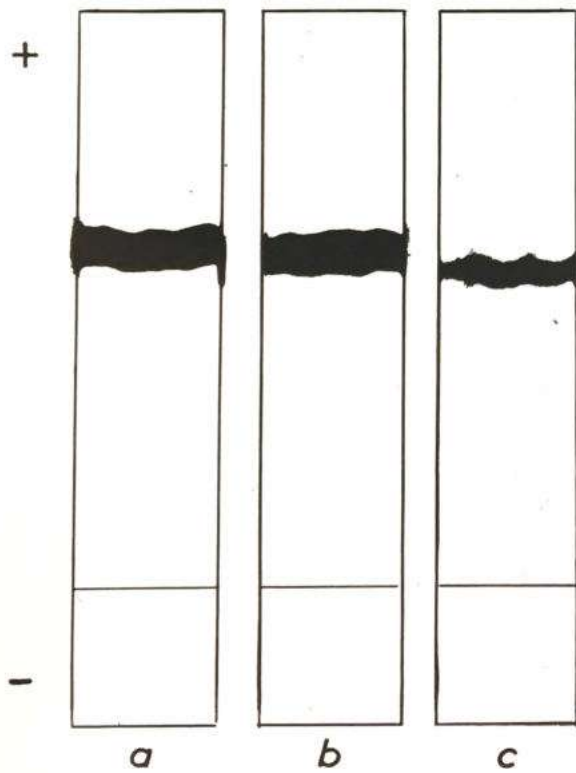


fig. 2

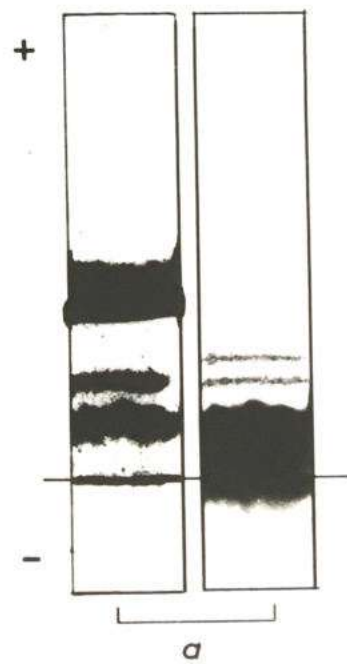


fig. 3

Fig. 1 - Autoradiographies (n° 22) de bandes électrophorétiques de 2 préhypophyses de Cyprin fixées et non hydrolysées. Autopsie 24 h après l'injection de radiosulfate. Durée de l'électrophorèse : 1 heure 30.

Bande a : moitié du broyat préhypophysaire

" b : l'autre moitié du broyat préhypophysaire + $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$.

Noter l'absence d'ions $^{35}\text{-SO}_4^-$ non libres dans le broyat (bande a) et la possibilité de migration des ions $^{35}\text{-SO}_4$ libres ajoutés avant l'électrophorèse. Durée d'exposition : 4 mois.

Fig. 2 - Autoradiographies (n° 37) de bandes électrophorétiques de 10 préhypophyses de Cyprin fixées puis broyées. Autopsie 24 h après injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$. Durée de l'électrophorèse : 1 heure.

Bande a : moitié du broyat non hydrolysé

" b : moitié du broyat hydrolysé.

Toute la radioactivité immobile en "a" est donc constituée de radicaux $^{35}\text{-SO}_4$. Durée d'exposition : 7 jours.

Fig. 3 - Autoradiographies (n° 54) et bandes électrophorétiques correspondant à 10 préhypophyses de Cyprin prélevées, fixées et hydrolysées ensemble. Autopsie 24 h après l'injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$. Durée de l'électrophorèse : 1 h 30.

A gauche : moitié de l'hydrolysate + $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$

Bande a : autoradiographie

" b : bande électrophorétique correspondante colorée à la ninhydrine.

A droite : l'autre moitié de l'hydrolysate

Bande a : autoradiographie

" b : bande électrophorétique correspondante colorée à la ninhydrine.

Durée d'exposition : 1 mois 1/2.

Noter la présence d'une seule zone radioactive ninhydrine-négative.

Fig. 4 - Autoradiographies (n° 67) de bandes électrophorétiques (dans l'acide formique 2 N) de 2 préhypophyses de Cyprin non fixées et non hydrolysées. Durée de l'électrophorèse : 1 h 30.

Bande a : $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$ sans entraîneur

" b : moitié du broyat préhypophysaire + $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$

" c : l'autre moitié du broyat préhypophysaire.

Noter la présence de plusieurs zones radioactives : la plus rapide correspond aux ions $^{35}\text{-SO}_4$ libres.

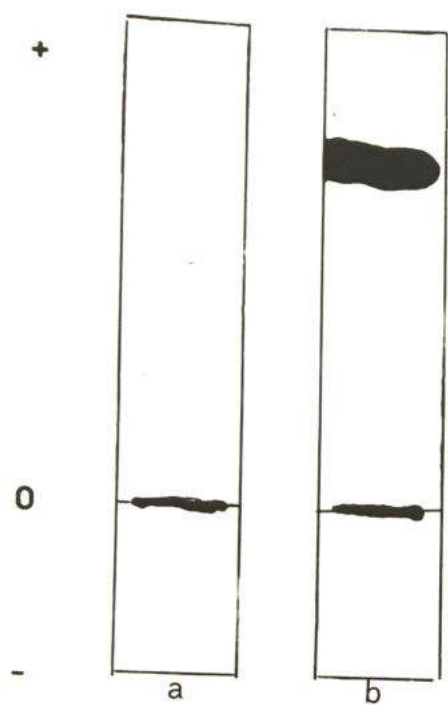


fig 1

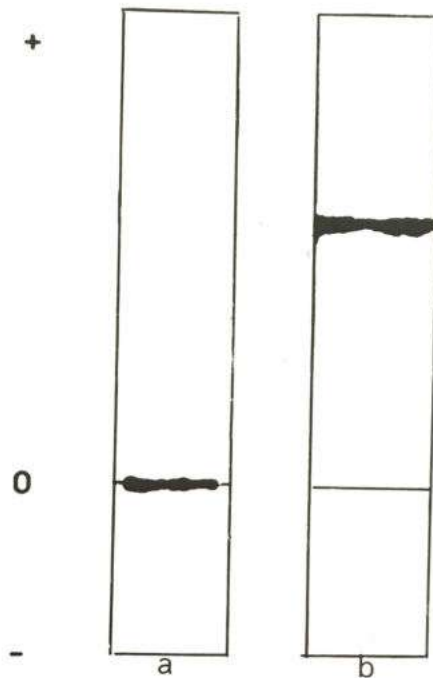


fig 2



fig 3

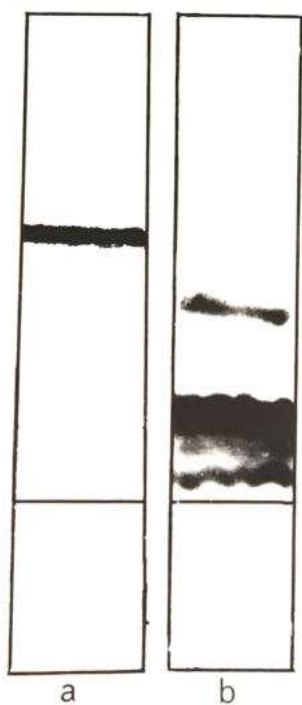
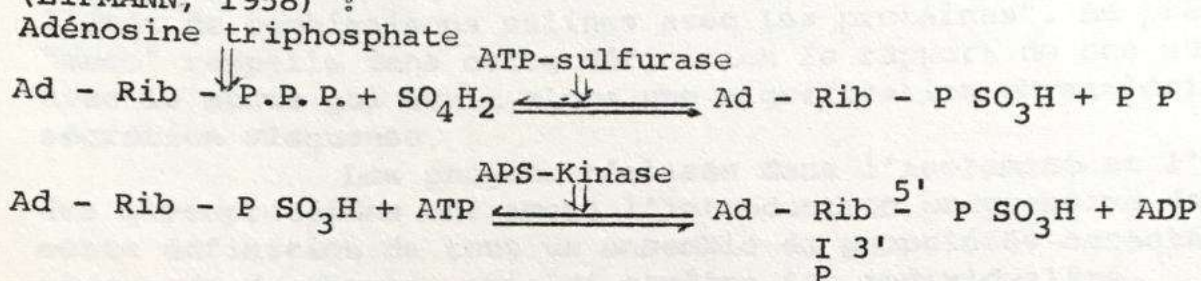


fig 4

incorporation du ^{35}S préhyppophysaire sous forme de $^{35}\text{SO}_4$ lié.

Dans les organismes animaux, les ions SO_4 proviennent soit directement de radicaux sulfates reçus par l'alimentation, soit indirectement des voies de catabolisme des acides aminés soufrés (in POLONOWSKI, 1965). Ils vont être retrouvés sous forme de sulfates inorganiques et d'esters sulfuriques ("ethero-sulfate" ou sulfo-conjugués). Le passage du sulfate inorganique aux diverses formes combinées se fait obligatoirement par l'intermédiaire d'un nucléotide de transfert : le 3'-phospho-adénosine-5'-phosphosulfate (ou PAPS) formé par un couplage énergétique avec l'adénosine triphosphate (ou ATP). Cette "activation" du sulfate se réalise en deux étapes, selon le schéma suivant (LIPMANN, 1958) :



C'est à partir de cette forme active du sulfate que se fait le transfert sur les phénols, les 3β hydroxystéroïdes, les osamines et les oses de certains oligosaccharides, polysaccharides, polysaccharides-peptides ou encore sur les cérébrogalactosides.

Le choix du substrat que nous nous proposons de caractériser reste donc assez large. A priori, il peut s'agir aussi bien d'un processus de détoxication s'adressant à de petites molécules (phénol, stéroïdes), qu'à un processus de synthèse de polysaccharides sulfatés ou de glycolipides tels qu'un sulfatide. Les résultats histochimiques orientent pourtant notre choix vers le groupe des glycoprotéides, étant donné l'affinité tinctoriale pour le réactif de Schiff de ces éléments cellulaires après oxydation périodique. Il ne s'agit là bien entendu que d'une orientation de nos méthodes d'étude qui n'exclut pas l'incorporation concomitante de $^{35}\text{SO}_4$ sur d'autres substrats tels que les sulfatides qui peuvent également présenter, selon LISON (1960) une réaction métachromatique associée à une coloration positive au PAS.

L'établissement d'un protocole d'étude des substances préhyppophysaires caractérisées dans nos techniques histoautoradiographiques doit donc se fonder sur les propriétés fondamentales des polysaccharides sulfatés permettant leur identification et leur séparation des autres substances susceptibles d'être intéressées par ce transfert actif de groupements $\text{S-}^{35}\text{SO}_4$.

b) Principe des méthodes

1) Définition des glycoprotéides sulfatés

On utilise généralement le terme de "mucopolysaccharides sulfatés" pour désigner une classe de glycoprotéides dont le caractère acide se rapporte essentiellement à l'existence dans leur structure de groupements sulfates estérifiant l'une des fonctions alcooliques d'une osamine ou d'un ose (revues d'ensemble : BRIMACOMBE et WEBBER, 1964 ; GOTTSCHALK, 1966). Le terme de "mucopolysaccharide" fut introduit par MEYER et coll. en 1958 pour désigner "les polysaccharides d'origine animale renfermant des osamines et rencontrés soit à l'état pur, soit à l'état de combinaisons salines avec les protéines". Le préfixe "muco" rappelle dans cette définition le rapport de ces substances avec le mucus qui avait alors une signification physiologique de sécrétion visqueuse.

Les progrès réalisés dans l'isolement et l'étude des glycoprotéides ont amené l'introduction progressive dans cette définition de tout un ensemble de propriétés caractéristiques de ce groupe, qui lui confère son individualité.

On souligne tout d'abord leur faible teneur en protéines pour les différencier des glycoprotéines (STACEY, 1946) puis bientôt leur caractère acide rattaché à la présence d'acides uroniques et de groupements sulfates (BETTELHEIM - JEVONS, 1958). Enfin, JEANLOZ en 1962 réserve le nom de mucopolysaccharides acides aux hétéroglycanes qui contiennent des résidus d'osamine (N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine) et d'acide uronique (acide D-glucuronique ou acide L-Iduronique) réunis dans une unité structurale disaccharidique de base, caractéristique de chacun d'eux (tableau VI). Si l'on s'attache au sens strict de cette définition, le terme de mucopolysaccharide s'applique donc à l'acide hyaluronique, aux chondroïtines (chondroïtine-4-sulfate (A) et chondroïtine-6-sulfate (C)), au dermatane sulfate (chondroïtine-sulfate B), à l'héparitine-sulfate et à l'héparine. On l'étend cependant habituellement à d'autres aminopolysaccharides acides qui ne renferment pas d'acide uronique mais qui accompagnent les autres mucopolysaccharides acides dans la structure du tissu conjonctif. C'est le cas notamment du kératane-sulfate (isolé de la cornée de l'oeil de boeuf) dont les chaînes polysaccharidiques sont constituées d'osamines, de galactose, parfois de fucose et d'acide N-acétylneuraminique (acide sialique) mais dont le caractère acide se rattache essentiellement à la présence de groupements sulfates. Les travaux de BHAVANANDAN et MEYER (1967) ont permis de démontrer que dans ces chaînes d'hétéropolysaccharides 40 % des fonctions alcooliques primaires du galactose sont intéressées dans la liaison ester-sulfate, ce pourcentage s'élevant à 74 % pour la fonction

alcoolique primaire de la N-acétylglucosamine.

Il faut enfin signaler l'existence d'une dernière classe de glycoprotéides sulfatés récemment caractérisés dans les sécrétions intestinales de Porc (INOUE et YOSIZAWA, 1966) et dans les sécrétions bronchiques humaines (HAVEZ et coll. 1967a et b) rattachées par de nombreux éléments de leur structure aux glycoprotéines ayant une activité de substance de groupe sanguin, mais qui possèdent une teneur variable en fucose et en groupement sulfate.

Une définition des polysaccharides ne peut donc se rattacher strictement au groupe des mucopolysaccharides acides. Elle doit tenir compte tout d'abord de la nature des glucides entrant dans la structure de la chaîne polysaccharidique. Si nous nous référons à la terminologie de JEANLOZ, nous distinguerons très nettement en fonction de ces données actuelles :

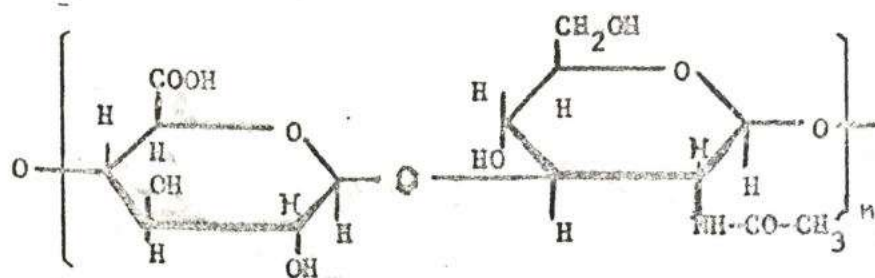
- Les glycosamino-glycanes-sulfates constitués de galactose, d'hexosamine et de pourcentage variable de fucose et de groupements sulfates. Cette classe de dérivés s'apparente plus par leur structure aux glycoprotéines dont elle possède notamment un des éléments caractéristiques représenté par la lactosamine (D-galactosido. β (1-4) - N-acétylglucosamine). Nous pouvons ranger dans ce groupe les substances de groupe sanguin sulfatées des mucines bronchique et intestinale et le keratane-sulfate de la cornée. Nous les désignerons sous le terme de glycopeptides sulfatés.
- Les glycosamino-glycuronoglycanes-sulfates caractérisés par la présence constante d'acide uronique et qui se divisent en deux groupes selon la nature de l'osamine :
 - glucosamine pour l'héparitine-sulfate et l'héparine
 - galactosamine pour les chondroitines-4 et 6-sulfate et pour le dermatane-sulfate.

La présence simultanée de groupes carboxyliques (de l'acide uronique) et de groupements sulfates confère à ces molécules un caractère acide beaucoup plus marqué que pour le groupe des glycosamino-glycanes-sulfates. Nous les désignerons sous le terme de polysaccharides-peptides-sulfates.

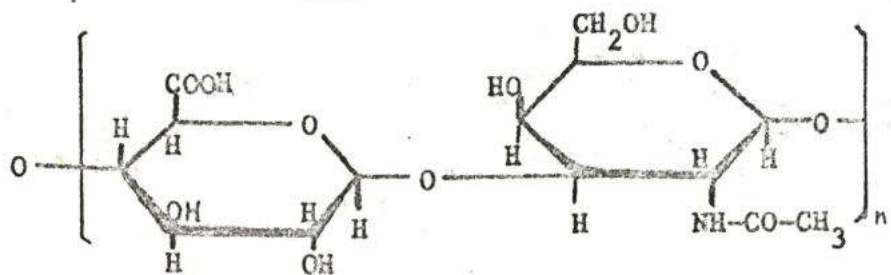
Tableau VI

Glycosaminoglycuronoglycanes	N-Acétyl-D-Glucosamine ou D-Galactosamine	Acide uronique	Point d'attache
Acide hyaluronique	N. Ac-D-glucosamine	Ac.-D-glucuronique	
Dermatane-sulfate (chondroïtine-sulfate B)	N. Ac-D-galactosamine	Ac.-L-Iduronique	C ₄ D.gal ^{ne}
Chondroïtine-4-sulfate (A)	N. Ac-D-galactosamine	Ac.-D-glucuronique	C ₄ D.gal ^{ne}
Chondroïtine-6-sulfate (B)	id.	id.	C ₆ D.gal ^{ne}
Héparitine -sulfate	N. Ac-D-glucosamine 50 % N-sulfatée	Ac.-D-glucuronique	N-sulfate
Héparine	D-glucosamine N-sulfatée et O ₆ -sulfatée	Ac.-D-glucuronique 3-sulfate un peu Ac.L. Idu- ronique	N-sulfate C ₆ (glucosamine) C ₃ (glucuronique)

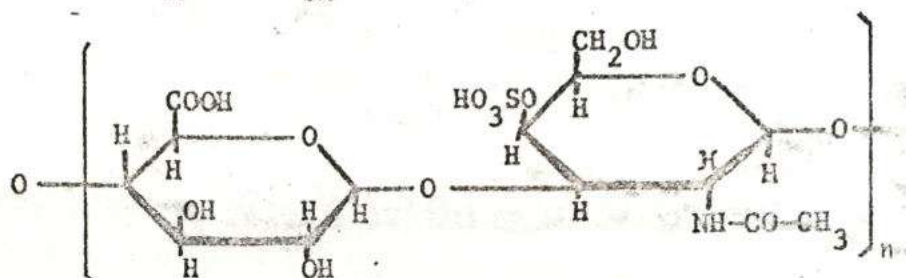
acide HYALURONIQUE



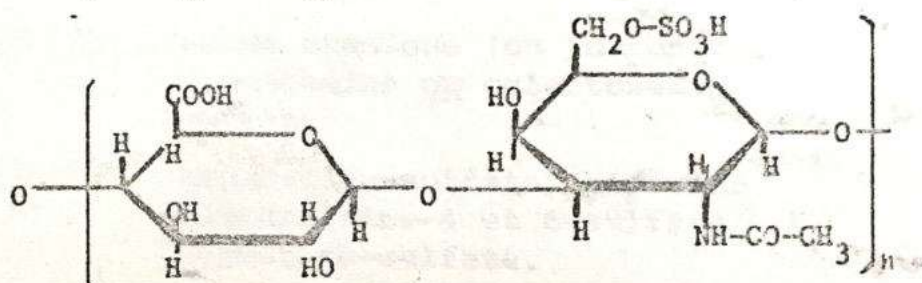
CHONDROÏTINE



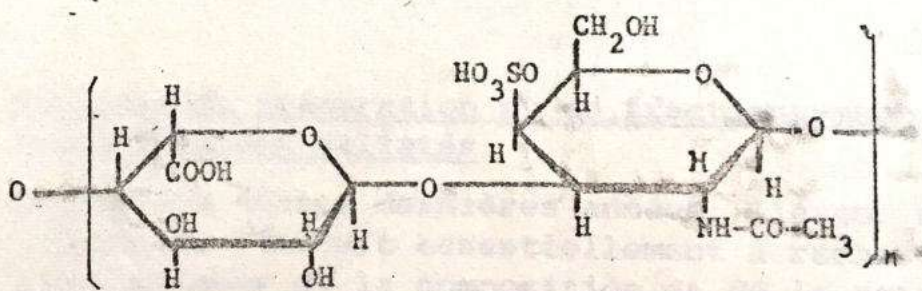
CHONDROÏTINE
4-SULFATE



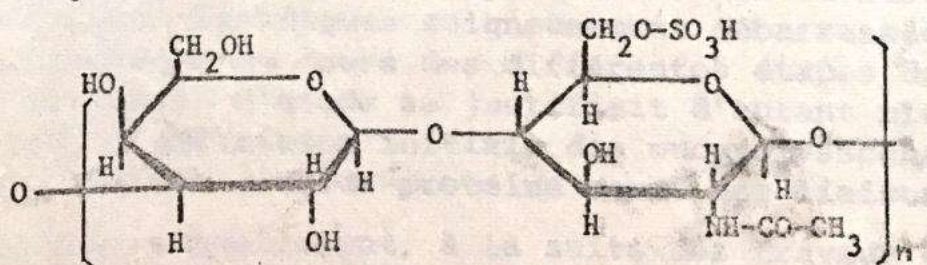
CHONDROÏTINE
6-SULFATE



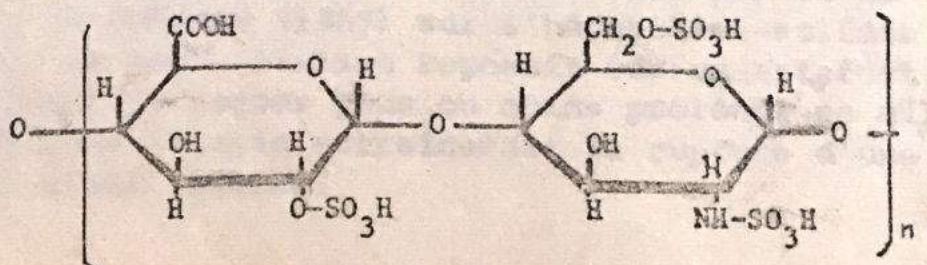
DERMATANE
SULFATE



KERATANE
SULFATE



HEPARINE



Classification des glycoprotéines sulfatées

. Glycosamino-glycanes-sulfates ou glycopeptides-sulfates

Composition : -galactose
 -hexosamines (N-acétyl-glucosamine et
 galactosamine)
 -fucose
 -lactosamine
 -sulfate

Exemples : -substances de groupe sanguin sulfatées
 des mucines bronchiques et intestinales
 -kératane-sulfate

. Glycosamino-glycurono-glycanes-sulfates ou polysaccharides-peptides-sulfates (tableau VI)

Composition : -acide urnrique (ou iduronique)
 -glucosamine ou galactosamine
 -sulfate

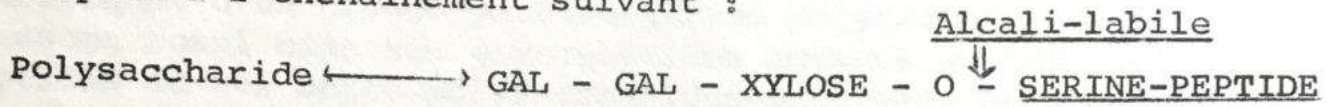
Exemples : -héparitine-sulfate, héparine
 -chondroïtine-4 et 6-sulfate
 -dermatane-sulfate.

2) Méthodes de préparation et de fractionnement des glycoprotéides sulfatés

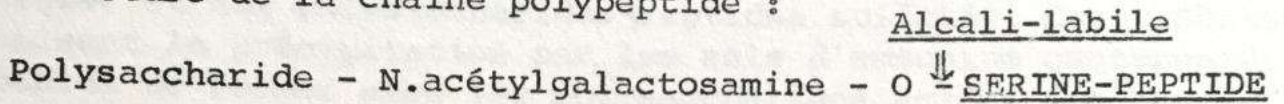
Jusqu'à ces toutes dernières années, l'étude des glycoprotéides sulfatés se limitait essentiellement à rechercher les éléments caractéristiques de la composition et de la structure des chaînes polysaccharidiques soigneusement débarrassées de toute trace de protéine au cours des différentes étapes de l'extraction. Ce protocole d'étude se justifiait d'autant mieux qu'il se référait à la définition initiale des mucopolysaccharides considérant la liaison glucide-protéine comme une liaison saline.

On sait actuellement, à la suite des travaux de RODÉN et ARMAND (1966) sur les chondroitines-sulfates et de KNECHT, CIFONELLI et DORFMAN (1967) sur l'héparitine-sulfate que la définition même de cette liaison reposait sur un artefact de préparation utilisant un séjour plus ou moins prolongé en milieu alcalin. Ce traitement alcalin entraînerait la rupture d'une liaison covalente alcali-labile.

Pour les glycosamino-glycurono-glycanes sulfatés, cette liaison alcali-labile étudiée par LINDAHL et RODÉN (1966) correspond à l'enchaînement suivant :



Pour les glycosamino-glycanes sulfatés, une liaison alcali-labile a également été caractérisée dans le kératane-sulfate (SENO et coll., 1965 - BRAY et coll., 1967). Il s'agit cette fois d'une liaison "O - glucosidique" intéressant la galactosamine et un hydroxyaminoacide (Sérine ou Thréonine) entrant dans la structure de la chaîne polypeptide :



α - Libération des polysaccharides-peptides

Les méthodes récentes de préparation des polysaccharides tissulaires s'attachent à protéger au maximum cette liaison glucide-protéine en évitant tout passage en milieu alcalin.

On peut, dans certains tissus, extraire directement après broyage et homogénéisation les polysaccharides-protéines. C'est le cas par exemple des chondromucoprotéines isolées par HEINEGARD et GARDELL (1967) du "nucleus pulposus" humain et par HOFFMAN et coll. (1967) du cartilage du septum nasal bovin. Généralement, on ne peut libérer aussi facilement ces glycoprotéides de l'architecture tissulaire. On doit alors avoir recours à une hydrolyse enzymatique de l'homogénat tissulaire visant à réaliser des coupures suffisantes du squelette polypeptique pour permettre l'extraction des polysaccharides-peptides. C'est ainsi que KNECHT, CIFFONELLI et DORFMAN (1967) isolèrent récemment de l'aorte humaine l'héparitine-sulfate-peptide (de poids moléculaire 24.000) et du foie humain le dermatane-sulfate-peptide.

Cette protéolyse s'adresse bien entendu à l'ensemble des protéines et glycoprotéides tissulaires. Un fractionnement de l'hydrolysat s'avère indispensable pour isoler du mélange les sulfo-polysaccharides-peptides.

β - Isolement des polysaccharides-peptides

Différentes méthodes de fractionnement ont été proposées pour l'isolement des polysaccharides acides libérés par hydrolyse alcaline ou des polysaccharides-peptides obtenus par protéolyse enzymatique.

Précipitation éthanolique

Certaines de ces techniques sont relativement peu spécifiques d'un groupe particulier de polysaccharides et s'adressent aussi bien aux glycopeptides neutres qu'aux sialoglycopeptides ou aux sulfo-polysaccharides-peptides. La précipitation éthanolique utilisée par MEYER et coll. (1958) se range dans ce type de méthode de précipitation.

Complexes avec les sels d'ammonium quaternaire

D'autres méthodes au contraire s'adressent exclusivement aux glycopeptides acides (riches en acide -Acétylneuraminique) et aux polysaccharides-peptides sulfatés. Ces techniques utilisent la précipitation par les sels d'ammonium quaternaire capables de former avec les polysaccharides acides des complexes insolubles en milieu de faible force ionique (SCOTT, 1955). Ces complexes se dissocient plus ou moins facilement lorsqu'on augmente la concentration du milieu en chlorure de sodium. On peut ainsi isoler et fractionner différents types de polysaccharides acides libérés dans un hydrolysât. Les travaux de DI FERRANTE et RICH (1956) et de SCOTT (1960) ont précisé très exactement les conditions de précipitation des différents types de polysaccharides-peptides en présence de chlorure de cétypyridinium (CPC) ou de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB).

Complexes avec le Rivanol

Une précipitation sélective des glycopeptides et des polysaccharides-peptides sulfatés peut être obtenue par formation de complexes avec le Rivanol à pH 1,5. Ces complexes sont dissociés dans une solution de chlorure de sodium à 5 %, les polysaccharides libérés peuvent alors être précipités par l'éthanol qui réalise simultanément l'extraction du Rivanol. Cette méthode préconisée en 1961 par WHITEHOUSE et BOSTROM (1961) précipite quantitativement les polysaccharides sulfatés (chondroitines-sulfates, kératane-sulfate, héparitine-sulfate, héparine) mais aussi les glycosamino-glycanes sulfatés apparentés aux substances de groupe sanguin (HAVEZ et coll., 1967 a et b). Elle s'adapte aisément à la préparation de très faible quantité de polysaccharides sulfatés, inférieure à 1 mg. Cette précipitation n'intéresse pas le sulfate inorganique. Son intérêt essentiel réside dans la séparation des glycopeptides acides (sialoglycopeptides) qui ne sont pas précipités dans ces conditions.

δ- Caractérisation et fractionnement des polysaccharides-peptides

On peut caractériser les polysaccharides-peptides

.../...

par diverses méthodes fondées sur leur poids moléculaire ou sur leur caractère acide.

La chromatographie de filtration sur colonne de Séphadex ou sur gel de polyacrylamide permet de fractionner les glycopeptides et les polysaccharides-peptides libérés en fonction de leur taille moléculaire. Appliquée à l'hydrolysats total, une chromatographie sur colonne de polyacrylamide (Biogel P 20) permet de séparer des substances de poids moléculaire supérieur à 20.000 (exclues du gel de polyacrylamide), de substances de plus faible taille moléculaire (plus ou moins retardées dans le gel) ainsi que des peptides et des sels minéraux élués très tardivement de la colonne. Les méthodes de dosage chimique (dosage des oses à l'orcinol, des acides uroniques au carbazol) ou d'autres méthodes de caractérisation (mesure de la radioactivité, étude électrophorétique, etc ...) permettent d'identifier les différents composants séparés.

L'électrophorèse sur gel d'agarose réalisée en microméthode en tampon véronal HCl de pH 8,2, force ionique 0,1 permet de séparer les différents types de polysaccharides-peptides en fonction de leur point isoélectrique. Pour vérifier le pouvoir discriminatif de cette méthode, nous l'avons appliquée à diverses préparations de polysaccharides-peptides et de glycopeptides sulfatés isolées de tissus humains (Planche XIX). La coloration au bleu de Toluidine permet de révéler ces polysaccharides acides. Nous utilisons également l'électrophorèse sur papier en tampon pyridine-acide acétique de pH 3,9. Les diagrammes sont colorés par le bleu de Toluidine. Cette technique, comme la précédente, donne un fractionnement fondé sur le point isoélectrique de ces composants et permet donc d'apprécier le degré d'acidité des différents types de polysaccharides. Elle offre sur la microméthode d'électrophorèse en agarose l'avantage de permettre un dépôt plus important de solution à étudier et d'éviter ainsi une concentration parfois gênante du produit à examiner en électrophorèse.

La chromatographie sur colonne de DEAE - Séphadex A-25 donne également un fractionnement fondé essentiellement sur le point isoélectrique des polysaccharides-peptides. Les substances faiblement acides sont éluées dans une solution d'HCl 0,01N contenant une faible concentration en NaCl (NaCl 0,1 M). Les polysaccharides du type de l'héparitine-sulfate et de l'héparine nécessitant une concentration très élevée en NaCl (NaCl 1,5 M ou même NaCl 2,0 M). Par un choix judicieux du gradient de concentration en NaCl, on peut obtenir par cette méthode une distinction beaucoup plus précise de molécules polysaccharidiques mal individualisées en électrophorèse de zones.

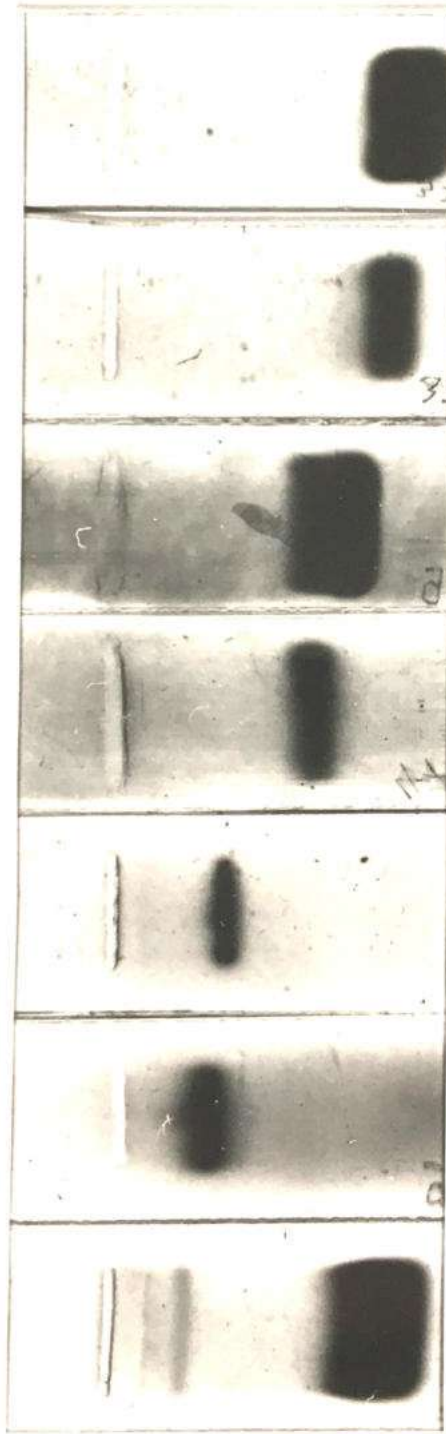
Planche XIX

Electrophorèse sur gel d'agarose de différents mucopolysaccharides
peptides et glycopeptides sulfatés.

ETUDE DE MUCOPOLYSACCHARIDES-PEPTIDES

ISOLES DE DIFFERENTS TISSUS

Coloration Bleu de Toluidine



Témoin HEPARINE

DERMATANE-SULFATE

KERATANE-CHONDROÏTINE-SULFATE
(cartilage)

KERATANE-SULFATE
(cornée)

ACIDE HYALURONIQUE
(corps vitré)

SULFO-FUCOSIDO-GLYCOPEPTIDE

SERUM HEPARINE + CHONDROÏTINE-SULFATE

↓
Sérumalbumine

L'association de ces techniques de caractérisation permet d'aboutir à une définition précise des polysaccharides-peptides. Elles représentent d'ailleurs les temps de préparation et d'isolement nécessaires à l'étude chimique de ces substances. Une définition plus précise ne peut être obtenue que par l'étude des éléments de structure du polysaccharide-peptide isolé. Nos préparations ne nous permettant pas d'envisager la préparation d'une quantité suffisante de substance pour aborder ces études structurales, c'est à ce protocole de caractérisation et d'étude que nous nous limiterons.

c) Matériel et méthodes

Les hypophyses de 200 Cyprins sont prélevées 24 h après l'injection de sulfate radioactif. Nous nous sommes efforcés de ne conserver pour cette étude que la pars distalis seule, en éliminant soigneusement la pars intermedia et une grande partie de la neurohypophyse.

Le cartilage de Poissons est également prélevé 24 h après l'injection de sulfate radioactif. Ce matériel nous permet d'obtenir un produit de référence riche en chondroïtine-sulfate et en kératane-sulfate marqués par $^{35}\text{SO}_4$ que nous avons utilisé pour la mise au point de nos méthodes de fractionnement.

Nous utilisons comme substances de référence :

- un kératane-sulfate-peptide préparé à partir de la cornée d'oeil de boeuf,
- un chondroïtine-sulfate-peptide obtenu à partir du cartilage bovin et purifié par chromatographie sur DEAE - Séphadex,
- une fraction d'héparitine-sulfate isolée des urines d'un malade atteint d'une maladie de HURLER.
- une hyaluronate-protéine isolée du corps vitré bovin,
- des glycopeptides sulfatés préparés à partir des sécrétions bronchiques humaines par fractionnement au Rivanol de l'hydrolysats pronasique,
- les mélanges de sphingomyélines, lécithines, céphalines, cérébrosides et acides gras utilisés comme substance de référence dans l'étude par chromatographie en couche mince sont obtenus commercialement.

1) Préparation des hydrolysats tissulaires

Deux temps d'hydrolyse par la papaïne, puis par la trypsine, sont utilisés pour libérer les polysaccharides-peptides hypophysaires.

Hydrolyse papainique

4 lots de 50 hypophyses lyophilisées sont mis en suspension dans un tampon phosphate 0,01 M de pH 6,5. On ajoute 1,5 mg de mercuri-papaine activée par le BAL (British anti-lewisite). Chacun des lots est maintenu 12 heures sous agitation à 37°C. Le pH est réajusté à la valeur de 6,5 et on ajoute alors une quantité égale de papaine. L'hydrolyse est alors poursuivie pendant 12 h à 37°C.

Hydrolyse trypsique

Le mélange est ajusté à pH 7,0. On ajoute 2 mg de trypsine et on poursuit l'hydrolyse pendant 16 heures à 37°C. Une filtration permet de séparer le résidu tissulaire du surnageant d'hydrolyse.

2) Fractionnement de l'hydrolysate

Le fractionnement de l'hydrolysate est réalisé sur colonne de Biogel P 20 (40 cm x 1,5 cm). Pour visualiser le fractionnement, un entraîneur constitué de glycosamino-glycanes sulfatés d'origine bronchique de poids moléculaire supérieur à 25.000 et une préparation de chondroïtine-sulfate-peptides sont ajoutés au surnageant d'hydrolyse. La colonne de Biogel P 20 est équilibrée en eau distillée. Les fractions éluées sont identifiées par lecture des variations de densité optique mesurées à 278 m μ (mesure de la DO à 278 m μ pour le repérage de fraction de nature protéique (présence d'A.A. aromatiques ou de polypeptides) et la mesure de la radioactivité est faite à l'aide de l'appareil Tri-Carb Packard.

Un fractionnement d'hydrolysate préhypophysaire et d'entraîneurs sur colonne de DEAE-Séphadex A 25 (microcolonne de 20 cm x 1 cm) est également pratiqué. L'éluion est conduite avec des solutions d'HCl 0,01 N de concentration croissante en NaCl (0,1 M, 0,3 M, 0,7 M, 1,0 M). Une mesure de la radioactivité est pratiquée sur les fractions éluées à l'aide de l'appareil Tri-Carb.

3) Caractérisation des sulfoglycopeptides

Les fractions obtenues par chromatographie de gel filtration sont précipitées par le chlorure de cetylpyridinium (CPC) en milieu NaCl 0,15 M. Elles sont soumises à une étude électrophorétique avec autoradiographie.

Un fractionnement de l'hydrolysate total avec des entraîneurs par le Rivanol à pH 1,5 permet d'isoler l'ensemble des glycopeptides sulfatés en vue de leur caractérisation électrophorétique.

d) Résultats1) Hydrolysats total

L'hydrolyse enzymatique des hypophyses de Cyprin libère un groupe de glycopeptides sulfatés dont nous avons pu :

- démontrer la nature glycopeptidique par fractionnement au Rivanol à pH 1,5,
- préciser le comportement sur colonne de Biogel P 20 par rapport à des polysaccharides-peptides témoins,
- définir le caractère d'acidité par l'étude électrophorétique et le comportement sur colonne de DEAE-Séphadex A 25.

α - Etude des fractions précipitées par le Rivanol à pH 1,5

Une partie de l'hydrolysats enzymatique est amenée à pH 1,5. L'addition de Rivanol jusqu'à la concentration finale de 3 % précipite la totalité des polysaccharides sulfatés présents. Le radiosulfate inorganique n'est pas précipité dans ces conditions. Le précipité obtenu est dissous dans une solution de NaCl à 5 % et précipité par 4 volumes d'éthanol. Cette préparation reprise dans l'eau distillée est étudiée en électrophorèse sur papier (voir p.79). On caractérise par autoradiographie de l'électrophorégramme une zone de radioactivité, de mobilité électrophorétique légèrement inférieure à celle du chondroïtine-sulfate utilisé comme témoin.

β - Fractionnement de l'hydrolysats par chromatographie sur colonne de Biogel P 20

Le mélange de glycopeptides sulfatés d'origine bronchique de chondroïtine-sulfate et de glycopeptides radioactifs de l'hydrolysats hypophysaires est déposé sur une colonne de Biogel P 20 équilibrée en eau distillée.

Le diagramme obtenu est représenté dans la planche XX. La fraction 1 exclue de la colonne de Biogel correspond aux glycopeptides d'origine bronchique qui absorbent à 278 m μ . Les chondroïtine-sulfate-peptides de tailles moléculaires variables mais toujours inférieures à 25.000, sont élués plus tardivement (fractions 2 et 3). La fraction 4 correspond aux peptides et aux sels minéraux de l'hydrolysats. Deux pics de radioactivité sont obtenus, l'un (F3) correspond à une fraction de poids moléculaire voisine de celle des chondroïtine-sulfate-peptides, l'autre (F4) peut être identifié à un excès de radiosulfate inorganique non incorporé dans la structure définitive des glycopeptides hypophysaires, ce qui est en accord avec l'analyse électrophorétique de broyats hypophysaires (p. 69).

Les 4 fractions séparées sont lyophilisées. Nous les soumettons à une électrophorèse sur papier en tampon pyridine-acide acétique

Planche XX

Chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 20 d'un hydrolysate hypophysaire de Cyprin.

Une fraction non radioactive de poids moléculaire supérieur à 20.000 (Biogel P 20) est caractérisée dans la fraction 1 (densité optique mesurée à 278 m μ).

La fraction 3, riche en glucides combinés, a un poids moléculaire plus faible et correspond à des glycopeptides dont la faible copule peptidique ne donne plus d'absorption à 278 m μ .

La fraction 4 de très faible taille moléculaire correspond à du SO₄ libre, des oligopeptides, oligosaccharides et sels minéraux.

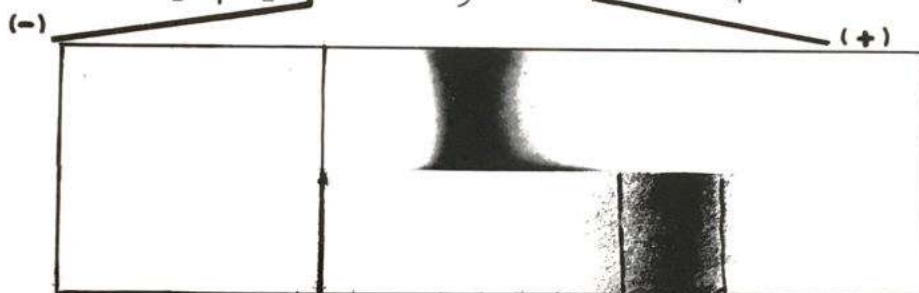
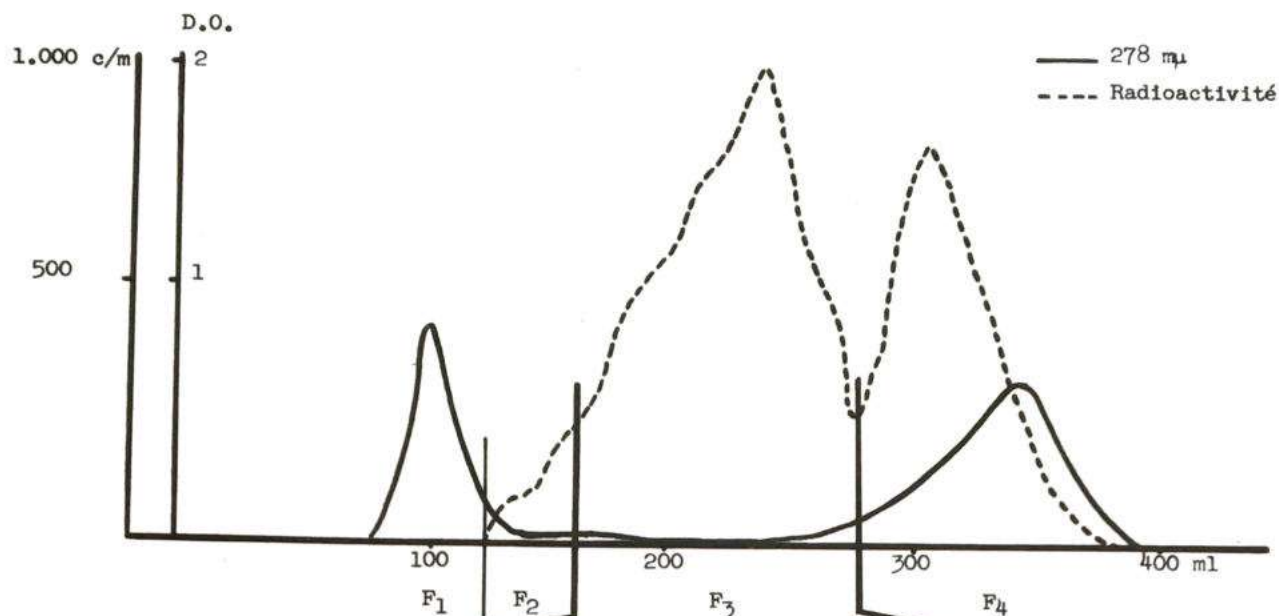
L'étude électrophorétique sur papier et l'autoradiographie de la fraction 3, montrent que la zone radioactive provenant de l'hydrolysate préhypophysaire a une mobilité plus lente que le chondroïtine-sulfate coloré par le bleu de Toluidine.

Chromatographie de gel-filtration sur Biogel P 20 d'un hydrolysate de cartilage de Cyprin

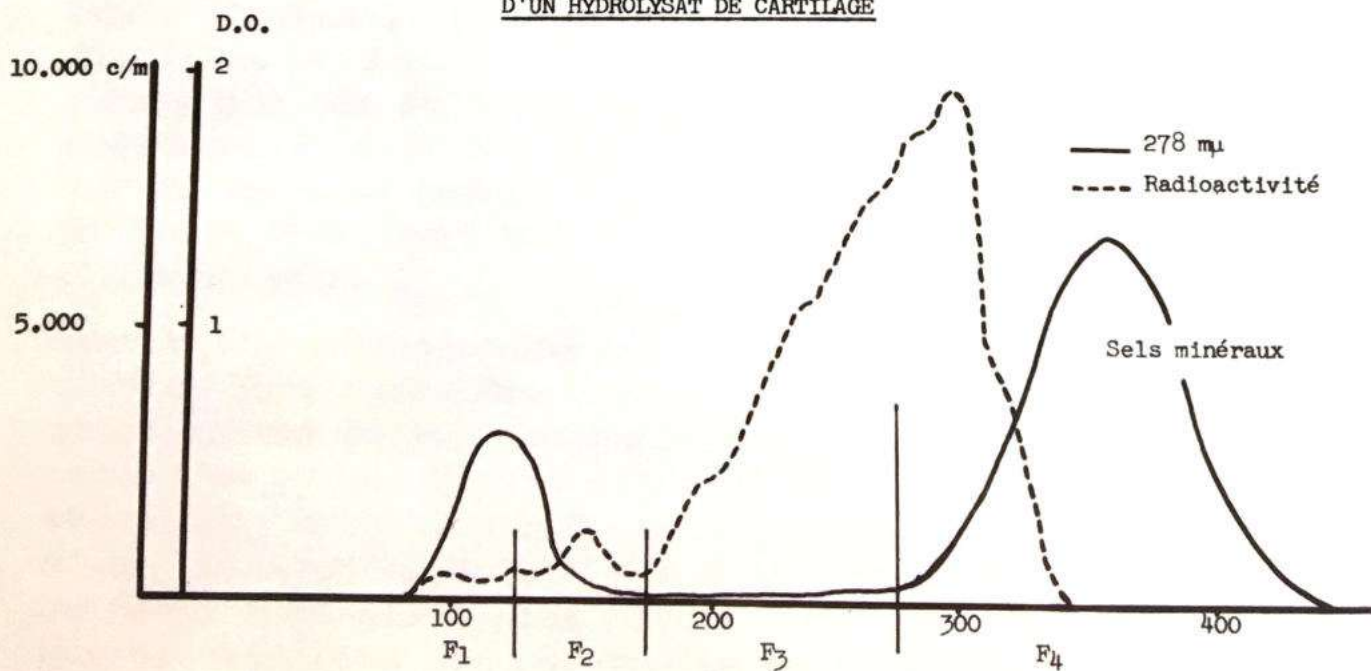
Même fractionnement que ci-dessus d'un hydrolysate de cartilage de Cyprin. Les mucopolysaccharides-peptides (chondroïtine-sulfate et kératane-sulfate) sont obtenus dans la fraction 3. On constate donc une analogie de comportement, sur colonne de Biogel P 20, des glycopeptides libérés par hydrolyse enzymatique de l'hypophyse avec ces mucopolysaccharides acides. Cette analogie ne concerne bien entendu que le poids moléculaire de ces substances.

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR BIOGEL P 20
 D'UN HYDROLYSAT HYPOPHYSAIRE

Planche XX



CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR BIOGEL P 20
 D'UN HYDROLYSAT DE CARTILAGE



de pH 3,9. Les bandes électrophorétiques sont placées 30 jours au contact du film radiographique. Elles sont ensuite colorées, tandis que les émulsions photographiques sont révélées.

Une bande de radioactivité est localisée dans la fraction 3, très homogène, de mobilité électrophorétique inférieure à celle de l'entraîneur chondroïtine-sulfate témoin (Planche XX). Elle correspond à un glycopeptide sulfaté, de caractère moins acide que le chondroïtine-sulfate témoin.

Deux zones de radioactivité sont révélées par l'étude radioélectrophorétique de la fraction 4. Une zone mineure migre très rapidement vers l'anode et correspond à du radiosulfate libre. La seconde fraction, de mobilité électrophorétique voisine de celle du glycopeptide identifié dans la fraction 3 est cependant plus diffuse en électrophorèse. Elle s'identifie à un glycopeptide de poids moléculaire plus faible que le précédent.

Deux glycopeptides de poids moléculaires différents sont caractérisés par chromatographie sur colonne de Biogel P 20. Ces deux glycopeptides ont incorporé une fraction très importante du radiosulfate hypophysaire.

Pour confirmer le caractère glycopeptidique de ces composants, nous avons vérifié qu'ils étaient bien précipités par le chlorure de cétypyridinium (CPC) en milieu chloruré sodique 0,15 M.

L'addition d'une solution de CPC à 1 % à la fraction 3 précipite le chondroïtine-sulfate et entraîne également la totalité de la radioactivité.

γ - Isolement des glycopeptides sulfatés par chromatographie sur colonne de DEAE-Séphadex A 25

L'hydrolysate hypophysaire est précipité par 4 volumes d'éthanol. Le précipité est mis en solution dans 1 ml d'eau distillée et déposé sur une colonne de DEAE-Séphadex A 25 équilibrée par une solution de NaCl 0,1 M. Le passage successif des solutions de NaCl de concentration croissante (0,1 M, 0,3 M, 0,7 M, etc ...) permet d'éluer deux pics de radioactivité ; l'un en HCl 0,01 N, NaCl 0,1 M, le second en HCl 0,01 N, NaCl 0,3 M. (Planche XXI).

Cette technique de fractionnement sépare très nettement les glycopeptides et les polysaccharides sulfatés en fonction de leur caractère acide. Nos études réalisées sur diverses préparations de polysaccharides-peptides nous ont permis de constater que le kératane-sulfate et les glycopeptides sulfatés des sécrétions bronchiques étaient généralement élués en présence d'une solution de NaCl 0,3 M en HCl 0,01 N. Les chondroïtines-sulfates sont élués plus tardivement (NaCl 0,7 M ou 1 M), l'héparitine-sulfate est obtenue en présence de NaCl ou même 1,4 M. Il faut utiliser des solutions de NaCl 1,5 M et 2,0 M pour éluer les préparations d'héparine (HAVEZ et coll., 1967 a et b).

Etude comparative des chromatographies sur DEAE-Séphadex A 25
d'hydrolysats hypophysaires et de cartilage de Cyprin.

Hydrolysat préhypophysaire

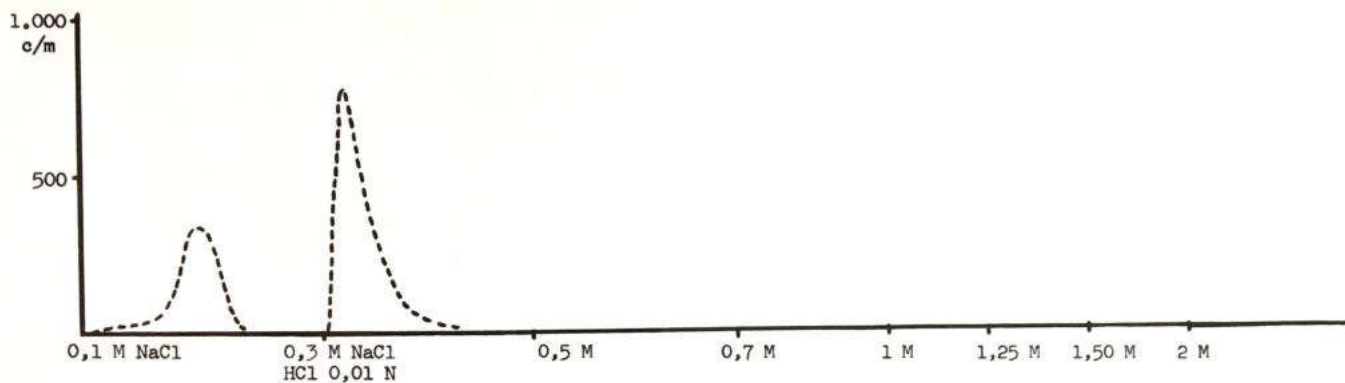
En 0,1 M NaCl est éluée une fraction de caractère neutre qui ne renferme qu'une faible trace de radiosulfate. La fraction majeure radioactive de l'hydrolysat hypophysaire est obtenue en 0,3 M NaCl, son comportement s'apparente à celui du kératane-sulfate témoin qui est présent dans l'hydrolysat de cartilage.

Hydrolysat de cartilage

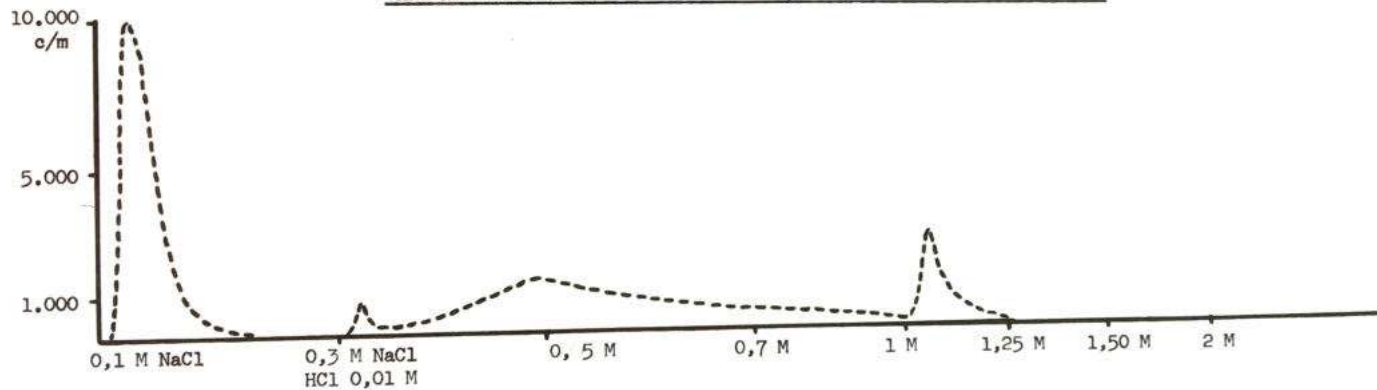
Dans l'hydrolysat de cartilage, on trouve en plus des mucopolysaccharides sulfatés riches en groupements sulfates qui sont élués plus tardivement (chondroïtine-sulfate essentiellement).

CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX A 25 D'UN HYDROLYSAT HYPOPHYSAIRE

Planche XXI



CHROMATOGRAPHIE SUR DEAE-SEPHADEX A 25 D'UN HYDROLYSAT DE CARTILAGE



----- RADIOACTIVITE ENREGISTREE SUR APPAREIL TRI-CARD PACKARD

Les glycopeptides sulfatés libérés par hydrolyse de la préhypophyse ont donc un comportement analogue à celui des glycosaminoglycanes sulfatés (kératane-sulfate, peptides ou glycopeptides sulfatés des sécrétions muqueuses épithéliales) (INOUE et YOSIZAWA, 1966 - HAVAZ et coll., 1967 a et b). Ces résultats confirment ceux de l'électrophorèse sur papier en tampon de pH 3,9 (Planche XX).

2) Etude du résidu d'hydrolyse

Le résidu d'hydrolyse séparé par centrifugation à 7000 t/m. conserve une nette radioactivité. Il se caractérise par sa richesse en composants de nature lipidique : une extraction par l'acétone entraîne une faible partie de cette radioactivité. L'extrait acétonique est évaporé et étudié par chromatographie en couche mince de gel de silice (Planche XXII). La chromatographie est réalisée avec le solvant chloroforme/méthanol/eau 65 : 25 : 4 qui permet de séparer par ordre de mobilité décroissante : lipides neutres, acides gras libres, cérébrosides, céphalines, cérébrosulfatides, lécitines, lysocéphalines, sphingomyélines, lysolécithines.

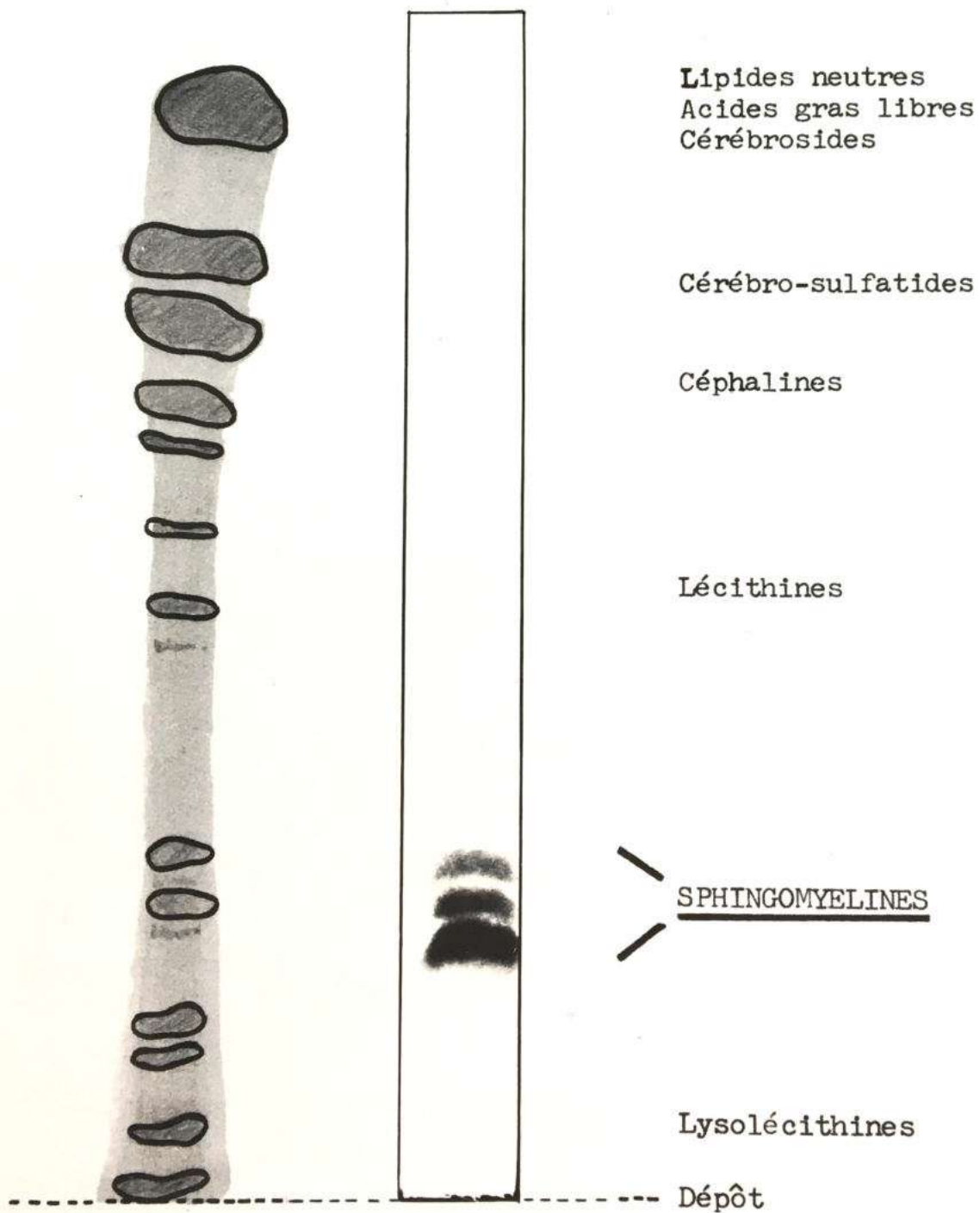
Une autoradiographie du chromatogramme permet d'identifier trois composants radioactifs qui se localisent dans la région de Rf analogue à celui des sphingomyélines. On caractérise sur le chromatogramme trois fractions majeures correspondant aux lipides neutres, aux cérébrosides et aux céphalines. Mais nous n'avons pu préciser la nature exacte des substances décelées par l'autoradiographie.

Une seconde délipidation du résidu d'hydrolyse par le mélange chloroforme-méthanol, (2 : 1) n'entraîne pas de radioactivité. Le résidu ainsi délipidé est à nouveau soumis à une hydrolyse par pronase. L'hydrolysât obtenu est déposé sur une colonne de Biogel P 20 et soumis à une chromatographie en présence de chondroïtine-sulfate ajouté à l'hydrolysât. Les fractions sont séparées, lyophilisées et étudiées par électrophorèse en agarose à pH 8,2. Les autoradiographies permettent de caractériser une fraction radioactive, légèrement retardée sur colonne de Biogel P 20, mais qui possède une mobilité électrophorétique identique à celle du chondroïtine-sulfate ajouté à l'hydrolysât.

e) Conclusions

Deux hydrolyses successives par la papaïne et par la trypsine de préhypophyses de Cyprins obtenues 24 h après l'injection de radiosulfate permettent de libérer un groupe de composants radioactifs, de poids moléculaire inférieur à 20.000, bien séparés du radiosulfate "libre" par chromatographie sur colonne de Biogel P 20. Ces composants possèdent les caractéristiques de

Etude de l'Extrait acétonique du résidu d'hydrolyse



Révélation
à l'iode

Autoradiographie

Hypophyses (congelées dans azote liquide ; lyophilisées)

Hydrolyse par la papaïne (24 h)

(tampon phosphate 0,01 M pH 6,5)

Hydrolyse par la trypsine (16 h)

Hydrolysate hypophysaire

Centrifugation (7.000 t/mn)

Culot

Extraction par acétone

Surnageant

Biogel P 20

Fractionnement par le Rivanol à pH 1,5

Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A 25

Extrait soluble dans l'acétone (chromatographie en couche mince : 3 composants radioactifs de Rf identique aux Sphingomyélines)

Surnageant (pas de radioactivité)

Deux fractions radioactives éluées respectivement en :

Extraction par chloroforme-méthanol

Précipité (électrophorèse en agarose ; autoradiographie)

0,1 M NaCl $^{35}\text{SO}_4$ libre

Extrait : pas de radioactivité

Résidu

Hydrolyse pronasique

Biogel P 20

0,3 M NaCl HCl 0,01 N Glycopeptide sulfaté radioactif

Fractions radioactives lyophilisées, étudiées en électrophorèse en agarose pH 8,2

Composant radioactif de mobilité identique à celle du CS témoin

Fraction radioactive (précipitable par le CPC en milieu NaCl 0,15 M) de mobilité électrophorétique inférieure à celle du CS témoin

Fraction radioactive de mobilité légèrement inférieure à celle du CS témoin

précipitations par le chlorure de cétylpyridinium et par le Rivanol à pH 1,5 caractéristiques des polysaccharides sulfatés ou des glycopeptides sulfatés. Leur mobilité électrophorétique est inférieure à celle du chondroïtine-sulfate en tampon de pH 3,9.

Après délipidation par l'acétone et le mélange chloroforme-méthanol du résidu d'hypophyse, un second groupe de polysaccharides sulfatés peut être libéré par hydrolyse pronasique. Ces polysaccharides sulfatés migrent en électrophorèse en agarose dans la zone de mobilité électrophorétique du chondroïtine-sulfate. Enfin, une faible radioactivité peut être extraite du premier résidu d'hydrolyse par l'acétone. Nous avons pu démontrer que cette fraction ne peut être identifiée à des cérébrosulfatides mais qu'elle se déplace en chromatographie sur couche mince de gel de silice dans la région de Rf analogue à celle des sphingomyélines. Nous n'avons pu préciser exactement la nature de ce composant soluble dans l'acétone qui peut correspondre à du 35-S incorporé dans des éléments structuraux des membranes cellulaires de l'adénohypophyse ou de la neurohypophyse : ce que l'étude autoradiographique en microscopie optique et électronique nous autorise à admettre (voir p. 50). Une autre interprétation de la nature de ce composant radioactif repose sur la contamination du 35-S par du 32-P que nous avons signalée au début de ce travail (voir p. 24). Mais la majeure partie du radiosulfate est bien incorporée au niveau de la préhypophyse dans la structure de glycosaminoglycanes-sulfatés.

IX - CONCLUSIONS GENERALES

Ainsi de l'ensemble de ces recherches histoautoradiographiques, histochimiques et biochimiques réalisées sur la préhypophyse, tant in vivo qu'in vitro, avec le radiosulfate, se dégage un fait commun aux espèces étudiées (Cobaye, Souris, Cyprin, Black-Molly) : l'intense participation de groupements SO_4^- au métabolisme des cellules préhypophysaires PAS+, BA+, AF+.

Les résultats apportés par l'étude de l'incorporation de différentes radiomolécules (acides aminés, acétate, glucose) indiquent, en accord avec leurs propriétés histochimiques, que ces cellules sont le lieu d'une synthèse polysaccharidique ou glycoprotéique. Ces faits nous conduisent à admettre la participation de groupements SO_4 à la biosynthèse de ces molécules polysaccharidiques.

En effet, chez le Cyprin, après injection de $^{35}\text{-SO}_4\text{Na}_2$, nous avons pu, par des méthodes biochimiques, isoler 2 composants contenant la quasi-totalité de la radioactivité présente dans la préhypophyse et qui possèdent les caractéristiques physico-chimiques des polysaccharides sulfatés ou de glycopeptides sulfatés. L'un s'apparente par certaines de ses propriétés physico-chimiques au chondroïtine-sulfate; l'autre n'en diffère que par ses propriétés électrophorétiques, qui en font un composant de caractère nettement moins acide. Etant donné que la répartition des différentes catégories cellulaires dans la préhypophyse rend impossible l'isolement de la variété cellulaire riche en $^{35}\text{-SO}_4$, nous ne pouvons préciser si un seul ou les deux polysaccharides isolés sont synthétisés dans ces cellules.

En ce qui concerne la nature fonctionnelle des cellules qui fixent intensément du $^{35}\text{-SO}_4$, si à la suite des expériences de thyroïdectomie, on peut admettre la nature thyroïdrotrope de ces cellules chez le Cobaye et la Souris ; par contre, chez le Cyprin, cette intense incorporation de radiosulfate intéresse aussi bien les cellules dont les unes seraient thyroïdrotropes et les autres gonadotropes.

Les recherches futures devront donc s'orienter d'une part vers l'isolement et l'identification de la structure de ces composants sulfatés, que l'on sait être de nature polysaccharidique chez le Cyprin, d'autre part vers l'établissement des rapports ou des liens qui existent entre ces molécules sulfatées et les hormones contenues dans ces cellules PAS+, BA+, AF+. En effet, l'existence de ces rapports est attestée par nos observations chez la Souris thyroïdectomisée, qui indiquent que la vitesse du renouvellement des ions $^{35}\text{-SO}_4$ non libres est fonction du degré de synthèse hormonale des cellules préhypophysaires thyroïdrotropes.

ERRATA

- Page 88 : BATES R.W. et CONDLIFFE P.G., 1966
BUTTERWORTH'S LONDON, 374-410.
- Page 90 : COIMBRA A. et LEBLOND C.P., 1966
J. Cell Biol. ...
- Page 90 : CURRAN R.C. et KENNEDY J.S., 1955
The distribution of the sulphated mucopolysaccharides in
the mouse.
- Page 91 : DAVIES D.V. et YOUNG L., 1954
Radioautographic studies ...
- Page 92 : DEMINATTI M. et WEILL J.D., 1958
C.R. Soc. Biol. (Paris), 152, 815-817
- Page 92 : DESCLIN L., 1940
Détection de substances pentosenucléiques ...
- Page 93 : DUCOMMUN S., 1965
Ann. Endocrin. (Paris), 26, 385-392.
- Page 94 : FICQ A., GAVOSTO F. et ERRERA M., 1954
Incorporation in vitro de glycine-1-14-C ...
Exp. Cell Res., ...
- Page 95 : GOMORI G., 1951.
Aldehyde-fuchsin ...
- Page 96 : HERLANT M., 1943
Arch. Biol. (Liège), 54, 225-357.
- Page 99 : LISON L., 1935
Colorants métachromatiques ...
- Page 101 : PEARSON P.B., 1956.
Paris, 153-167 - 244 p.
- Page 102 : PETROVIC A., 1963
Arch. Anat. Histol. et Embryol., 47, 121-291
Mai, juin (abstr.).
- Page 103 : SCHLABERG A., 1961
34-44 in La culture organotypique ...
- Page 105 : ZAJDELA F., 1957
Rev. Gen. Sci., 64, 105-114.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS A.E., 1946. - Variations in the potency of thyrotropic hormone of the pituitary in animals.
Quart. Rev. Biol., 21, 1-32.
- ARON M. et PETROVIC A., 1959. - Données expérimentales sur la localisation des sécrétions de la corticostimuline et de la thyrostimuline dans la préhypophyse chez le Cobaye.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 153, 322-324.
- ARON M. et PETROVIC A., 1960. - Contrôle hypothalamique des sécrétions gonadotrope, corticotrope et thyrotrope dans la glande pituitaire du Cobaye femelle.
Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exper., 49, 363-394.
- BAECKELAND E., 1966.- Etude histoautoradiographique des mucopolysaccharides présents dans les granules cytoplasmiques des mastocytes de Souris.
C.R. Acad. Sc. (Paris), 263, 268-270.
- BARNES B.G., 1962. - Electron microscope studies on the secretory cytology of the mouse anterior pituitary.
Endocrinology, 71, 618-628.
- BARNES B.G., 1963.- The fine structure of the mouse adenohypophysis in various physiological states.
Colloq. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris), 128, 91-103.
- BARNETT R.J., LADMAN A.M., Mc ALLASTER, N.J. & SIPERSTEIN E.R. 1956. - The localization of glycoprotein hormones in the anterior pituitary glands of rats investigated by differential protein solubilities, histological stains and bio-assays.
Endocrinology, 59, 398-418.
- BATES R.W. et CONDLIFFE P.G., 1966. - The physiology and chemistry of thyroid stimulating hormone.
in The Pituitary, Ed.G. HARRIS et B. DONOVAN, BUTTERWORTH'S LONDON
- BEACH A.W., 1959. - Seasonal changes in the cytology of the ovary and of the pituitary gland of the goldfish.
Canad. J. Zool., 37, 615-625.

- BELANGER L.F., 1954.- Autoradiographic visualization of S-35 incorporation and turnover by the mucous glands of the gastrointestinal tract and other soft tissues of rat and hamster.
Anat. Rec., 118, 755-771.
- BELANGER L.F. et MIGICOVSKY B.B., 1962. - Les réactions colorées pour la détection des mucopolysaccharides interprétées à la lumière de l'autoradiographie, du radiosulfate synthétisé in vivo et du radiocalcium absorbé in vitro.
Ann. Histochem., 7, 81-90.
- BELL W.R., 1938. - Morphology of the hypophysis of the common goldfish (*Carassius auratus* L.).
Zoologica, 23, 219-234.
- BESCOL-LIVERSAC J., 1958. - Les mucopolysaccharides étudiés par la fixation du radiosulfate.
Ann. Histochem., 3, 309-365.
- BETTELHEIM-JEVONS F.R., 1958 - Protein - carbohydrate complexes
Adv. in Protein Chem., Academic Press Inc., Publishers.
13, 35-105.
- BHAVANANDAN V.P. et MEYER K., 1967.- Studies on keratosulfates. Methylation and partial acid hydrolysis of bovine corneal keratosulfate.
Journ. Biol. Chem., 242, 4352-4359.
- BIMES C., PLANEL H., GUILHEM A. et BOURDIL M., 1953. - Etudes histochimiques sur les cellules basophiles de l'hypophyse du Cobaye.
C.R. Ass. des Anat., 40e réunion (Bordeaux), 565-572.
- BLOCK R.J., STEKOL J.A. et LOOSLI J.K., 1951. - Synthesis of sulfur amino-acids from inorganic sulfate by ruminants. II. Synthesis of cystine and methionine from sodium sulfate by the Goat and by the microorganisms of the rumen of the Ewe.
Arch. Biochem. Biophys., 33, 353-363.
- BOSTROM H. et ODEBLAD E., 1953. - Autoradiographic observations on the incorporation of S-35 labeled sodium sulfate in the rabbit fetus.
Anat. Rec., 115, 505-513.
- BRACHET J., 1942. - La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'Amphibiens en voie de développement.
Arch. Biol. (Liège), 53, 207-257.

BRAY B.A., LIEBERMAN R. et MEYER K., 1967. - Structure of human skeletal keratosulfate. J. Biol. Chem., 242, 3373-3380.

BRIMACOMBE J.S. et WEBBER J.M., 1964. - Mucopolysaccharides. B.B.A. Library, volume 6. Elsevier publishing company Amsterdam, New-York, London, 181 p.

BURT A.S., LANDING B.H. et SOMMERS S.C., 1954. - Amphophil tumors of the hypophysis induced in mice by I-131. Cancer Res., 14, 497-502.

Mc CARTHY C. et REID L., 1964. - Acid mucopolysaccharide in the bronchial tree in the mouse and rat (sialomucin and sulphate) Quart. J. Exp. Physiol., 49, 81-84.

CATCHPOLE H.R., 1949. - Distribution of glycoprotein hormones in the anterior pituitary gland of the rat. J. Endocrinol., 6, 218-225.

COIMBRA A. et LEBLOND C.P., 1966. - Sites of glycogen synthesis in rat liver cells as shown by electron microscope radioautography after administration of glucose-H-3. J. Cell. Biol., 30, 151-175.

CORDIER R. et HERLANT M., 1957. - Etudes histochimiques sur les cellules du lobe antérieur de l'hypophyse chez Xenopus Laevis Ann. Histochem., 2, 349-359.

CURRAN R.C. et KENNEDY J.S., 1955. - The distribution of the sulfated mucopolysaccharides in the mouse. J. Path. Bact., 70, 449-457.

CURRAN R.C., 1964. - The histochemistry of mucopolysaccharides Intern. Rev. Cytol., 17, 149-212.

D'ANGELO S.A., 1953. - Cyto-physiologic aspects of thyrotrophic hormone secretion in the goitrous Guinea Pig. Endocrinology, 52, 331-337.

D'ANGELO S.A., 1963. - Histophysiology of TSH secretion in the rodent. in : Cytologie de l'adénohypophyse. Editions du C.N.R.S. Paris, 1963, p. 149-162.

D'ANGELO S.A., 1966. - A comparative study of TSH and FSH secretion in Rat and Guinea Pig : effects of gonadectomy and goitrogens. Endocrinology, 78, 1230-1237.

- DAVIES D.V. et YOUNG L., 1954. - Autoradiographic studies of the digestive tracts of rats injected with inorganic sulphate labelled with sulfur-35.
Nature (London), 173, 448.
- DEMINATTI M., 1959. - Recherches cytochimiques sur la teneur en acide ribonucléique des différents types cellulaires de la préhypophyse chez le Cobaye.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 153, 320-322.
- DEMINATTI M., 1961 (a). - Etude comparative histoautoradiographique et histochimique de la préhypophyse, après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$, chez le Cobaye.
C.R. Acad.Sc. (Paris), 253, 329-330.
- DEMINATTI M., 1961 (b), - Etude histoautoradiographique de l'incorporation de DL- 35-S -méthionine dans la préhypophyse, in vivo et in vitro, chez le Cobaye.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 155, 1076-1078.
- DEMINATTI M., 1962 (a). - Etude comparative histoautoradiographique et histochimique de la préhypophyse, après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$, chez le Cobaye, la Souris et Carassius auratus.
Path. et Biol., 10, 425-428.
- DEMINATTI M., 1962 (b). - Etude histoautoradiographique comparative de la préhypophyse de Carassius auratus après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$ et de 35-S -méthionine.
C.R. Acad. Sc. (Paris), 254, 1510-1511.
- DEMINATTI M., 1962 (c). - Etude comparative histoautoradiographique et histochimique de l'incorporation de la 3-H-phénylalanine dans la préhypophyse, chez Carassius auratus.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 156, 922-924.
- DEMINATTI M., 1962 (d). - Etude histoautoradiographique et biochimique de la préhypophyse de Carassius auratus, après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$.
C.R. Soc. Biol., 151, 1924-1926.
- DEMINATTI M., 1963 (a). - Recherches sur le test histochimique de la méthylation appliquée à l'étude de la préhypophyse chez Carassius auratus.
C.R.Acad.Sc. (Paris), 256, 4987-4990.
- DEMINATTI M., 1963 (b). - Etude histochimique et histoautoradiographique de la préhypophyse de Mollienisia sphenops après administration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 157, 1979-1081.

- DEMINATTI M., 1964. - Etude autoradiographique de l'adénohypophyse après administration de 3-H-acétate, chez Carassius auratus. C.R. Soc. Biol. (Paris), 158, 733-735.
- DEMINATTI M., 1965.- Recherches sur l'incorporation du radiosulfate dans la préhypophyse chez la Souris, in vivo et in vitro. Bull.Ass.Anato. 50e réunion (Lausanne, 11-15 avril 1965) 379-390.
- DEMINATTI M., 1966. - Etude autoradiographique de la proadénohypophyse de Carassius auratus après injection de D-glucose-6-3-H. C.R. Soc. Biol. (Paris), 160, 1605-1607.
- DEMINATTI M., 1967.- Etude autoradiographique de l'incorporation du radiosulfate, dans la préhypophyse, in vitro chez la Souris. C.R. Soc. Biol. (Paris), 161, 615-618.
- DEMINATTI M. et VENDRELY C., 1959. - Etude de la teneur en acide désoxyribonucléique des cellules préhypophysaires chez le Cobaye. C.R. Soc. Biol. (Paris), 153, 840-843.
- DEMINATTI M. et VENDRELY C., 1961. - Etude cytophotométrique de la teneur en acide désoxyribonucléique des cellules préhypophysaires chez le Cobaye. Pathol. Biol., 9, 927-929.
- DEMINATTI M. et WEILL J.D., 1958. - Signification physiologique des différentes fractions obtenues par la séparation électrophorétique d'hormones gonadostimulantes purifiées. C.R. Soc. Biol., 152, 815-817.
- DEMINATTI M. et ZAHND M.M., 1962. - Etude histoautoradiographique de la pénétration de $35\text{-SO}_4\text{Na}_2$, 35-S-méthionine et 3-H-phénylalanine dans l'embryon, chez un poisson ovovivipare (Mollienisia). C.R. Soc. Biol. (Paris), 156, 925-926.
- DECLIN L., 1940. - Détection de substances pantosenucléiques dans les cellules du lobe antérieur de l'hypophyse du Rat et du Cobaye. C.R. Soc. Biol. (Paris), 133, 457-459.
- DHOM G. et STOCKER E., 1964. - Autoradiographische Studien über die DNS-Synthese im Hypophysenvorderlappen der Ratte. Experientia (Basel), 20, 384-385.

- DHOM G. et STÖCKER E., 1965. - Autoradiographische Untersuchungen zur nuclearen RNS-Synthese in der verschiedenen Zelltypen des Hypophysenvorderlappens der Ratte. Verh. dtsh. Ges. Path., 49, 320-323.
- DODGSON K.S., 1956. - Esters sulfuriques et sulfatases. in Colloque sur la biochimie du soufre, 123-134. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique (Paris) 244 p
- DRENCKHAHN F.O et MEISSNER J., 1956. - Autoradiographische Untersuchungen über die Lokalisation von $\text{Na}_2\text{-}^{35}\text{SO}_4$ in der Meerschweincheniere. Arch. exp. Path. Pharmacol., 227, 444-455.
- DUCOMMUN S., 1965. - Etude autoradiographique de l'incorporation de la proline tritiée par les cellules basophiles de l'adénohypophyse du Rat. Ann. Endocrin. Paris, 26, 385-392.
- DZIEWIATKOWSKI D.D., 1949 (a). - Rate of excretion of radioactive sulfur and its concentration in some tissues of the rat after intraperitoneal administration of labeled sodium sulfate. J. Biol. Chem., 178, 197-202.
- DZIEWIATKOWSKI D.D., 1949 (b). - On the utilization of exogenous sulfate sulfur by the rat in the formation of ethereal sulfates as indicated by the use of sodium sulfate labelled with radioactive sulfur. J. Biol. Chem., 178, 389-393.
- DZIEWIATKOWSKI D.D., 1951. - Radioautographic visualization of sulfur-35 disposition in the articular cartilage and bone of suckling rats following injection of labeled sodium sulfate. J. Exp. Med., 93, 451-458.

- DZIEWIATKOWSKI D.D., 1954. - Utilization of sulfate sulfur in the rat for the synthesis of cystine.
J. Biol. Chem., 207, 181-186.
- DZIEWIATKOWSKI D.D., 1958. - Autoradiographic studies with S-35-sulfate.
Int. Rev. Cytol., 7, 159-193.
- ELFTMAN H. et WEGELIUS O., 1959. - Anterior pituitary cytology of the dwarf mouse.
Anat. Rec., 135, 43-45.
- FAND S.B. et SPENCER R.P., 1965. - The uptake of steroids by the human pituitary gland in vitro. I. the interaction with tritiated adrenal and gonadal hormones.
J. Histochem. Cytochem., 13, 31.
- FERRANTE N.D. et RICH C., 1956. - The mucopolysaccharides of normal human urine.
Clin. Chim. Acta., 1, 519-524.
- FEWER D., THREADGOLD J. et SHELDON H., 1964. - Studies on cartilage. V. Electron microscopic observations on the autoradiographic localization of S-35 in cells and matrix.
J. Ultrast. Research, 11, 166-172.
- FICQ A., GAVOSTO F. et ERRERA M., 1954. - Incorporation in vitro de glucine-1-14-C dans les cellules individuelles de moelle osseuse.
Exp. Cell. Res., 6, 69-75.
- FISHER E.R. et LILLIE R.D., 1954. - The effect of methylation on basophilia.
J. Histochem. Cytochem., 2, 81-87.
- FLAMENT J., 1961. - Etude des relations hypothalamo-hypophysaires à l'aide des radioisotopes marqués au soufre-35.
C.R. Acad. Sc. (Paris), 252, 3487-3489.
- FOLLENIUS E., 1963. - Ultrastructure des types cellulaires de l'hypophyse de quelques Poissons Téléostéens.
Arch. Anat. micr. Morph. Exp., 52, 429-468.
- FOLLENIUS E., 1964. - Localisation des sites d'activité mitotique dans l'hypophyse de "Lebistes reticulatus R.". Etude autoradiographique au microscope électronique.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 158, 1942-1948.

- FOLLENIUS E., 1967.- Marquage sélectif des cellules acidophiles de la mésoadénohypophyse de Gasterosteus aculeatus, après injection de DL-noradrénaline-3-H-7. Etude autoradiographique au microscope électronique.
C.R. Acad. Sc. (Paris), 265, 358-361.
- FOLLENIUS E., 1968. - Autoradiographie au microscope électronique de l'intégration de la phénylalanine H-3 dans les cellules hypophysaires de l'Épinoche (Gasterosteus aculeatus).
Journal de Microscopie, 7, 36a.
- FORD D.H. et GROSS J., 1958. - The localization of I-131 labeled triiodothyronine and thyroxine in the pituitary and brain of the male guinea-pig.
Endocrinology, 63, 549-560.
- FORD D.H., HIRSCHMAN A., RHINES R. et ZIMBERG S., 1961. - The rate of uptake and radioautographic localization of 35-S in the central nervous system, pituitary and skeletal muscle of the normal male rat after injection of S-35 labeled cystine.
Exp. Neurol., 4, 444-459.
- GABE M., 1953. - Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine-paraldéhyde.
Bull. Micr. Appl., 3, 153-162.
- GABE M., 1964. - Histochimie des produits de sécrétion.
Biologie Médicale, 53, 641-674.
- GOLDBERG R.C. et CHAIKOFF I.L., 1951. - On the nature of the hypertrophied pituitary gland induced in the mouse by I-131 injections, and the mechanism of its development.
Endocrinology, 48, 1-5.
- GOMORI G., 1951. - Aldéhyde-fuchsin : a new stain for elastic tissue.
Amer. J. Clin. Path., 20, 665-666.
- GOSLAR H.G. et SCHULTZE B., 1958. - Autoradiographische Untersuchungen über den Einbau von S-35-Thioaminosäuren im Zwischenhirn von Kaninchen und Ratte.
Z.mikr.-anat. Forsch., 64, 556-574.
- GOTTSCHALK A., 1966. - Glycoproteins. Their composition, structure and function.
Edité par : B.B.A. Library, vol. 5. Elsevier Publishing Company, New-York, 628 p.

- GRANBOULAN P., 1965. - The use of radioautography in investigating protein synthesis.
Ed. by Leblond et K.B. Warren, p.43, London, New-York. Academic Press.
- GRAUMANN W. et HINRICHSEN K., 1960. - Uber die Basophilie der cyanophilen Zellen der Hypophyse.
Z. Zellforsch., 52, 328-345.
- HALE C.W., 1946. - Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues.
Nature (Lond.), 157, 802.
- HALMI N.S., 1952. - Differentiation of two types of basophils in the adenohypophysis of the rat and the mouse.
Stain Technol., 27, 61-64.
- HALMI N.S. et DAVIES J., 1953. - Comparison of aldehyde-fuchsin staining, metachromasia and periodic acid-Schiff reactivity of various tissues.
J. Histochem. Cytochem., 1, 447-459.
- HALMI N.S. et GUDE W.D., 1954. - The morphogenesis of pituitary tumors induced by radiothyroidectomie in the mouse and the effects of their transplantation on the pituitary body of the host.
Amer. J. Path., 30, 403-419.
- HAVEZ R., DEMINATTI M., ROUSSEL P., DEGAND P., RANDOUX A. et BISERTE G., 1967 (a). - Etude in vitro de l'incorporation de radiosulfate dans la muqueuse bronchique humaine.
C.R. Acad. Sc. (Paris), 264, 1527-1529.
- HAVEZ R., DEMINATTI M., ROUSSEL P., DEGAND P., RANDOUX A. et BISERTE G., 1967 (b). - Etude des glycoprotéines carboxyliques et sulfatées de la sécrétion bronchique humaine.
Clin. Chim. Acta., 17, 463-477.
- HEINEGARD D. et GARDELL S., 1967. - Studies on protein-polysaccharide complex (proteoglycan) from human nucleus pulposus. I. Isolation and preliminary characterisation.
Biochim. biophys. Acta., 148, 164-171.
- HERLANT M., 1943. - Recherches sur la localisation des hormones gonadotropes femelles au niveau de l'hypophyse antérieure.
Arch. BioL. (Liège), LIV, 225-357.

- HERLANT M., 1949. - Study of the pituitary body with the periodic acid-Schiff reaction.
Nature (London), 164, 703-704.
- HERLANT M., 1950. - Méthodes nouvelles applicables à l'étude histologique du lobe antérieur de l'hypophyse.
Ann. Endocrin., 11, 644-647.
- HERLANT M., 1952. - Séparation des activités du lobe antérieur de l'hypophyse par la méthode des centrifugations différentielle.
Ann. Endocrin., 13, 611-623.
- HERLANT M., 1958. - Les glycoprotéines du lobe antérieur de l'hypophyse.
Ann. Histochem., 3, 67-83.
- HERLANT M., 1960. - Etude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire.
Bull. Micr. Appl., 10, 37-44.
- HERLANT M., 1962. - Quelques notions récentes sur l'histophysiologie de l'antéhypophyse.
Biol. Méd., 51, 205-222.
- HERLANT M., 1964. - The cells of the adenohypophysis and their functional significance.
Int. Rev. Cytol., 17, 299-382.
- HOFFMAN P., MASHBURN T.A., MEYER K. et BRAY B.A., 1967. - Proteinpolysaccharide of bovine-cartilage.
J. Biol. Chem., 242, 3799-3804.
- HOTCHKISS R.D., 1948. - A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharid structures in fixed tissue preparations.
Arch. Biochem., 16, 131-141.
- IGNESTI U., 1946. - Un nuovo metodo di colorazione per differenziare il tessuto muscolare del connectivo.
Monit. Zool. Ital., 55, 144-161.
- IMMERS J., 1954. - Chemical and histochemical demonstration of acid esters by acetic iron reagent.
Exp. Cell. Res., 6, 127-133.

- INOUE S. et YOSIZAWA Z., 1966. - Purification and properties of sulfated sialopolysaccharides isolated from pig colonic mucosa.
Arch. Biochem. biophys., 117, 257-265.
- ISRAEL M.S. et ELLIS R., 1961. - The pituitary changes in mice undergoing thyroid hyperplasia.
Brit. J. Cancer, 15, 763-768.
- JEANLOZ R.W., 1963. - Mucopolysaccharides (Acidic glycosaminoglycans).
in : Comprehensive Biochemistry édité par FLORKIN M. et STOTZ E.H. Elsevier edit. Amsterdam, London, New-York, vol.5 p.262-293
- JENNINGS M.A. et FLOREY H.W., 1956. - Autoradiographic observations on the mucous cells of the stomach and intestine.
Quart. J. exp. Physiol., 41, 131-152.
- JOLIOT-CURIE F., COURRIER R., HOREAU A. et SUE P., 1944. - Sur la préparation d'une hormone contenant des atomes radioactifs.
C.R. Soc. Biol., 138, 325-327.
- KANTOR T.G. et SCHUBERT M., 1957. - A method for the desulfation of chondroitin sulfate.
J. Amer. chem. Soc., 79, 152-153.
- KNECHT J., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A., 1967. - Structural studies on heparitin sulfate of normal and Hurler tissues.
J. Biol. Chem., 242, 4652-4661.
- KNUTSON F., 1966. - On the cellular site of corticotrophin production.
Acta. Endocrin., 52, 305-318.
- LACASSAGNE A. et LATTES J., 1924. - Répartition du Polonium (injecté sous la peau) dans l'organisme de Rats porteurs de greffes cancéreuses.
C.R. Soc. Biol., (Paris), 90, 352-353.
- LANE N., CARO L., OTERO-VILLARDEBO L.R., et GODMAN G.C., 1964. On the site of sulfatation in colonic goblet cells.
J. Cell. Biol., 21, 339-351.
- LEBLOND C.P., EVERETT N.B. et SIMMONS B., 1957., - Sites of protein synthesis as shown by radioautography after administration of S-35 labelled methionine.
Amer. J. Anat., 101, 225-271.

- LEPINE P., SLIZEWICZ P., DANIEL Ph. et PACCAUD M., 1956. - Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysate de caséine comme source d'acides aminés. Ann. Inst. Pasteur, 90, 654-656.
- LERAY C., 1963. - Etude de l'incorporation de cystéine marquée au soufre-35 dans le système hypothalamo-hypophysaire et plus spécialement dans l'adénohypophyse chez un Téléostéen : Mugil cephalus L. C.R. Acad. Sc. (Paris), 256, 795-798.
- LEVENSTEIN L., 1939. - The cytology of the pituitary gland of two varieties of goldfish (Carassius auratus L.) with some reference to variable factors in the gland which may possibly be related to the different morphological types. Zoologica (N.Y.), 24, 47-60.
- LINDAHL U. et RODEN L., 1966. - The chondroitin-4-sulfate-protein linkage. J. Biol. Chem., 241, 2113-2119.
- LIPMANN F., 1958. - Biological sulfate activation and transfer. Science, 128, 575-580.
- LISON L., 1935. - Etude sur la métachromasie. Colorant métachromatique et substances chromotropes. Arch. Biol., 46, 599-668.
- LISON L., 1954. - Alcian blue 8 G. with chlorantine fast red 5 B. A technic for selective staining of mucopolysaccharides. Stain Technol., 29, 131-138.
- LISON L., 1960. - Histochimie et Cytochimie animale. Gauthier-Villars Ed., Paris, 842 p.
- Mac MANUS, J.F.A., 1946. - Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature (Lond.), 158, 202.
- MELLORS R.C. et HOTCHKISS R., 1957. - Color reactions shown by purified hormones (FSH, ICSH, SH and prolactin) of the adénohypophysis after treatment with periodic acid-Schiff's reagent. in : Analytical Pathology. Ed. by R.C. MELLORS, New-York, Blakiston Co., 293-360.
- MESSIER B., 1965. - Number and distribution of thyrotropic cells in the mouse pituitary gland. Anat. Rec., U.S.A., 153, 343-348.

- MESSIER B., 1966. - Changes in the number of mouse thyrotropes following radiothyroidectomy.
Acta Endocrin., 52, 391-398.
- MEYER K., GRUMBACH M.M., LINKER A. et HOFFMAN P., 1958. - Excretion of sulfated mucopolysaccharides in Gargoylism (Hurler's syndrome).
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 97, 275-279.
- MOWRY R.W. et WINKLER C.H., 1956. - The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of *Cryptococcus neoformans*, *Pneumococci* and *staphylococci*.
Amer. J. Path., 36, 628-629.
- NAKAMURA R.M., MIYADA D.S. et MOYER D.L., 1963. - Effect of Liver regeneration partial hepatectomy on the uptake of tritiated thymidine in the pituitary gland of the Rat.
Nature (Lond.), 199, 707-708.
- NEUTRA M. et LEBLOND C.P., 1966 (a). - Synthesis of carbohydrate of mucus in the Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats injected with glucose-H-3.
J. Cell. Biol., 30, 119-136.
- NEUTRA M. et LEBLOND C.P., 1966 (b). - Radioautographic comparison of the uptake of galactose-H-3 and glucose-H-3 in the golgi region of various cells secreting glycoproteins or mucopolysaccharides.
J. Cell. Biol., 30, 137-150.
- OEHLERT W., SCHULTZE B. et MAURER W., 1958. - Autoradiographische Untersuchung der Grösse des Eiweissstoffwechsels der verschiedenen Zellen des Zentralnervensystems.
Beiträge zur path. Anat. und zur allgemeinen Path. 119, 343-376.
- OLIVEREAU M., 1962. - Cytologie de l'hypophyse du Cyprin (*Carassius auratus* L.).
C.R. Acad. Sc. 255, 2007-2009.
- OLIVEREAU M., 1963. - Effets de la radiothyroidectomie sur l'hypophyse de l'Anguille. Discussion sur la pars distalis des Téléostéens.
Gen. Comp. Endocrinol., 3, 312-332.

- OLIVEREAU M., 1964. - L'hématoxyline au plomb permet-elle l'identification des cellules corticotropes de l'hypophyse de Téléostéens ?
Z. Zellforsch., 63, 496-505.
- OLIVEREAU M., et CHARTIER-BARADUC M.M., 1965.- Aldactone et osmorégulation chez l'Anguille.
C.R. Soc. Biol., 159, 1498-1503.
- ORTMAN R., 1956. - A study of some cytochemical reactions and of the hormone content of the adenohypophysis in normal and in genetic dwarf mice.
J. Morph., 99, 417-431.
- ORTMAN R., FORBES W.F. et BALASUBRAMANIAN A., 1966. - Concerning the staining properties of aldehyde basic fuchsin.
J. Histochem. Cytochem., 14, 104-111.
- PAGET G.E. et ECCLESTON E., 1960. - Simultaneous specific demonstration of thyrotroph, gonadotroph, and acidophil cells in the anterior hypophysis.
Stain Technol., 35, 119-122.
- PEARSE A.G.E., 1948. - Cytochemistry of gonadotropic hormones.
Nature (Lond.), 162, 651.
- PEARSE A.G.E., 1952. - Observations on the localisation, nature and chemical constitution of some components of the anterior hypophysis.
J. Path. Bact., 64, 791-809.
- PEARSON P.B., 1956. - Utilisation du soufre minéral par les animaux supérieurs pour la synthèse de molécules organiques.
in Colloque sur la biochimie du soufre. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 153-167.
- PELC S.R., 1957. - Quantitative aspects of autoradiography.
Exp. Cell. Res. suppl. 4, 231-237.
- PETERSON M.R. et LEBLOND C.P., 1964 (a). - Uptake by the Golgi region of glucose labeled with tritium in the 1 or 6 position, as an indicator of synthesis of complex carbohydrates.
Exp. Cell. Res., 34, 420-423.
- PETERSON M.R. et LEBLOND C.P., 1964 (b). - Synthesis of complex carbohydrates in the Golgi region, as shown by radioautography after injection of labeled glucose.
J. Cell. Biol., 21, 143-148.

- PETERSON R.R. et WEISS J., 1955. - Staining of the adenohypophysis with acid and basic dyes.
Endocrinology, 57, 96-108.
- PETROVIC A., 1953. - Coloration elective des granulations α et β des cellules préhypophysaires par la seule fuchsine acide.
Bull. micr. Appl., 3, (5-6), 84-85.
- PETROVIC A., 1961. - Recherches sur la préhypophyse en culture organotypique : évolution structurale et action sur les organes-effecteurs associés in vitro.
Thèse Doctorat es-Sciences. Strasbourg. Imprimerie Alsatia Colmar, 179 p.
- PETROVIC A., 1963. - Recherches sur la préhypophyse en culture organotypique : évolution structurale et action sur les organes-effecteurs associés in vitro.
Arch. Anat. Histol. et Embryol. XLVII, 121-291
- PETROVIC A., 1965. - Cell renewal and protein synthesis in the adult guinea pig anterior pituitary in organ culture.
Sixteenth Annual Meeting of the Tissue Culture Association, Miami Beach, Florida, Mai-Juin 1965.
- PICKFORD G.E. et ATZ J.W., 1957. - The physiology of pituitary gland of fishes.
New-York Zool. Society, 613 p.
- POLONOVSKI M., 1965. - in : Biochimie Médicale
7e édition : P. Boulanger, J. Polonovski, F. Tayeau,
P. Mandel, G. Biserte.
Masson & Cie, éditeurs, Paris. 3 fascicules, 903 p.
- RACADOT J., 1949.- Acidophilie et basophilie des éléments de la glande pituitaire.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 143, 423-425.
- RACADOT J., 1963.- Mise en évidence histochimique d'acide sialique dans l'adénohypophyse.
C.R. Soc. Biol. (Paris), 157, 486-489.
- RACADOT J., OLIVIER L., PORCILE E. et DROZ B., 1965. - Appareil de Golgi et origine des grains de sécrétion dans les cellules adénohypophysaires chez le Rat. Etude radioautographique en microscopie électronique après injection de Leucine tritiée.
C.R. Acad. Sc., 261, 2972-2974.

- REBEL A., 1961. - Etude cytologique de la préhypophyse par l'aldéhyde fuchsine de Gomori : sa contribution à la connaissance des relations entre l'hypophyse et la thyroïde. Thèse Doctorat en Médecine, Imprimerie Alsatia Colmar, Strasbourg, 126 p.
- RENNELS E.G. et Mc NUTT W., 1958. - The fine structure of the anterior pituitary cells of the dwarf mouse. *Anat. Rec.*, 131, 591-592 (abstr.).
- REYNOLDS E.S., 1963. - The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17, 208-212.
- RODEN L. et ARMAND G., 1966. - Structure of the chondroitine-4 sulfate-protein linkage region. Isolation and characterization of the disaccharide 3-O- -D-glucuronosyl-D-galactose. *J. Biol. Chem.*, 241, 65-70.
- ROMEIS B., 1940. - Innersekretorische Drüsen. II. Hypophyse, 625 pp., in Möllendorf, W. v. Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen, VI 3e partie, Berlin, Springer Verlag.
- SANO M., 1962. - Further studies on the theta cells of the mouse anterior pituitary as revealed by electron microscopy with special reference to the mode of secretion. *J. Cell. Biol.*, 15, 85-97.
- SCHABERG A., 1961. - Adrenal cortex and anterior hypophysis in vitro. 34-35, in La culture organotypique : Coll. Intern. du C.N.R.S., C.N.R.S. Edition, 282 p.
- SCHILLER S., MATHEWS M.B., CIFONELLI J.A. et DORFMAN A., - The metabolism of mucopolysaccharides in animals. Further studies on skin utilizing C-14-glucose, C-14-acétate, and S-35-sodium sulfate. *J. Biol. Chem.*, 218, 139-145.
- SCOTT J.E., 1955. - The solubility of cetylpyridinium complexes of biological polyanions in solution of salts. *Biochem. biophys. Acta*, 18, 428-429.
- SCOTT J.E., 1960. - Aliphatic ammonium salts in the assay of acidic polysaccharides from tissues. 145-197 in Methods of biochemical analysis. Vol. 8. Glick, D. edit. Interscience Publishers, Inc. New-York, 400p.

- SCRUGGS W.M., 1951. - The epithelial components and their seasonal changes in the pituitary gland of the carp (*Cyprinus carpio*, L.) and goldfish (*Carassius auratus* L.).
J. Morph., 88, 441-469.
- SENO N., MEYER K., ANDERSON B. et HOFFMAN P., 1965. - Variations in keratosulfates.
J. Biol. Chem., 240, 1005-1010.
- SIPERSTEIN E.R., 1955. - Histochemical demonstration of glycogen in the mouse pituitary.
Proc. Soc. exp. Biol., N.Y., 88, 296-300.
- SIPERSTEIN E.R., 1963. - Identification of the adrenocorticotrophin-producing cells in the rat hypophysis by autoradiography.
J. Cell. Biol., 17, 521-546.
- SLOPER J.C., ARNOTT D.J. et KING B.C., 1960. - Sulphur metabolism in the pituitary and hypothalamus of the rat a study of radioisotope uptake after the injection of ³⁵S DL-cysteine, methionine and sodium-sulfate.
J. Endocrin., 20, 9-23.
- SLOTWINSKI J., 1964. - Sur la coloration des grains de sécrétion de cellules basophiles de l'hypophyse chez les Rongeurs et les Carnivores.
C.R. Ass. Anat., IIe Réunion Européenne d'Anatomie. Bruxelles. Sept. 1963. Bulletin n° 122, 402-403.
- SPICER S.S., 1960. - A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides.
J. Histochem. Cytochem., 8, 18-36.
- SPICER S.S., 1962. - Histochemical differentiation of sulfated rodent mucins.
Ann. Histochem. Paris, 7, 23-28.
- SPICER S.S., SWARM R.L. et BURTNER H.J., 1961. - Comparison of basophilia with S-35 label in normal and methylated mucopolysaccharides.
Lab. Invest., 10, 256-264.
- STACEY M., 1946. - The chemistry of mucopolysaccharides and mucoproteins.
Advanc. Carbohyd. Chem., 2, 161-201.

- STEEDMAN H.F., 1950. - Alcian blue 8 G.S. : a new stain for mucin.
Quart. J. micr. Sci., 91, 477-479
- TIXIER-VIDAL A. et PICART R., 1967. - Etude quantitative par radioautographie au microscope électronique de l'utilisation de la DL-Leucine-3-H, par les cellules de l'hypophyse du Canard en culture organotypique.
The Journal of Cell. Biol., 35, 501-519.
- TARVER H. et SCHMIDT C.L.A., 1939. - The conversion of methionine to cystine : experiments with radioactive sulfur.
J. Biol. Chem., 130, 67-80.
- VILTER V., 1967. - Recherches sur le mécanisme de la méthylation histochimique des mucines acides.
C.R. Soc. Biol. 161, 2369-2373.
- WERNER SC, 1963. - Thyrotropine.
Charles C. Thomas Publ., Springfield, 392 p.
- WHITEHOUSE M.W. et BOSTROM M., 1961. - Studies on the action of some anti-inflammatory agents in inhibiting biosynthesis of mucopolysaccharides sulfates.
Biochem. Pharmacol., 7, 135-150.
- WOLFF E. et HAFFEN K., 1952. - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro.
Texas Reports on Biology and Medicine, 10, 463-472.
- ZAJDELA F., 1957. - Autoradiographie : analyse topographique de la répartition des radioisotopes en Histologie.
Rev. Gen. Sci., LXIV, 105-114.
- ZIEGLER DM et MELCHIOR J.B., 1956. - Fractionation of pituitary homogenates by differential centrifugation. I-Association of hormonal activity with subcellular fractions. II-Distribution of the amino-acid-incorporating system.
J. Biol. Chem., 222, 721-738.

Propositions données par la Faculté
ou, éventuellement, seconde Thèse :

Bases chromosomiques de la
détermination du sexe chez les Vertébrés

Strasbourg, le 21 mars 1969

Le Président du jury

J.H. VIVIEN

Vu et permis d'imprimer

Strasbourg, le 21 mars 1969

Le Doyen

J.H. VIVIEN