



**HAL**  
open science

**LES CELLULES CORTICOTROPES DE  
L'HYPOPHYSE DES BOVINS, OVINS et PORCINS  
MISE EN ÉVIDENCE PAR  
IMMUNOFLUORESCENCE ET CARACTÈRES  
CYTOLOGIQUES**

M.-P. Dubois

► **To cite this version:**

M.-P. Dubois. LES CELLULES CORTICOTROPES DE L'HYPOPHYSE DES BOVINS, OVINS et PORCINS MISE EN ÉVIDENCE PAR IMMUNOFLUORESCENCE ET CARACTÈRES CYTOLOGIQUES. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 1971, 11 (4), pp.589-624. hal-00896678

**HAL Id: hal-00896678**

**<https://hal.science/hal-00896678>**

Submitted on 11 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## LES CELLULES CORTICOTROPES DE L'HYPOPHYSE DES BOVINS, OVINS et PORCINS

MISE EN ÉVIDENCE PAR IMMUNOFLUORESCENCE  
ET CARACTÈRES CYTOLOGIQUES

M.-P. DUBOIS

*Station de Recherches sur la Physiologie de la Reproduction,  
Centre de Recherches de Tours, I. N. R. A.,  
37 - Nouzilly*

---

### RÉSUMÉ

1° L'auteur fait l'historique de la mise en évidence des cellules corticotropes chez les Mammifères.

2° Du point de vue immunologique, les anticorps (Ac.) utilisés sont de deux sortes :

a) Les premiers sont obtenus en immunisant des lapins contre la  $\beta$ -(1-24) corticotropine synthétique couplée à la sérum albumine bovine (BSA) par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde. En présence de l'Ac., la  $\beta$ -(1-24) corticotropine fixe le Complément ; de même la  $\beta$ -(1-24) corticotropine conjuguée à la BSA en présence du même Ac. saturé par la BSA. Les ACTH naturelles (porcine, bovine) inhibent ces réactions, mais ne fixent pas elles-mêmes le Complément en présence de l'Ac. (fig. 1 à 4). La  $\beta$ -MSH ne réagit ni directement ni par inhibition avec l'Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine.

L'ACTH naturelle inhibe la réaction d'immunofluorescence à un taux voisin de celui de l'hormone synthétique.

Le déterminant Ac. s'adresse à la fraction 1-24 biologiquement active de la molécule d'ACTH et ne paraît pas, de ce fait, présenter de spécificité zoologique vis-à-vis des espèces étudiées.

b) Les seconds sont dirigés contre l'ACTH bovine naturelle et sont apparus comme contaminants de sérums de lapins hyperimmunisés contre la prolactine bovine. Seule l'inhibition de l'immunofluorescence par l'ACTH permet la mise en évidence et l'identification de ces Ac.. La  $\beta$ -(1-24) corticotropine n'est pas inhibitrice de la réaction d'immunofluorescence : ainsi, les déterminants Ac. semblent s'adresser à la séquence terminale (25-39) de l'antigène naturel.

Les deux systèmes révèlent les mêmes cellules en immunofluorescence (pl. I).

3° Du point de vue cytologique, les cellules ACTH sont présentes essentiellement dans la *pars distalis* : chez les bovins et les ovins, elles prédominent dans la zone basophile ; elles sont rares et dispersées dans la zone acidophile. Dans les espèces étudiées, elles ont les caractères tinctoriaux habituellement attribués aux cellules gonadotropes LH : en présence de l'association bleu alcian (pH 2,5)- PAS- Orange G, ces cellules sont PAS<sup>+</sup> et bleu alcian<sup>-</sup>, se distinguant ainsi des cellules acidophiles (PAS<sup>-</sup>, bleu alcian<sup>-</sup>) et des cellules à hormone glycoprotidique (bleu alcian<sup>+</sup>, PAS<sup>±</sup>).

Leur morphologie varie dans les espèces étudiées : très irrégulières et s'insinuant entre les cellules voisines, dans l'hypophyse bovine, elles sont régulièrement ovalaires chez les ovins et

les porcins (pl. III). Ces cellules présentent, à l'état normal semble-t-il, une évolution caractéristique, bien visible chez le Porc, dans le sens d'une hypertrophie dégénérative vacuolaire, accompagnée de picnose nucléaire (pl. II).

La surrénalectomie, effectuée chez le Porc, fait disparaître l'affinité de ces cellules pour le PAS et les rend chromophobes ; apprécié par immunofluorescence, le contenu hormonal de ces cellules est réduit.

D'une manière générale, il n'y a pas parallélisme entre l'affinité des cellules corticotropes pour le PAS et l'intensité de la réaction d'immunofluorescence.

4° La recherche des cellules corticotropes en cytologie comparée à l'aide des Ac. précédents a été positive chez les Mammifères (Homme, Lémurien, Miniopère, Rat, Souris, Hérisson...) les Oiseaux (Poule), les Batraciens et les Poissons.

5° La spécificité de la réaction immunologique est discutée quant aux réactions croisées éventuelles avec différents polypeptides (naturels ou synthétiques) apparentés à l'ACTH, en fonction des résultats parus dans la littérature.

6° L'identification des cellules ACTH par immunofluorescence est confrontée aux critères fonctionnels pouvant servir à caractériser la nature corticotrope de ces cellules (surrénalectomie, castration).

7° Les problèmes apparus à l'occasion de cette étude sont exposés.

## INTRODUCTION

En 1951, MARSHALL publie les premières observations relatives à l'identification des cellules corticotropes dans l'hypophyse humaine par immunofluorescence. Les résultats sont critiqués par CRUICKSHANK et CURRIE en 1958. CURRIE (1962), MCGARRY *et al.* (1962, 1964), LEZNOFF *et al.* (1962) publient leurs travaux chez l'Homme. Toute une série de recherches, depuis, se sont efforcées d'apporter une solution satisfaisante : PEARSE et VAN NOORDEN (1963), MOSCA et CHIAPPINO (1964), JARETT *et al.* (1964), (ces derniers sur matériel tumoral humain à activité corticotrope), COSTANZI *et al.* (1965) chez le Bovin, KRACHT *et al.* sur l'Homme, le Lapin, le Chien et le Rat (KRACHT *et al.*, 1965 ; HACHMEISTER et KRACHT, 1965 ; KRACHT *et al.*, 1965, 1966 ; KRACHT et HACHMEISTER, 1966 ; KRACHT *et al.*, 1967 ; BREUSTEDT, 1968), BROZMAN (1967, 1970) sur l'Homme et le Bovin ; RUSSOLO *et al.*, sur le Chien et le Cobaye (RICCI et RUSSOLO, 1968 ; RUSSOLO et RASTRELLI, 1968 ; RUSSOLO *et al.*, 1968 ; RUSSOLO et BET, 1969), SHINO (1967) sur le Rat, HESS *et al.*, (1968) sur le même animal. Nous-même (DUBOIS, 1969 *a*) avons présenté nos résultats sur le Bovin, le Mouton et le Porc. Citons aussi le travail de McKEOWN et VAN OVERBEEKE (1969) sur les cellules corticotropes de Saumon.

Récemment, le problème a été repris par BAKER *et al.* (1970) à l'aide d'anticorps couplés à la peroxydase suivant la technique de NAKANE-PIERCE (1967) appliquée à l'hypophyse (NAKANE, 1968).

1° Si certains de ces travaux ont été effectués sur matériel coupé au cryostat, la grande majorité des études a été réalisée sur des coupes de tissu fixé à l'aide de fixateurs formolés et inclus à la paraffine.

2° Les antigènes utilisés dans la préparation des Ac. ont été d'abord l'ACTH naturelle, surtout porcine. La faible antigénicité de l'hormone, due à son poids moléculaire (environ 4 900) et au pouvoir immunodépresseur de la substance (KASS *et al.*,

1955), ses effets biologiques capables d'entraîner à long terme un déséquilibre fatal à l'animal en cours d'immunisation accroissent la probabilité de réponse aux antigènes contaminant l'ACTH naturelle ; cette présomption a alimenté les discussions concernant les premiers résultats publiés.

3° L'antigénicité de l'ACTH naturelle a été grandement accrue et ses effets secondaires éliminés en la couplant à un support de poids moléculaire élevé, le plus souvent une albumine (McGUIRE *et al.*, 1965 ; VANCE *et al.*, 1968). Par là même se réduisait le rôle possible d'éventuels contaminants.

4° Le recours à des ACTH de synthèse [ $\beta$ -(1-24) et  $\beta$ -(1-39) corticotropine, CIBA, Bâle] associées à un support (physique ou chimique) a éliminé l'interférence possible avec des Ac. contaminants dirigés contre d'autres hormones hypophysaires.

Toutefois, BAKER *et al.* (1970) sur le Rat ont encore recours à la corticotropine porcine naturelle émulsionnée dans l'adjuvant de Freund, comme dans les premiers travaux effectués dans ce domaine.

Nous exposons ci-après nos résultats dans les principales espèces domestiques. Ils ont été obtenus de deux manières, l'une fortuite, l'autre systématisée. Dans le premier cas, l'anticorps est un contaminant de sérum antiprolactine bovine ; dans le second cas, l'Ac. a été préparé à partir de la  $\beta$ -(1-24) corticotropine (Synacthène CIBA).

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude comparée de ces Ac., l'étude cytologique proprement dite faisant l'objet de la deuxième partie.

## Première partie

### ÉTUDE DES ANTICORPS

#### I. — ANTICORPS ANTI $\beta$ -(1-24) CORTICOTROPINE

##### *Matériel et méthodes*

L'Ac. est préparé sur lapin à partir de  $\beta$ -(1-24) corticotropine de synthèse (Synacthène Ciba, Bâle) couplée à la sérumalbumine bovine (BSA) par l'intermédiaire de la glutaraldéhyde selon la technique de VANCE *et al.* (1968).

##### A. — *Préparation de l'antigène.*

- 26 mg de BSA sont dissous dans 2,7 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,2.
- 6 mg de Synacthène sont dissous dans 0,4 ml de soluté salé (ClNa 0,9 p. 100 dans l'eau distillée).
- 1 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 0,02 M (soit 0,2 ml de la solution à 25 p. 100 pour 25 ml) dans le même tampon est ajouté goutte à goutte sur le mélange précédent maintenu en agitation continue pendant 1 heure à la température du laboratoire.
- L'ensemble est dialysé pendant 48 heures en présence de soluté salé.
- Le volume de dialysat est ajusté à 10 ml, réparti en ampoules scellées de 1 ml et conservées à — 18°C.

##### B. — *Préparation de l'anticorps.*

Trois lapins sont inoculés une fois par semaine, 4 semaines de suite, avec une émulsion faite de 1,5 ml d'adjuvant complet de Freund et de 1 ml d'Ag.. L'inoculation est répartie par séries d'injections intradermiques de 0,1 à 0,2 ml sur le dos rasé des sujets.

Après un mois de repos, un rappel par voie veineuse avec l'antigène seul (2 ml) est effectué sous protection d'un antihistaminique (« Phénergan » Specia, 7,5 mg par sujet, par voie veineuse) 15 minutes avant l'injection d'antigène.

Deux saignées de 40 à 50 ml sont pratiquées le 5<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour suivant le rappel ; les sérums, décomplémentés à 56°C pendant 30 minutes, sont conservés glycinés (vol./vol.) à — 20°C.

### C. — Réactions immunologiques.

#### 1. Réaction de précipitation (test de précipitation à l'interface).

Elle est effectuée sur l'Ac. glyciné dilué avec un volume égal de soluté salé.

#### 2. Fixation du Complément.

Elle est réalisée en modifiant la technique de WASSERMAN et LEVINE (1961) et de LEVINE (1967) comme suit :

— Ac.	0,3 ml
— Ag. (à dilution croissante)	0,2 ml
— C' (2 U C' <sub>H50</sub> )	0,2 ml
	1 heure à 37°C
— Hématies sensibilisées	0,4 ml
	1 heure à 37°C

#### 3. Inhibition de la fixation du C'.

L'Ag. inhibiteur est à dilution croissante ; l'Ag. spécifique est à la concentration optimale donnant la fixation maximale du C' en réaction directe.

— Ac.	0,3 ml
— Ag. inhibiteur (à dilution croissante)	0,1 ml
	1 heure à 37°C
— Ag. spécifique (concentration constante)	0,1 ml
— C' (2 U C' <sub>H50</sub> )	0,2 ml
	1 heure à 37°C
Hématies sensibilisées	0,4 ml
	1 heure à 37°C

L'Ac. est généralement utilisé au 1/100, après saturation en présence d'hématies de mouton lavées.

Les hématies sensibilisées sont préparées par mélange à volume égal d'hémolysine (1) à la dilution appropriée et d'une suspension d'hématies de mouton lavées à 1.10<sup>8</sup> hématies/ml.

Le titrage de l'hémolysine et du Complément [sérum lyophilisé de cobaye (1)] est fait au préalable pour chaque lot d'Ac., de C', d'hémolysine et d'hématies.

La réaction d'hémolyse est arrêtée en ajoutant à chaque tube 0,7 ml d'une solution citratée isotonique à pH 7,2, refroidie à 0°C.

Après centrifugation (2 500 t.p.m.) les surnageants sont recueillis et lus au spectrophotomètre à 413  $\mu$ .

#### 4. Réaction d'immunofluorescence (technique indirecte).

Les coupes déparaffinées et réhydratées sont lavées au tampon véronal 0,1 M, pH 7,3, et recouvertes par l'Ac. à la dilution voulue pendant 30 minutes. Après lavage au tampon, les préparations sont traitées pendant le même temps avec des  $\gamma$ -globulines de mouton anti lapin conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (2) (3 microgouttes pour 2 ml de tampon véronal albumineux, à raison de 2,5 mg de BSA par ml), lavées à nouveau, immergées dans une solution de bleu Evans à 0,01 p. 100 (AMBROISE-THOMAS *et al.*, 1966) pendant 10 minutes, et montées à la glycérine tamponnée (glycérine : 9 vol., tampon véronal 0,1 M, pH 8,6 : 1 vol.).

Elles sont examinées avec un microscope Leitz « Ortholux » équipé pour la fluorescence, muni de condenseurs à fond clair et à fond noir, de filtres d'excitation BG 12 et d'un filtre arrêté K 530.

(1) Sérum hémolytique anti hématies de mouton et Complément de cobaye : Institut Pasteur (Paris).

(2) Institut Pasteur (Paris).

Les réactions de contrôle comportent, en plus des essais d'inhibition par l'Ag. spécifique et par les autres hormones hypophysaires : une lame traitée avec du sérum de lapin normal (au lieu de l'Ac. spécifique), et une lame traitée avec les  $\gamma$ -globulines conjuguées seules.

5. *Antigènes utilisés dans les réactions immunologiques.*

Ont été utilisées les substances suivantes :

- Protéine-ACTH bovine, PM 20 000 (1).
- ACTH bovine (1).
- ACTH porcine (Organon : 73 et 140 U/IV/mg).
- ACTH porcine (Clin-Byla : 95 U s/cut./mg).
- Corticotropine bovine brute (préparée selon la technique de BAZEMORE *et al.*, jusqu'au stade inclus de la lyophilisation de la solution dans l'acide acétique N/10, avant passage sur oxycellulose).
- Prolactine bovine NIH P-B<sub>9</sub>.
- Fractions de décharge (« Side-fractions ») de la purification d'ACTH porcine au stade 73 U/mg (réf. : Organon CRF) (2), au stade 140 U/mg (réf. : Organon CMC) (2).
- $\beta$ -(1-24) corticotropine (Synacthène Ciba).
- Sérum-albumine bovine cristallisée (BSA).
- Antigène complexe BSA-Synacthène (couplés par glutaraldéhyde).

*Résultats*

Les trois lapins inoculés ont répondu positivement à la stimulation antigénique et leurs sérums ont montré le même comportement immunologique avec de faibles différences dans les titres. Les résultats exposés concernent le sérum possédant le titre d'Ac. le plus élevé.

1. *Réaction de précipitation* (test de précipitation à l'interface).

TABEAU I

*Anticorps anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine* (saturé par BSA)  
*Réaction de précipitation* (Test de précipitation à l'interface)

Antigènes	Réactions
ACTH bovine .....	—
Protéine ACTH .....	—
Corticotropine bovine brute .....	—
ACTH porcine 73 U .....	—
ACTH porcine 95 U .....	—
ACTH porcine 140 U .....	—
Fraction CMC .....	—
Fraction CRF .....	—
$\beta$ -(1-24) corticotropine .....	—
BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine .....	+++

N. B. : Le taux de BSA nécessaire à la saturation de l'Ac. a été déduit des réactions de fixation du Complément (quantité correspondant à l'excès d'Ag. donnant 0 p. 100 fixation du C').

(1) Dues à l'obligeance du Professeur C. H. Li.

(2) Fractions riches en activité MSH, mais pauvres en ACTH.

2. Réaction de fixation du Complément (fig. 1, tableau 2).

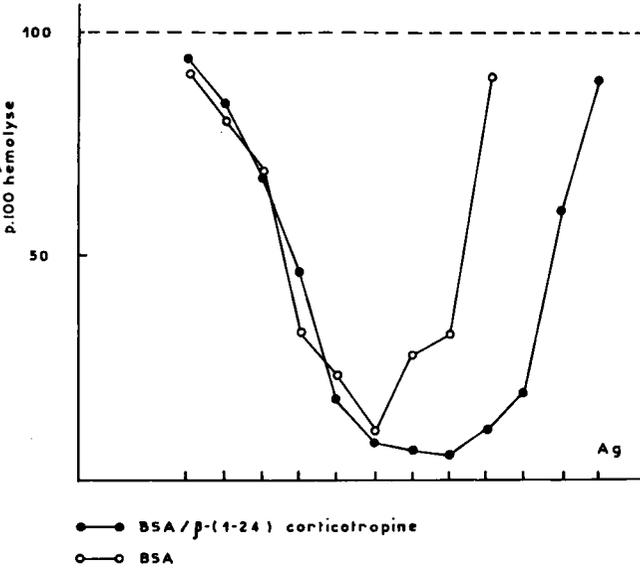


FIG. 1. — Anticorps anti (BSA/β-(1-24) corticotropine) ( non saturé)  
 Fixation du Complément en présence :  
 a) de BSA/β-(1-24) corticotropine  
 b) de BSA seule

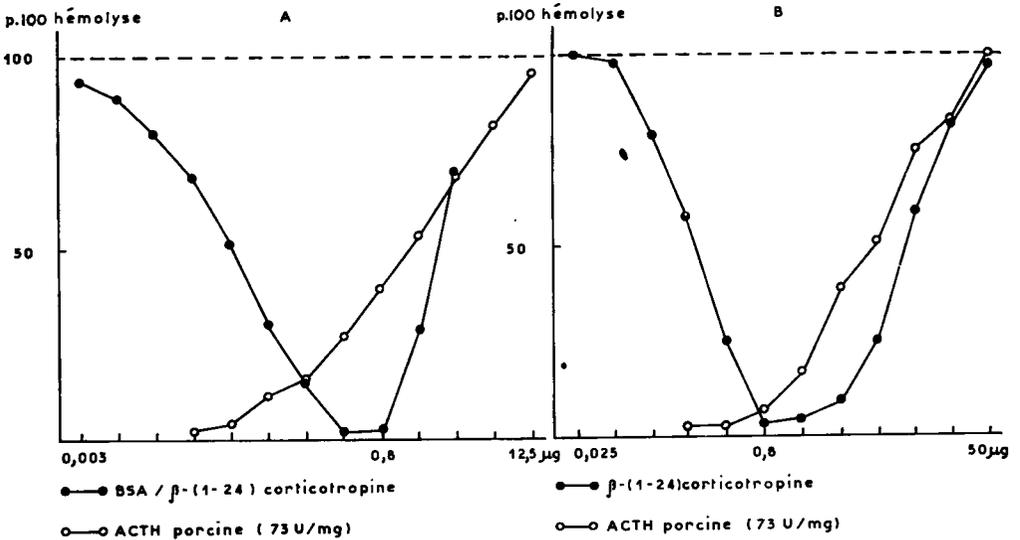


FIG. 2. — Anticorps anti (BSA/β-(1-24) corticotropine)  
 A : Ac. anti BSA/β-(1-24) corticotropine (saturé par BSA)  
 a) Fixation du C' en présence de (BSA/β-(1-24) corticotropine)  
 b) Inhibition de la fixation maximale du C' par l'ACTH porcine (73 U/mg)  
 B : Ac. anti BSA/β-(1-24) corticotropine (non saturé)  
 a) Fixation du C' en présence de β-(1-24) corticotropine  
 b) Inhibition de la fixation maximale du C' par l'ACTH porcine (73 U/mg)

TABLEAU 2

Anticorps anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine (Réf. 26 (25/2) et 7 (25/2))

Fixation du Complément

Anticorps	Antigène	Ac. (Réf. 26)		Ac. (Réf. 7)	
		P. 100 Fixation	Équivalence (1) (mg)	P. 100 Fixation	Équivalence (1) (mg)
Ac. anti BSA/ $\alpha$ -(1-24) corticotropine	BSA	50	0,125	90	0,160
	BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine	100	1,250	100	0,300-2,5
	$\beta$ -(1-24) corticotropine	75	4	100	0,200
	Protéine ACTH bovine	—	—	—	—
	ACTH porcine 78 U	—	—	—	—
	ACTH porcine 95 U	—	—	—	—
Id. (saturé par BSA)	A TH porcine 140 U	—	—	—	—
	BSA	—	—	—	—
	BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine	75	1,250	70	1,300
	$\beta$ -(1-24) corticotropine	100	0,050-6,4	90	0,040-0,320
Id. (saturé par $\beta$ -(1-24) corticotropine)	Corticotropine bovine brute	—	—	—	—
	BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine	75	0,660	100	2,5
	$\beta$ -(1-24) corticotropine	—	—	—	—

(1) Équivalence : quantité d'Ag. nécessaire à la fixation maximale du Complément, rapportée à 1 ml d'Ac, pur, non dilué.

3. Réaction d'inhibition de la fixation du Complément (fig. 2, 3, 4, tableau 3).

TABLEAU 3

*Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine*  
*Inhibition de la fixation du complément*

A. — Fixation du Complément  
 [Ac. BSA/ $\beta$ -(1-24) Corticotropine —  $\beta$ -(1-24) Corticotropine]

Antigènes inhibiteurs	Quantité d'Ag. nécessaire	
	pour 50 p. 100 d'inhibition (mg)	pour 100 p. 100 d'inhibition (mg)
Corticotropine bovine brute .....	6,000	16
ACTH porcine 73 U .....	0,400	2
ACTH porcine 95 U .....	0,200	2
ACTH porcine 140 U .....	0,250	16

B. — Fixation du Complément  
 [Ac. BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine (saturé par BSA) — BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine]

Antigènes inhibiteurs	Quantité d'Ag. nécessaire	
	pour 50 p. 100 d'inhibition (mg)	pour 100 p. 100 d'inhibition (mg)
Protéine ACTH bovine .....	0,700	16
ACTH porcine 73 U .....	0,100	4
Fraction CRF .....	1,5	8
Fraction CMC .....	5	70

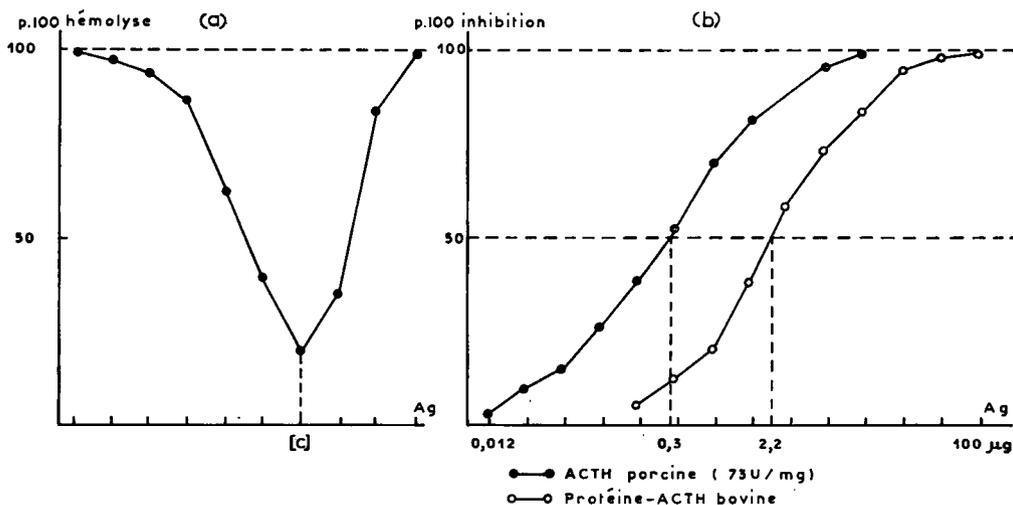


FIG. 3. — *Anticorps anti (BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine) saturé par BSA*  
 a) Fixation du Complément en présence de (BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine) :  
 (C) concentration optimale d'Ag. donnant la fixation maximale  
 b) Inhibition de la fixation par l'ACTH porcine (73 U/mg)  
 et la protéine ACTH bovine

## 4. Réaction d'immunofluorescence.

Les quantités d'Ag. nécessaires à l'inhibition de la fluorescence des cellules corticotropes ont été déterminées sur coupes d'hypophyse de bovins. Malgré la précision limitée, due au caractère subjectif de la méthode, les résultats ont été significatifs.

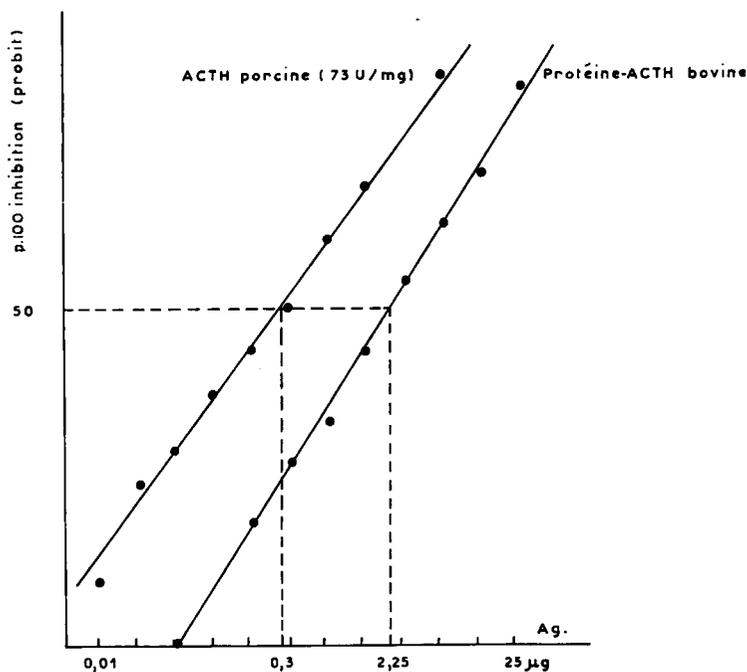


FIG. 4. — Courbes d'inhibition précédentes après linéarisation par transformation (log. Probit)

— En abscisse : log de la concentration en antigène  
— En ordonnée : p. 100 d'hémolyse (Probit)

TABLEAU 4

*Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine*  
Quantité d'Ag. nécessaire pour inhiber la réaction d'immunofluorescence  
[rapportée à 1 ml d'Ac. (saturé par BSA) pur, non dilué]

Antigènes inhibiteurs	Doses inhibitrices (mg)
$\beta$ -(1-24) corticotropine	0,240
ACTH porcine 73 U	0,450
Corticotropine bovine brute	30-60
Fraction CRF	7,25
Fraction CMC	30

(En raison des très faibles quantités disponibles, l'ACTH et la protéine ACTH bovine n'ont pu être testées.)

a) *Effet de la dilution de l'Ac.*

L'intensité de la fluorescence ne présente pas d'atténuation pour une dilution au 1/160 de l'Ac. (saturé par BSA).

b) *Quantité d'Ag. nécessaire à l'inhibition de la réaction d'immunofluorescence* [rapportée à 1 ml d'Ac. (saturé par BSA) pur, non dilué (cf. tableau 4)].

*Discussion*1. *L'hormone naturelle à l'état conjugué.*

Couplée à la sérumalbumine par la carbodiimide (McGUIRE *et al.*, 1965) ou la glutaraldéhyde (VANCE *et al.*, 1968), elle s'est montrée, selon ces auteurs, régulièrement antigénique sans effets secondaires : les propriétés biologiques de l'hormone sont en effet inhibées par l'association covalente à la sérumalbumine.

Toutefois, la carbodiimide présente des inconvénients comme agent couplant :

- le complexe est insoluble,
- il est moins antigénique : le C' est fixé à un taux moindre par les Ac. ainsi obtenus que par les Ac. anti ACTH/BSA/glutaraldéhyde,
- la carbodiimide réagit avec de nombreux groupes fonctionnels de l'Ag. tandis que la glutaraldéhyde limiterait son action aux fonctions  $\alpha$ -aminées de la lysine et  $\alpha$ -aminées terminales (QUIOCHO et RICHARDS, 1966 ; VANCE *et al.*, 1968).

2. *L'hormone de synthèse  $\beta$ -(1-24) corticotropine, à l'état non conjugué.*

En solution émulsionnée dans l'adjuvant complet de Freund, elle ne s'est pas montrée antigénique chez le Lapin entre les mains de FLEISCHER *et al.* (1965) ; FELBER *et al.* (1966) ; SHIINO (1967) ; RUSSOLO et RASTRELLI (1968) et GELZER (1968).

FISCHER *et al.* (1965) ; HACHMEISTER et KRACHT (1965) ; FELBER et ASHCROFT (1965) obtiennent cependant des résultats positifs sur le même animal.

Chez le Cobaye, des Ac. ont été préparés à partir de l'Ag. non conjugué par FELBER (1963), FELBER et ASHCROFT (1965, *loc. cit.*), FELBER *et al.* (1966, *loc. cit.*), IMURZ *et al.* (1967), LANDON *et al.* (1967, 1968).

Nous n'avons pas tenté d'immuniser des sujets d'expérience avec cet Ag. non conjugué.

3. *A l'état conjugué.*

RUSSOLO et RASTRELLI (1968, *loc. cit.*) obtiennent une bonne réponse en Ac. avec la  $\beta$ -(1-24) corticotropine couplée à la para-amino benzylcellulose.

Par couplage avec la sérumalbumine en présence de carbodiimide, GELZER n'obtient un taux détectable d'Ac. que sur un sujet (sur 4 immunisés).

L'Ag. couplé à la sérumalbumine bovine par la glutaraldéhyde nous a donné une meilleure réponse (avec un schéma d'immunisation différent). Les trois lapins immunisés ont un taux d'Ac. permettant la fixation du C' à 100 p. 100 en présence de 2 U C' <sub>H50</sub> pour une dilution de l'Ac. au 1/100 après 4 séries d'injections hebdomadaires (associées au Freund complet) et 1 rappel par voie veineuse 1 mois après la dernière série. Le procédé d'immunisation par émulsions multiples (WEIR, 1967) a abouti au bout de 8 jours à des Ac. anti BSA, précipitants, mais ne fixant pas le C'.

4. *La nature de l'agent couplant et du complexe* paraît influencer sur le comportement de l'Ac. :

a) *La  $\beta$ -(1-24) corticotropine couplée à la para-amino benzylcellulose* induit des Ac. précipitant la  $\beta$ -(1-24) corticotropine et l'ACTH bovine (RUSSOLO et RASTRELLI, *loc. cit.*) contrairement aux Ac. obtenus avec le même antigène couplé à la sérumbumine par carbodiimide ou glutaraldéhyde.

b) *Les Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine couplés à la sérumbumine par la glutaraldéhyde* fixent le C' en présence de la  $\beta$ -(1-24) corticotropine (cf. Supra). Ceci s'oppose aux résultats obtenus par VANCE *et al.*, d'une part, avec un Ac. anti BSA-ACTH/glutataldéhyde (absence de fixation du C' en présence de l'Ac. et de l'ACTH seule) et par GELZER, d'autre part [absence de fixation du C' en présence de l'Ac. anti RSA <sup>(1)</sup>  $\beta$ -(1-24) corticotropine/carbodiimide].

## II. — ANTICORPS ANTI ACTH CONTAMINANT LE SÉRUM ANTI PROLACTINE

### *Matériel et méthodes*

#### A. — *Préparation de l'Ac.*

Le schéma d'immunisation diffère de celui indiqué pour le précédent, en ce que :

1° Les injections ont été faites sous-cutanées et non intradermiques.

2° Les rappels ont eu lieu à 6 semaines ou 2 mois d'intervalle avec l'Ag. émulsionné dans l'adjuvant de Freund complet, sur une période deux ans environ.

#### B. — *Antigènes utilisés dans les réactions immunologiques.*

Ce sont les mêmes que précédemment.

### *Résultats*

#### i. *Réaction de précipitation (test de précipitation à l'interface).*

TABLEAU 5

*Anticorps anti ACTH contaminant le sérum anti prolactine bovine (NIH P-B<sub>2</sub>)  
Réaction de précipitation (Test de précipitation à l'interface)*

Antigènes	Réactions
Protéine ACTH bovine .....	+
ACTH bovine .....	—
Corticotropine bovine brute .....	+++
ACTH porcine 73 U .....	—
ACTH porcine 95 U .....	—
ACTH porcine 140 U .....	—
$\beta$ -(1-24) corticotropine .....	—
BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine .....	—
Fraction CMC .....	+
Fraction CRF .....	+

(<sup>1</sup>) RSA : Rabbit Serum Albumine.

## 2. Fixation du Complément (fig. 5, tableau 6).

TABLEAU 6

*Anticorps anti ACTH contaminant le sérum anti prolactine bovine (NIH P-B<sub>2</sub>)  
Fixation du Complément (cf. fig. 5)*

Antigènes	Taux de fixation (p. 100)	Quantité d'antigène correspondant	
		à l'équivalence (mg)	à l'hémolyse 50 p. 100 (mg)
Prolactine .....	100	0,100	0,020
BSA/ $\beta$ -(1-24) corticotropine .....	—	—	—
$\beta$ -(1-24) corticotropine .....	—	—	—
ACTH porcine 73 U .....	—	—	—
ACTH bovine .....	(Courbe incomplète)		1,650
Protéine ACTH bovine .....	100	1,650	0,400
Corticotropine bovine brute .....	100	0,400	0,160

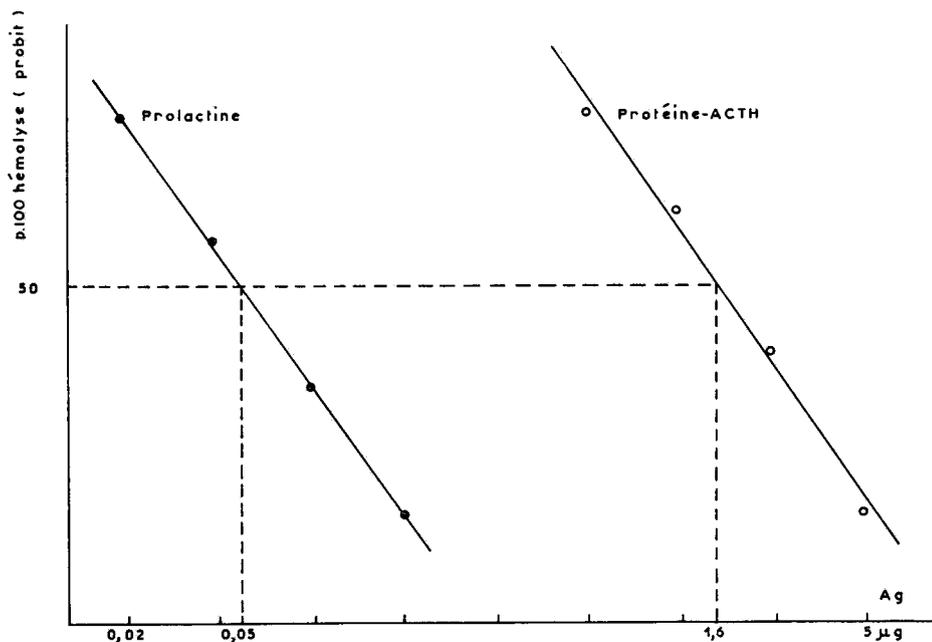


FIG. 5. — Mise en évidence et titrage du contaminant prolactine dans la protéine ACTH de Li

- En abscisse : log de la concentration en antigène (standard : Prolactine NIH-P-B<sub>2</sub>)
- En ordonnée : p. 100 d'hémolyse (Probit)

## 3. Inhibition de la fixation du C'.

a) La saturation de l'Ac. anti prolactine par la corticotropine brute inhibe la fixation du C' en présence du couple (Ac. anti prolactine-prolactine).

b) La saturation de l'Ac. anti prolactine par la prolactine inhibe la fixation du C' en présence du couple (Ac. anti prolactine-corticotropine bovine brute).

#### 4. Immunofluorescence.

a) *Mise en évidence de l'Ac. anti ACTH.*

Étudiée en immunofluorescence sur fond noir avec une coloration de contraste au bleu Evans, une préparation d'hypophyse bovine traitée par l'Ac. anti prolactine montre deux familles cellulaires très distinctes :

1° en lumière blanche et fond noir, l'une est faite de plages cellulaires caractéristiques à cytoplasme très réfringent. En UV, leur fluorescence paraît *jaune* ;

2° l'autre est faite de cellules isolées, non réfringentes, disposées entre les plages précédentes ou dans la zone centrale basophile dépourvue de cellules à prolactine : leur fluorescence est *verte*.

La saturation de l'Ac. par des doses appropriées de prolactine ne laisse subsister que le deuxième type cellulaire ; la saturation de l'Ac. par des doses appropriées d'ACTH (bovine ou porcine) ne montre que le premier type identique aux cellules mammothropes mises en évidence antérieurement par d'autres lots d'Ac. anti prolactine (DUBOIS, 1969 *b*).

Dans ces conditions, les cellules non réfringentes à fluorescence verte ont été identifiées aux cellules corticotropes, sous réserve d'inventaire.

La fluorescence jaune des cellules à prolactine peut être rattachée à un *effet de filtre* exercé par le bleu Evans : ce colorant possède une affinité marquée pour certaines structures (telle la lame élastique interne des artères) et parmi celles-ci pour les granulations somatotropes et mammothropes ; ce tropisme est vraisemblablement dirigé contre les phospholipides connus pour être présents à ce niveau (LYCETTE *et al.*, 1970). A ce titre, dans le cas présent, il recouvre les granulations de prolactine qui ont fixé la fluorescéine de l'Ac. conjugué. On conçoit que sa fluorescence rouge joue le rôle de filtre d'arrêt à l'égard de la partie verte du spectre d'émission de la fluorescéine, ne laissant passer que la partie jaune de ce spectre. Cet aspect n'existe pas pour les cellules corticotropes : la dissociation des deux familles cellulaires est ainsi facilitée.

b) *Rôle de la dilution de l'Ac.*

TABLEAU 7

*Anticorps anti ACTH contaminant le sérum anti prolactine bovine (NIH P-B<sub>2</sub>)  
Rôle de la dilution*

Dilution	Intensité de la réaction
1/12,5	++++
1/25	+++
1/50	+
1/100	—

c) *Inhibition de l'immunofluorescence des cellules corticotropes.*

TABLEAU 8

*Anticorps anti ACTH contaminant le sérum anti prolactine bovine (NIH P-B<sub>2</sub>)  
Inhibition de l'immunofluorescence des cellules corticotropes*

Antigènes inhibiteurs	Dose inhibitrice (rapportée à 1 ml d'Ac. pur, non dilué)
	(mg)
Prolactine .....	2
$\beta$ -(1-24) corticotropine .....	> 2,5 (taux supérieur non testé)
ACTH porcine 73 U .....	0,100
ACTH bovine .....	0,006
Protéine ACTH bovine .....	0,025
Corticotropine bovine brute .....	0,120
Fraction CRF .....	0,025
Fraction CMC .....	0,050

*Discussion*1. *Antigénicité de l'ACTH naturelle.*

A l'état non conjugué, l'antigénicité de l'hormone, quoique faible et variable, est hors de doute (FISHMAN *et al.*, 1959; MCGARRY *et al.*, 1962; FELBER, 1963; IMURA *et al.*, 1965, 1967; FLEISCHER *et al.*, 1965; FELBER et ASHCROFT, 1965; SPARKS *et al.*, 1965; FLEISCHER *et al.*, 1966; LANDON *et al.*, 1967, 1968; AUBERT et FELBER, 1969; BAKER *et al.*, 1970).

Ainsi, chez le Cobaye, 15 sujets sur 80 immunisés par AUBERT et FELBER ont un taux élevé d'Ac. doués d'une activité satisfaisante.

Nos essais d'immunisation sur lapins avec l'ACTH porcine en solution émulsionnée dans l'adjuvant complet de Freund ont échoué. De même, la fixation d'ACTH par la glutaraldéhyde sur hématies de mouton injectées par voie veineuse un jour sur deux pendant 3 semaines s'est révélée inefficace.

Par contre, sur deux sujets immunisés, le contaminant ACTH de la prolactine NIH P-B<sub>2</sub>, s'est révélé antigénique sans les effets secondaires associés aux doses habituellement utilisées dans l'immunisation par l'ACTH non conjuguée (MCGARRY *et al.*, 1962); cela est dû vraisemblablement à la très faible quantité d'ACTH injectée simultanément avec la prolactine.

2. *La réalité de l'existence d'Ac. anti ACTH.*

Dans les sérums anti prolactine testés elle ressort aussi de la comparaison de résultats obtenus, en immunofluorescence, avec ces Ac. et l'Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine.

Si l'on effectue la réaction d'immunofluorescence sur deux coupes sériées contiguës, l'une traitée avec un Ac. anti prolactine (saturé par la prolactine), d'autre par l'Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine, la comparaison de champs homologues montre la

même cellule, présente sur les deux coupes contiguës, rendue fluorescente par l'un et l'autre Ac. (pl. I).

### 3. La présence d'un contaminant ACTH dans la prolactine.

Elle s'explique par les propriétés physico-chimiques de ces deux hormones et les conditions d'extraction à partir du matériel hypophysaire.

Comme la prolactine (et la STH), l'ACTH est soluble en milieu acide. La technique de BAZEMORE *et al.* (1953) de préparation de l'ACTH par le méthanol acétique à chaud extrait dans les premiers temps un important contaminant prolactine aisément décelable par fixation du C' ou réaction de précipitation. La protéine ACTH et l'ACTH bovines extraites par LI contiennent également de la prolactine.

Inversement, la technique de COLE et LI (1955) d'extraction de la prolactine par l'acétone acide isole simultanément dans un premier temps l'ACTH et la prolactine qui sont séparées par précipitation sélective à pH 3 en solution NaCl. Cette précipitation n'élimine pas la possibilité d'un faible contaminant entraîné en même temps que la fraction spécifique au cours de la séparation, d'autant plus que la purification ultérieure de la prolactine en milieu dichloro-acétique est aussi propre à la conservation de l'ACTH.

### 4. Les réactions de précipitation, de fixation et d'inhibition de la fixation du C'.

Obtenues avec les Ac. anti prolactine elles sont dues uniquement à la prolactine contaminant les Ag. réagissants.

L'inhibition par la prolactine de la réaction (Ac. anti prolactine-protéine ACTH) (a) et la fixation du complément en présence du couple (Ac. anti prolactine-prolactine) dans la zone d'excès d'antigènes (b) s'expriment par deux courbes identiques (fig. 6). La linéarisation (par transformation log Probit) des deux courbes sigmoïdes [ $D_0$  <sup>(1)</sup> =  $f(\log Ag.)$ ] montre leur parallélisme.

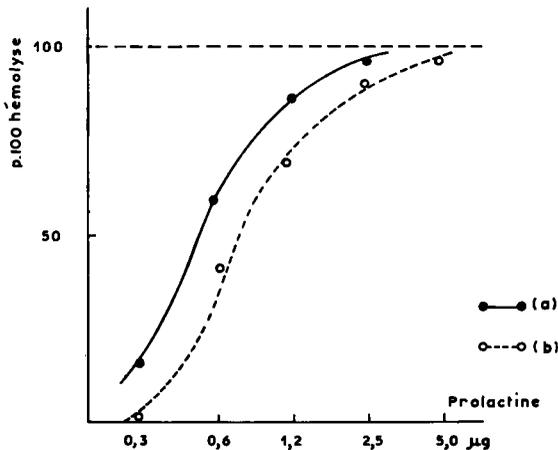


FIG. 6. — Inhibition par la prolactine de la fixation du Complément en présence du couple (Ac. anti prolactine-protéine-ACTH (à concentration optimale) (courbe a) Comparaison avec la courbe de fixation du Complément (Ac. anti prolactine-prolactine) dans la zone d'excès d'Ag (courbe b)

(1)  $D_0$  : densité optique des surnageants ou p. 100 d'hémolyse.

Si la réaction (Ac. anti prolactine-protéine ACTH) et son inhibition par la prolactine concernaient un contaminant de la prolactine apparenté à la protéine ACTH, la quantité de prolactine nécessaire à l'inhibition de la réaction (Ac. anti prolactine-protéine ACTH) devrait être très supérieure et les deux courbes (a) et (b) présenter un décalage important.

La comparaison des courbes de fixation du C' donne un *taux de prolactine* (exprimé en prolactine bovine NIH P-B<sub>2</sub>) de 3 p. 100 pour la protéine ACTH bovine et de 0,4 p. 100 dans l'ACTH bovine, contre 12 p. 100 dans la préparation de corticotropine bovine brute.

En se basant sur les doses d'ACTH, de protéine ACTH et de prolactine bovines inhibitrices de la fluorescence des cellules ACTH, le *contaminant ACTH* de la prolactine bovine NIH P-B<sub>2</sub> (20 U/mg) apparaît ainsi de l'ordre de 0,3 p. 100. (A titre indicatif, COLÈ et LI font état d'un contaminant ACTH, dosé par le test de SAYERS *et al.* (1948) de 0,05 p. 100 pour une prolactine à 35 U/mg préparée selon leur méthode.)

Les fractions CMC et CRF en présence de l'Ac. anti prolactine montrent un anneau de précipitation, mais ne fixent pas le C' en présence du même Ac. aux doses testées : ce paradoxe s'explique par les différences qui sont censées exister entre prolactine bovine (et ovine) et prolactine porcine.

#### CONCLUSIONS

*Les Ac. anti ACTH contaminant les Ac. anti prolactine n'ont pu être mis en évidence autrement que par immunofluorescence* : ils ne sont pas précipitants ; la fixation du C' observée en présence de l'ACTH et de la protéine ACTH bovines ne s'adresse qu'au contaminant prolactine de cet Ag. ; des hématies passivement sensibilisées à l'ACTH porcine n'ont pas été hémagglutinées.

L'aptitude à inhiber cette réaction d'immunofluorescence est maximale pour l'ACTH bovine ; puis viennent, par ordre décroissant, la protéine ACTH bovine et l'ACTH porcine. La  $\beta$ -(1-24) corticotropine n'est pas inhibitrice.

Ainsi :

1° L'Ac. anti ACTH présent dans les sérums anti prolactine testés s'adresse non pas à la cupule protidique de la protéine ACTH, mais à une séquence appartenant à la fraction polypeptidique biologiquement active de cette molécule, c'est-à-dire à l'ACTH.

2° La  $\beta$ -(1-24) corticotropine n'étant pas inhibitrice et la spécificité d'espèce faisant intervenir une différence très marquée dans les quantités réactionnelles des ACTH bovine et porcine, le déterminant antigénique de l'ACTH concerné correspond vraisemblablement à la séquence C terminale responsable de cette spécificité, c'est-à-dire 25 à 39.

La possibilité d'existence d'Ac. de ce type ne peut être négligée et les réactions d'inhibition de l'immunofluorescence ont, de ce chef, une importance au moins égale aux autres réactions immunologiques qui cherchent à mettre en évidence par des méthodes directes l'existence de réactions antigènes-anticorps spécifiques.

Le comportement comparé des deux types d'Ac. anti ACTH étudiés est résumé dans le tableau 9.

TABLEAU 9

*Quantités relatives d'antigènes nécessaires à l'inhibition  
de la réaction d'immunofluorescence*

	Ac. Antiprolactine (Réf. 7262)	Ac. BSA-Synacthène (saturé par BSA)
<u>Corticotropine bovine brute</u> Protéine ACTH bovine	5	—
<u>Corticotropine bovine brute</u> ACTH bovine	20	—
<u>Protéine ACTH bovine</u> ACTH bovine	4	—
<u>ACTH porcine (73 U)</u> ACTH bovine	17	—
<u>Corticotropine bovine brute</u> ACTH porcine (73 U)	1	100
<u><math>\beta</math>-(1-24) corticotropine</u> Corticotropine bovine brute	> 20*	0,01
<u><math>\beta</math>-(1-24) corticotropine</u> ACTH porcine (73 U)	> 25*	0,5
<u>Corticotropine bovine brute</u> Fraction CRF	5	4-8
<u>Corticotropine bovine brute</u> Fraction CMC	2,5	1-2
<u>Fraction CRF</u> ACTH porcine (73 U)	0,25	16
<u>Fraction CMC</u> ACTH porcine (73 U)	0,5	66

N. B. : La précision est très faible de l'ordre de  $\pm 50$  p. 100 en raison du caractère subjectif de l'appréciation de l'inhibition.

\* Taux supérieurs non testés.

## Deuxième partie

### I. — MISE EN ÉVIDENCE DES CELLULES CORTICOTROPES

#### I. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

Les hypophyses de bovins, moutons et porcs dans des états physiologiques variés sont prélevées immédiatement après l'abattage, fixées dans le mélange d'ELFTMAN (1957) ou au Bouin Hollande sans acide acétique, additionné de 10 p. 100 d'une solution saturée de sublimé, et incluses à la paraffine.

Deux truies ont été surrénalectomisées (1) ; la première supplémentée à la cortisone (50 mg de DOCA/jour) a été abattue douze jours plus tard ; la seconde, non supplémentée, est sacrifiée quatre jours après l'intervention. Les hypophyses ont été prélevées et préparées comme précédemment.

Après la réaction d'immunofluorescence, les coupes sont lavées et colorées. Les champs remarquables sont comparés photographiquement en immunofluorescence et après coloration. Ont été utilisées les techniques suivantes : bleu alcian (pH 1,5-2,5), PAS, Orange G (HERLANT, 1960), fuchsine paralaldéhyde, Orange G (ELFTMAN, 1959 ; GABE, 1963), trichrome de SLIDDERS, coloration de BROOKES (1968).

## II. — RÉSULTATS

D'une manière générale, dans les trois espèces étudiées, les cellules réagissantes sont fortement fluorescentes ; elles sont abondantes dans la *pars distalis*. Quelques rares cellules ont été parfois observées à la limite de la *pars intermedia* et de la *pars nervosa*, mais ni la *pars intermedia*, ni la *pars tuberalis* dans leur ensemble ne sont fluorescentes ; nous n'avons pas observé de fluorescence au niveau de la couche glandulaire tapissant la face inférieure de l'éminence médiane et qui prolonge à ce niveau la *pars tuberalis*. D'autre part, il semble y avoir une *évolution* des cellules corticotropes, marquée par l'*hypertrophie cellulaire* et un *aspect lacunaire du cytoplasme* ; ce dernier caractère s'apprécie aussi bien en fond noir, qui montre une baisse de la densité optique du cytoplasme, que sur coupes colorées.

### A. — Chez les Bovins

Les cellules corticotropes sont surtout abondantes dans la zone basophile ; dans les aires latérales, on les trouve dispersées et isolées parmi la masse des cellules acidophiles. Elles ont le plus souvent une forme irrégulière et envoient des prolongements cytoplasmiques entre les cellules voisines jusqu'au contact de capillaires sinusoides. Le noyau est volumineux atteignant et dépassant fréquemment 10 à 12  $\mu$  de diamètre, et pourvu d'un unique nucléole ; la chromatine est peu abondante. Le cytoplasme, d'une manière générale, est peu dense et, sur les cellules les plus volumineuses, comporte souvent de multiples et fines vacuoles dont le contenu n'est pas fluorescent. La réaction au PAS est positive, mais la faible densité du cytoplasme tend à lui donner un aspect chromophobe.

L'analogie cytologique entre ces cellules, très caractéristiques par leur morphologie, leur dimension et celle de leur noyau, et les grandes cellules à cytoplasme dense, PAS<sup>+</sup> et colorées par le bleu d'alizarine acide du tétrachrome de HERLANT (que nous avons présumées être les cellules FSH dans une publication antérieure) est frappante. Toutefois, ces cellules à cytoplasme *dense* PAS<sup>+</sup> (qui ne représentent pas la majorité des cellules ACTH) ne se sont pas trouvées concernées par les contrôles effectués.

Les observations faites sur 4 sujets pathologiques (vaches présentant une dégénérescence kystique des ovaires) montrent une hyperplasie manifeste, dans les 4 cas, des cellules corticotropes qui sont abondantes au niveau des plages de cellules chromophobes.

### B. — Chez le Mouton

La répartition préférentielle des cellules corticotropes au niveau de la zone tubérale, basophile, correspond à celle observée chez les Bovins. Dans les aires acidophiles, elles sont rares et dispersées.

(1) Dues à l'obligeance de notre collègue FÈVRE, auquel nous exprimons nos remerciements.

Elles se présentent avec une forme régulière, ovulaire. Ce sont des cellules volumineuses (12-13  $\mu$ ), mais n'atteignent jamais les dimensions des cellules corticotropes des bovins. Le noyau vésiculeux possède un volumineux nucléole. La chromatine est rare. Le cytoplasme fortement PAS<sup>+</sup> a une densité variable : tantôt finement granuleux et homogène, tantôt lacunaire ou finement vacuolisé, mais toujours fortement chromophile.

Ces cellules tranchent nettement, par leur forte affinité pour le PAS, sur l'ensemble des cellules cyanophiles de la zone basophile, et ne présentent pas l'aspect presque chromophobe d'une grande partie des cellules corticotropes des Bovins. De plus, il y a un bon parallélisme entre coloration et réaction en immunofluorescence.

### C. — Chez le Porc

Il y a une grande diversité dans la cytologie des cellules corticotropes du Porc et l'unicité de ce type cellulaire repose sur l'absence de coloration par le bleu alcian et son affinité pour le PAS ; il se sépare ainsi, comme chez les Bovins et le Mouton, des cellules somatotropes et mammotropes, d'une part, des cellules gonadotropes et thyrotropes d'autre part.

Ces cellules apparaissent généralement en petits groupes ou isolées, mais aussi en plages confluentes. Leur forme est régulièrement ovulaire ; leur dimension, variable, de 10 à 12  $\mu$ .

Dans les cas favorables, on peut observer, *sur la même préparation*, toute une série de stades évolutifs, aussi bien en immunofluorescence qu'après coloration.

En fluorescence, on distingue ainsi des petites cellules (10  $\mu$ ) dont l'auréole cytoplasmique, réduite, est intensément fluorescente ; d'autres, tout aussi fluorescentes, dont le rapport Cyt./N. s'accroît régulièrement. A partir d'une certaine dimension, le contenu cytoplasmique réagissant se limite à un piqueté fluorescent bien visible sur le fond cytoplasmique intensément coloré en rouge par le bleu Evans. Au terme de l'évolution, ce piqueté se raréfie pour former un mince liséré cytoplasmique à la périphérie de la cellule tandis que, parallèlement, la densité du cytoplasme, appréciée en fond noir, diminue.

Les colorations de contrôle montrent que toutes ces cellules sont bleu alcian et PAS<sup>+</sup>, mais s'il y a une bonne simultanéité entre l'immunofluorescence et l'affinité pour le PAS, *il n'y a absolument pas de parallélisme entre l'intensité des deux réactions* : la coloration par le PAS persiste quand la fluorescence décroît ; à la limite, les cellules PAS<sup>+</sup> montrent un cytoplasme peu dense, très lacunaire, donnant l'aspect de multiples et fines vacuoles, et un noyau picnotique au terme de l'évolution. A ce stade ultime, on observe fréquemment de multiples et fines inclusions hématoxylinophiles semblables à des lysosomes.

Le trichrome de SLIDDERS associé à une coloration nucléaire à l'hématoxyline ferrique assure une meilleure superposition entre l'immunofluorescence et la réaction colorée : l'affinité pour la fuchsin acide des cellules corticotropes est parallèle à l'intensité de la fluorescence. Notamment, les grandes cellules hypertrophiées à noyau picnotique ne sont plus fuchsinophiles et sur leur cytoplasme coloré en grisé se détachent les inclusions hématoxylinophiles.

Après oxydation au permanganate sulfurique, l'aldéhyde fuchsin associée à l'Orange G colore les cellules corticotropes à la phase d'état, mais moins intensément que les cellules gonadotropes.

La répartition des cellules corticotropes ne paraît pas préférentiellement limitée à une zone donnée du parenchyme hypophysaire. Par contre, il semble exister un « gradient de sénescence » très accusé de la périphérie vers le centre de la *pars distalis* : les cellules hypertrophiées à noyau picnotique prédominent dans la zone centrale, tandis que les cellules à la phase de croissance, très fluorescentes et chromophiles, sont plus abondantes, à la périphérie. Ce « gradient » ne s'observe pas sur la plupart des hypophyses des porcs castrés que nous avons étudiées.

Ainsi, il semble que la cellule corticotrope évolue en plusieurs phases au cours d'un processus à *sens unique* :

— *une période de croissance*, allant du début de la différenciation à la phase d'état, où la cellule est très active, fluorescente et chromophile ;

— *une phase d'état*, dans laquelle la cellule présente un cytoplasme dense, très fluorescent, PAS<sup>+</sup> et un noyau vésiculeux au nucléole volumineux ;

— *une phase de « sénescence »*, caractérisée par l'hypertrophie dégénérative de la cellule (20-25  $\mu$ ) dont le cytoplasme devient lacunaire, ne réagit plus en immunofluorescence, quoique PAS<sup>+</sup>, et par la picnose nucléaire.

Nous avons observé ces aspects différents simultanément sur une même coupe provenant d'hypophyses de sujets normaux ou soumis à des traitements expérimentaux : tels le verrat et la truie gestante ou la truie hystérectomisée, mais non chez le porc castré où les cellules à la phase d'état représentent de très loin l'image la plus fréquemment rencontrée, le stade dégénératif étant exceptionnel.

Cet aspect évolutif (et non cyclique) des cellules corticotropes chez le Porc rend difficile toute interprétation fonctionnelle : il y a là toute une étude à reprendre.

#### *Effets de la surrénalectomie.*

Les résultats en sont remarquables ; que ce soit l'animal supplémenté ou non, l'aspect observé est le même : la disparition quasi totale des cellules corticotropes morphologiquement identifiables.

— *En immunofluorescence*, on observe un grand nombre de cellules modérément fluorescentes, réduites par rapport à celles de sujet normal, aux formes apparemment irrégulières en raison d'une fluorescence répartie sans homogénéité dans le cytoplasme ; mais il n'y a pas réellement hyperplasie de ce type cellulaire : les cellules réagissant en immunofluorescence sont moins abondantes que celles que l'on observe par exemple chez le castrat.

— *Sur la coloration de contrôle*, un grand nombre de cellules apparaissent PAS<sup>-</sup> et faiblement cyanophiles. Un examen attentif les distingue cependant des cellules gonadotropes à cytoplasme finement granuleux, également cyanophiles : leur cytoplasme est formé de l'empilement de très fines lamelles cyanophiles, à la limite de la visibilité, mieux perçues sur les pièces fixées au Bouin Hollande sublimé, et représentant un ergastoplasme hypertrophié : il s'agit de cellules hyperactives, dégranulées en totalité, dont la phase d'accumulation du produit synthétisé est supprimée. Nous avons observé un aspect analogue des cellules à prolactine dans l'hypophyse de truie déconnectée chirurgicalement de l'hypothalamus (Dubois, obs. pers.)

*Les cellules corticotropes en cytologie comparée.*

La présence de constituants cytoplasmique immunologiquement apparentés à l'ACTH a été recherchée par immunofluorescence dans différentes classes de vertébrés.

Nous avons obtenu des résultats positifs dans la quasi totalité des cas inventoriés :

— Chez les Mammifères :  
l'Homme

une variété de Lémurien (en collaboration avec M. PERRET)<sup>1</sup>.

le Miniopère (en collaboration avec A. PERYRE)<sup>1</sup>

le Rat

la Souris (en collaboration avec J. DOERR-SCHOTT)<sup>1</sup>

le Hérisson (en collaboration avec N. MOREAU)<sup>1</sup>.

— Chez les Oiseaux : la Poule, où les cellules réagissantes, localisées exclusivement au lobe céphalique, sont AF<sup>+</sup> sans oxydation permanganique préalable (en collaboration avec J. GUILLAUME)<sup>1</sup>.

— Chez les Batraciens :

le Triton marbré (en collaboration : DOERR-SCHOTT et DUBOIS, 1970)

la Grenouille (en collaboration avec J. DOERR-SCHOTT)

— Chez les Poissons : le carassin doré (en collaboration avec BILLARD)<sup>1</sup>.

## DISCUSSION

Les descriptions des cellules ACTH dans les trois espèces étudiées sont rares.

*Chez les Bovins*

— Partant d'un sérum humain provenant d'un patient traité par l'ACTH naturelle, COSTANZI *et al.* (1965) présentent comme corticotropes des cellules qui, à la lecture de leur travail, sont en fait des cellules acidophiles (prolactine semble-t-il). (Nous avons commis initialement la même erreur chez le Porc avec un Ac. préparé à partir d'ACTH porcine non conjuguée : en raison de la présence de prolactine, plus antigénique, en faible quantité dans l'ACTH naturelle, un Ac. anti prolactine s'était développé et les cellules mammotropes mises en évidence.)

— BROZMAN (1967) identifie par immunofluorescence les cellules ACTH, mais ne définit pas les caractères cytologiques de ces cellules. Leur morphologie s'accorde avec celle que nous avons observée dans cette espèce.

— HEATH (1970) passe sous silence l'identification et la description des cellules ACTH.

*Chez le Mouton*

MIKAMI et DAIMON (1968), par la technique du Bleu Alcian/ acide performique-PAS-Orange G, identifient les cellules ACTH comme des cellules PAS<sup>+</sup> et

(<sup>1</sup>) Observations personnelles, non publiées.

Bleu Alcian<sup>-</sup>. Associé au critère fonctionnel de la surrenalectomie, leur résultat est en accord avec nos données.

*Chez le Porc*

Les descriptions (pour le moins très imprécises) de BUGNON (1963), BUGNON et RACADOT (1963) n'ont aucun rapport avec les caractères cytologiques des cellules ACTH telles que nous les avons identifiées.

Par contre, HERLANT et ECTORS (1969) séparent des cellules gonadotropes une population de cellules PAS<sup>+</sup> et Bleu Alcian<sup>-</sup> dont ils font des cellules MSH, et qui correspondent aux cellules ACTH qui viennent d'être décrites.

II. — PLACE DES CELLULES ACTH  
DANS LA CYTOLOGIE DE L'HYPOPHYSE

Après coloration au Bleu Alcian-PAS-Orange G, classiquement, la répartition des catégories cellulaires se fait selon le schéma suivant (HERLANT, 1960).

TABLEAU 10

	Orange G	PAS	Bleu Alcian	Chromophobes
Cellules à prolactine .....	+	—	—	
Cellules somatotropes .....	+	—	—	
Cellules gonadotropes				
{ LH .....	—	+	—	
{ FSH .....	—	+	+	
Cellules thyrotropes .....	—	—	+	
Cellules corticotropes .....	—	—	—	+

Cependant, les résultats obtenus chez l'Homme (MARSHALL, 1951 ; KRACHT *et al.*, 1965 ; BROZMAN, 1967) avaient montré l'affinité des cellules ACTH pour le PAS dans cette espèce. A l'heure actuelle, dans la majorité des espèces que nous avons testées, les caractères PAS<sup>+</sup> et Bleu Alcian<sup>-</sup> sont de règle, à l'intensité près ; l'affinité pour l'aldéhyde fuchsine sans oxydation préalable s'observe aussi dans un certain nombre d'espèces : Rat (BAKER *et al.*, 1970) ; Poule (DUBOIS, obs. pers.), Triton (DOERR SCHOTT et DUBOIS, 1970).

La réaction à l'égard du PAS pourrait être imputable, théoriquement, à la sérine terminale de l'ACTH : comportant une fonction aminée et une fonction hydroxyle supportées par deux carbones contigus, elle serait sensible à l'oxydation par l'acide periodique. Cependant :

1° une telle réaction de la sérine n'a jamais pu être démontrée expérimentalement (GANTER et JOLLÈS, 1969),

2° elle ne s'accorde pas avec les divergences existant entre l'affinité des cellules ACTH pour le PAS et la réaction en immunofluorescence.

On est ainsi amené à concevoir une glycoprotéine spécifique, PAS<sup>+</sup>, associée à la présence de l'ACTH, au sein des cellules corticotropes, mais sans lien stœchiométrique évident. Cette hypothèse a été soutenue par PEARSE et VAN NOORDEN (1963 *a* et *b*) à propos des cellules de CROOKE-RUSSEL chez l'Homme.

Ces résultats reposent le problème :

1° des critères d'identité des deux types cellulaires gonadotropes réputés élaborer séparément les gonadostimulines hypophysaires,

2° du rapport étroit entre fonction corticotrope et fonction de reproduction, car des critères fonctionnels lient étroitement l'activité de ces cellules, considérées à tort comme gonadotropes, à la physiologie génitale.

### III. — VALEUR DE L'IMMUNOCYTOLOGIE DANS L'IDENTIFICATION DES CELLULES CORTICOTROPES

Elle est liée à :

- la spécificité de la réaction immunologique,
- la corrélation avec les critères fonctionnels.

#### A. — Spécificité de la réaction immunologique

La présence des cellules immunofluorescentes au niveau de la *pars distalis* et leur absence dans la *pars intermedia* exclut une réaction éventuelle entre MSH et les Ac. anti ACTH utilisés.

Les réactions immunologiques présentées par les différents polypeptides du groupe ACTH vis-à-vis des Ac. anti ACTH de diverses natures ont apporté des précisions dans ce sens.

De ce point de vue, on peut séparer :

- les ACTH
- les MSH
- les LPH
- les composés synthétiques apparentés aux précédents

Interviennent :

- la composition chimique du produit,
- la structure des complexes obtenus par couplage (physique ou chimique) de l'hormone à un support.

1° Aucun travail à notre connaissance n'a exposé les propriétés immunologiques de la LPH vue sous cet aspect : il n'est pas possible, à l'heure actuelle, de la « situer » tant du point de vue antigénique que cytologique.

2° La structure de l'ACTH et de la MSH a fait l'objet de nombreux travaux (cf. revue par EVANS *et al.*, 1965 ; LOWRY et CHADWICK, 1970). Les analogies et les différences ressortent des tableaux 11 et 13.

TABLEAU I I

Séquence commune à ACTH, MSH, LPH  
(LOWRY et CHADWICK, 1970)

ACTH (39 a-aminés)	...	Met. Glu. His. Phe. Arg. Try. Gly.	...
	...	4 ————— 10	...
LPH Mouton ( $\gamma$ - 58 a-aminés) ( $\beta$ - 90 a-aminés)	...	47 ————— 53	...
$\beta$ -MSH (18 a-aminés)	{ Porc Bovin Cheval	...	7 ————— 13
$\beta$ -MSH	Homme	...	11 ————— 17
$\alpha$ -MSH	{ Porc Bovin Cheval	...	4 ————— 10

a) L'ACTH, la LPH et la MSH comportent une séquence commune de 7 acides aminés.

... Met. — Glu. — His. — Phe. — Arg. — Tryp. — Gly. ..

b) Les diverses ACTH dont la séquence en acides aminés est connue ont deux parties communes, les séquences 1 à 24 et 34 à 39. La fraction 1 à 24 comprenant l'N terminal de la molécule d'ACTH est spécifique de l'activité biologique. La fraction 25 à 39, comportant l'acide aminé C-terminal, supporte la spécificité liée à l'espèce (EVANS *et al*, 1965).

TABLEAU I 2

Comparaison des structures d'ACTH provenant de 4 espèces différentes  
(Extrait de *The Pituitary Gland*, HARRIS et DONOVAN)

	...	25	26	27	28	29	30	31	32	33	...
ACTH porcine	...	Asp.	Gly.	Ala.	Glu.	Asp.	Glu.	Leu.	Ala.	Glu.	...
										NH <sub>2</sub>	
ACTH ovine	...	Ala.	Gly.	Glu.	Asp.	Asp.	Glu.	Ala.	Ser.	Glu.	...
										NH <sub>2</sub>	...
ACTH bovine	...	Asp.	Gly.	Glu.	Ala.	Glu.	Asp.	Ser.	Ala.	Glu.	...
							NH <sub>2</sub>				
ACTH humaine	...	Asp.	Ala.	Gly.	Glu.	Asp.	Glu.	Ser.	Ala.	Glu.	...

TABLEAU 13

*Relations entre la structure de différentes MSH et la structure partielle*

(Séquence 1-19) de l'ACTH

(Extrait de *The Pituitary Gland*, HARRIS et DONOVAN)

ACTH : (Porc, Mouton, Bœuf)	H —	Ser. Tyr. 1	Ser. Tyr. 2	Ser. 3	Met. 4	Glu. 5	His. 6	Phe. 7	Arg. 8	Try. 9	Gly. 10	Lys. 11	Pro. 12	Val. 13	Gly. 14	Lys. 15	Arg. 16	Pro. 17	18	19			
	α-MSH : (Porc, Bœuf, Cheval)	CH <sub>3</sub> CO Ser. 1	Tyr. 2	Ser. 3	Met. 4	Glu. 5	His. 6	Phe. 7	Arg. 8	Try. 9	Gly. 10	Lys. 11	Pro. 12	Val. 13									
β-MSH : (Porc)	H — Asp. 1	Glu. 2	Gly. 3	Pro. 4	Tyr. 5	Lys. 6	Met. 7	Glu. 8	His. 9	Phe. 10	Arg. 11	Try. 12	Gly. 13	Ser. 14	Pro. 15	Lys. 16	Asp. 17	—	OH				
	H — Asp. 1	Glu. 2	Gly. 3	Pro. 4	Tyr. 5	Lys. 6	Met. 7	Glu. 8	His. 9	Phe. 10	Arg. 11	Try. 12	Gly. 13	Ser. 14	Pro. 15	Lys. 16	Asp. 17	—	OH				
β-MSH : (Cheval)	H — Asp. 1	Glu. 2	Gly. 3	Pro. 4	Tyr. 5	Lys. 6	Met. 7	Glu. 8	His. 9	Phe. 10	Arg. 11	Try. 12	Gly. 13	Ser. 14	Pro. 15	Lys. 16	Asp. 17	—	OH				
	β-MSH : H —	Ala. 1	Glu. 2	Lys. 3	Lys. 4	Asp. 5	Glu. 6	Gly. 7	Pro. 8	Tyr. 9	Arg. 10	Met. 11	Glu. 12	His. 13	Phe. 14	Arg. 15	Try. 16	Gly. 17	Ser. 18	Pro. 19	Lys. 20	Asp. 21	—

c) L'ACTH et MSH possèdent en commun la séquence des 13 premiers acides aminés ; mais la sérine de la MSH est modifiée par une fonction acétyle terminale.

3° *Le comportement des divers Ac. anti ACTH* dépend des sites contre lesquels sont dirigés les déterminants Ac. Les études quantitatives (inhibition de la fixation du C' ou courbe de précipitation étudiée par radioimmunologie) ont apporté des données précises sur la localisation et l'étendue des déterminants antigéniques.

a) *Vis-à-vis de la  $\beta$ -(1-24) corticotropine* : GELZER (*loc. cit.*) sépare, par la première de ces méthodes, deux familles de polypeptides parmi les Ag. synthétiques qu'il étudie.

— l'une comprend les inhibiteurs qui contiennent l'extrémité C-terminale de la  $\beta$ -(1-24) corticotropine, notamment :

$\beta$ -(11-24) corticotropine	
$\beta$ -(17-24)	—
$\beta$ -(1-24)	—
$\beta$ -(17-39)	—

— l'autre comprend

• d'une part, les peptides ACTH correspondant à la partie C-terminale de la molécule

$\alpha$ -MSH (acétyl $\beta$ -1-13-corticotropine amide)
$\beta$ -(1-10) corticotropine
$\beta$ -(1-16) corticotropine amide

• d'autre part, les fragments ne contenant ni le C-terminal ni l'N-terminal de la corticotropine :

$\beta$ -(4-10) corticotropine	et	$\beta$ -(5-10)
$\beta$ -(11-16)	—	
$\beta$ -(25-39)	—	

— Les premiers sont d'excellents inhibiteurs : la capacité d'inhibition est maximale pour la  $\beta$ -(11-24) corticotropine, deux fois moindre pour la  $\beta$ -(17-24) corticotropine et quatre fois moindre pour la  $\beta$ -(1-24) corticotropine et la  $\beta$ -(17-39) corticotropine (rapport exprimé sur une base molaire).

— La deuxième famille a une capacité inhibitrice très réduite ou nulle. Ainsi, les Ac. induits par la  $\beta$ -(1-24) corticotropine (conjuguée à la sérum albumine) réagissent exclusivement avec l'extrémité terminale de l'hormone synthétique, le site essentiel se situant entre le C<sub>11</sub> et le C<sub>24</sub>.

b) *Vis-à-vis de l'ACTH*, utilisée comme antigène à l'état non conjugué :

— IMURA *et al.* (1965, 1967) montrent que les polypeptides dont la longueur de la chaîne va de 20 à 39 ont sensiblement la même activité biologique, mais présentent des différences marquées dans les réactions immunologiques. Ils montrent aussi que l'Ac. anti ACTH obtenu avec les hormones non conjuguées réagit avec la partie de la molécule ACTH qui ne contient pas la séquence commune avec l' $\alpha$ -MSH.

Comme dans le cas précédent, la séquence correspondant à la moitié C-terminale est essentielle et plus antigénique que la fraction N-terminale, et l'altération chimique de cette dernière a peu ou pas d'effets sur son activité immunologique (IMURA *et al.*, *loc. cit.* ; FLEISHER *et al.*, 1965, 1966 ; SPARKS *et al.*, 1965), contrairement à ce qui affecte la première (IMURA *et al.*, 1967).

Cette partie C-terminale étant connue pour être responsable de la spécificité d'espèce (EVANS *et al.*, *loc. cit.*), il est prévisible que l'ACTH porcine se montre moins inhibitrice que l'ACTH bovine vis-à-vis d'Ac. préparés à partir du matériel bovin. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse (cf. tableau 8).

— LANDON *et al.* (1968) montrent qu'avec des Ac. préparés à partir de l'hormone libre (naturelle ou synthétique) (LANDON *et al.*, 1967 *a* et *b*), les peptides contenant une séquence d'acides aminés identiques à la séquence antigénique propre à l'Ac. ont un taux d'activité immunologique spécifique (calculé sur une base molaire) égal à celui de l'Ag. et donnent des courbes des compétitions radioimmunologiques parallèles à celle obtenue avec l'Ag. Par contre, les peptides qui ne contiennent qu'une partie de la séquence précédente sont moins actifs immunologiquement et les courbes obtenues montrent un taux de compétition diminué, associé à une pente réduite.

— En accord avec ces conclusions, les fragments C-terminaux,  $\alpha$ -(17-39) ACTH et  $\alpha$ -(25-39) ACTH, étudiés en radio-immunologie vis-à-vis d'Ac. préparés à partir d'ACTH non conjuguée se montrent compétitifs à des taux élevés par rapport à l' $\alpha$ -(1-39) ACTH, contrairement à l' $\alpha$ -(1-16) ACTH et l' $\alpha$ -(1-24) ACTH (AUBERT et FELBER, *loc. cit.*).

4° L'ACTH se comporte différemment selon qu'elle est utilisée comme antigène à l'état non conjugué, ou sous forme de complexes macromoléculaires.

a) A l'état non conjugué, les Ac. que l'on obtient sont plus spécifiques que ceux induits par l'ACTH couplée à la sérumalbumine par carbodiimide (MCGUIRE *et al.*, *loc. cit.*), ou par l'ACTH adsorbée sur carboxyméthylcellulose ou gel d'alumine (AUBERT et FELBER, *loc. cit.*). Sur notre matériel, les Ac. anti ACTH naturelle non conjuguée, présents dans les sérums anti prolactine de lapin hyperimmun ne sont pas inhibés par des doses de  $\alpha$ -(1-24) corticotropine 500 fois supérieures à la quantité minimale nécessaire d'ACTH bovine, mais deux fois moins seulement de  $\beta$ -(1-24) corticotropine que d'ACTH porcine sont nécessaires à l'inhibition de l'Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine couplée à la sérum albumine.

b) L'ACTH conjuguée à la sérum albumine par carbodiimide (MCGUIRE *et al.*, 1965) entraîne la formation d'Ac. qui réagissent non seulement avec l'ACTH, mais aussi avec  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH et l'eicosapeptide ACTH ; tous ces Ag. inhibent la fixation du C' par l'Ac. en présence de RSA-ACTH<sup>(1)</sup>. Par contre, un anticorps anti RSA- $\alpha$  MSH se montre beaucoup plus spécifique et ne réagit pas avec les Ag. hétérologues ( $\beta$ -MSH, ACTH, eicosapeptide ACTH) (tabl. 14).

Nous n'avons pas de données concernant le comportement d'Ac. obtenus par couplage de l'ACTH à la sérumalbumine par la glutaraldéhyde (VANCE *et al.*, *loc. cit.*) vis-à-vis d'autres antigènes que l'ACTH.

(1) RSA-ACTH : ACTH couplée à la sérumalbumine de lapin (rabbit).

*En résumé.*

1. Les Ac. obtenus avec la  $\beta$ -(1-24) corticotropine sont spécifiques de la séquence supportant l'activité biologique dans la molécule d'ACTH et plus spécialement dirigés contre l'extrémité C-terminale ; ils ne font pas intervenir la spécificité d'espèce dans les réactions immunologiques obtenues sur des hypophyses de diverses provenances.

TABLEAU 14  
Réaction croisée entre ACTH et MSH  
(McGUIRE *et al.*, 1965)

Fixation du Complément		
Antigènes	Anticorps	
	As. RSA — $\alpha$ -MSH	As. RSA — ACTH
RSA — MSH .....	+	+
RSA — ACTH .....	—	++

Inhibition de la fixation du Complément		
Antigènes inhibiteurs	Couple As. RSA — $\alpha$ -MSH	Couple As. RSA — ACTH
	RSA — $\alpha$ -MSH	RSA — ACTH
$\alpha$ -MSH .....	+	+
$\beta$ -MSH .....	—	+
ACTH .....	—	+
Eicosapeptide ACTH .....	—	+

2. *Vis-à-vis de la pars intermedia*, la réactivité des Ac. obtenus dépend des relations chimiques existant entre la  $\beta$ -MSH des espèces étudiées, d'une part, et la  $\beta$ -(1-24) corticotropine et l'ACTH bovine, d'autre part.

Il était possible de prévoir une réaction absente (ou très atténuée) dans les espèces où la structure de la  $\beta$ -MSH est connue (Homme, Cheval, Bœuf, Porc, Mouton), puisque la séquence commune à l'ACTH, à la  $\beta$ -(1-24) corticotropine, à l' $\alpha$ -MSH et à la  $\beta$ -MSH (c'est-à-dire la séquence 4-10 de l'ACTH) est peu ou pas inhibitrice de l'Ac.  $\beta$ -(1-24) corticotropine.

3. L'absence de réactions entre les Ac. préparés avec l'ACTH non conjuguée et l' $\alpha$ -MSH donnait à penser qu'il devait en être ainsi, sur ces mêmes espèces, dans les réactions d'immunofluorescence faisant intervenir des Ac. anti ACTH bovine non conjuguée.

Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec ce que la théorie laissait prévoir.

#### IV. — L'IDENTIFICATION DES CELLULES CORTICOTROPES ET LES CRITÈRES FONCTIONNELS

1° Il est bien établi que la *surrénalectomie* s'accompagne d'une hyperactivité corticotrope au niveau de l'hypophyse. Celle-ci se caractérise, chez le Rat, non pas tellement par une élévation du taux d'ACTH hypophysaire ( $\times 1$  à 1,5 par rapport au sujet normal) que par un « turn-over » considérablement accru ( $\times 30$ ) (GEMZELL *et al.*, 1951).

Les données cytologiques observées sur l'hypophyse de porc : disparition quasi totale du contenu cytoplasmique PAS<sup>+</sup>, réduction marquée de l'intensité de la fluorescence, développement de l'ergastoplasme, sont en accord avec l'interprétation de cellules hyperactives.

2° Chez le Rat mâle, la *castration* accroît l'ACTH hypophysaire (KITAY, 1963 ; BAKER *et al.*, 1970) ; le développement des cellules corticotropes chez le Porc castré, et surtout la rareté des formes « de sénescence », vont dans le même sens d'une activité corticotrope accrue. De nouveaux faits soulèvent cependant des difficultés d'interprétation.

##### I. — L'incorporation de thymidine <sup>3</sup>H dans l'hypophyse (GOSBEE *et al.*, 1970) un mois après *surrénalectomie*

Chez le Rat, avec ou sans supplémentation quotidienne par le cortisol (inhibiteur de l'hyperactivité corticotrope) il y a un parallélisme entre l'incorporation de <sup>3</sup>H, limitée aux cellules de la *pars intermedia* et le niveau de sécrétion corticotrope : augmentation de l'index de marquage après *surrénalectomie*, et diminution de ce taux après administration de cortisol. Par contre, aucune modification du taux plasmatique ou hypophysaire de MSH n'est observée. Selon ces auteurs, il y aurait une relation fonctionnelle entre la *pars intermedia* et la sécrétion d'ACTH.

Cependant, SIPERSTEIN (1963) chez le Rat *surrénalectomisé* constate l'incorporation de glycine tritiée, administrée le 8<sup>e</sup> jour après l'intervention, dans une catégorie cellulaire de l'antehypophyse. Il y a là une divergence qui n'a pas encore reçu d'interprétation.

Nous avons observé chez le Lémurien (PERRET et DUBOIS, obs. pers.) une différence dans la *pars intermedia* selon le niveau d'activité des cellules corticotropes de la *pars distalis* : lorsque celles-ci apparaissent très actives, il y a parallèlement, au sein de la *pars intermedia*, un certain nombre de cellules réagissant plus vivement en immunofluorescence que le reste de la *pars intermedia* ; rien de tel ne se voit quand le niveau d'activité des cellules corticotropes est réduit.

Dans les espèces que nous avons étudiées, nous avons observé des îlots de cellules corticotropes au sein de la *pars intermedia* ; leur hyperplasie après *surrénalectomie* n'est pas impensable, mais cela n'explique pas l'absence de réaction des cellules ACTH de la *pars distalis* dans l'observation de GOSBEE *et al.*

Chez le Triton, le traitement par la métopirone, dont les effets sont réputés identiques à la *surrénalectomie*, provoque l'augmentation du nombre et de la dimension des cellules vacuolisées PAS<sup>+</sup> sous-jacentes à la bandelette dorsale corticotrope

précédemment identifiée (DOERR-SCHOTT et DUBOIS, 1970), tandis que ni la *pars intermedia*, ni les cellules réagissant en immunofluorescence avec l'anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine ne sont affectées d'une manière aussi évidente (DOERR-SCHOTT, obs. pers.).

2. *réaction autoimmune massive au niveau de la pars intermedia sur lapins immunisés avec la 17-39 ACTH PHIFER et SPICER, (1970)*

Le sérum de ces lapins utilisé en immunocytologie sur hypophyses de rat, lapin, porc et vache se fixe sur la *pars intermedia* en totalité. L'absorption par le  $\beta$ -MSH bovine n'inhibe pas la réaction, sauf chez le Lapin où celle-ci est très atténuée.

En fait, on peut interpréter ces résultats comme l'absence d'une immunité croisée entre la (17-39) ACTH et l'ACTH endogène du lapin, en raison : 1° : de la spécificité zoologique associée à cette fraction (17-39) ; 2° : du fait que la séquence commune aux différentes ACTH et liée à la fraction (1-24), support de l'activité biologique, manque à la (17-39) ACTH.

D'autre part, l'existence d'un groupement

...Prol (19) — Val. (20) — Lys. (21)...

en bout de chaîne sur le (17-39) ACTH et le fragment terminal

...Lys. (11) — Prol. (12) — Val. (13)...

dans l' $\alpha$ -MSH évoquent la possibilité d'un site antigénique commun responsable de la réaction entre l'Ac. anti (17-39) ACTH et l' $\alpha$ -MSH de la *pars intermedia*. L'incapacité pour le  $\beta$ -MSH de neutraliser cet Ac. s'expliquerait par le caractère très restrictif des réactions propres à l' $\alpha$ -MSH par rapport à la  $\beta$ -MSH (cf. Supra) ; cette conception, purement hypothétique, reste toutefois à démontrer.

## CONCLUSION

Les problèmes qui découlent des résultats exposés sont de plusieurs ordres :

1° Il convient de préciser le déterminisme et les modalités de l'évolution que nous avons cru observer dans les cellules corticotropes du Porc :

a) la coexistence de phases différentes implique-t-elle un processus de différenciation et d'évolution *continue*, ou y a-t-il des impulsions *périodiques* analogues aux « ondes de spermatogenèse » ?

b) quelle est la signification de la progression centripète de la « sénescence » des cellules ACTH ?

c) quelle est la raison de la différence observée entre le castrat, où les images de « sénescence » font pratiquement défaut, et le mâle normal, où elles abondent ?

2° Ce dernier point, associé aux observations faites en cytologie comparée (qui seront détaillées ailleurs) montre le rapport étroit entre la fonction corticotrope et la physiologie génitale : c'est ainsi que, d'une manière générale, la dualité des cellules gonadotropes repose sur l'observation de deux types cellulaires dont l'activité s'accroît d'une manière concomitante avec celle de l'une ou l'autre des fonctions gonadotropes ; or, dans plusieurs espèces parmi celles que nous avons étudiées, l'identi-

cation en tant que cellule gonadotrope du type LH de l'un de ces types cellulaires est fautive, car il s'agit, sans doute possible, de cellules ACTH, réagissant avec l'Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine.

3° Peut-on séparer par immunocytologie les cellules élaborant l'ACTH de celles sécrétant MSH ou LPH ? Y a-t-il des cellules élaborant MSH dans la *pars distalis*, quand l'hypophyse possède une *pars intermedia* ? Quel est le siège de la sécrétion de LPH ?

L'absence de réaction de la *pars intermedia* vis-à-vis de l'Ac. révélant les cellules corticotropes de la *pars distalis* répond en partie à cette question. Mais les rapports existant entre l'activité biologique des différents polypeptides du groupe ACTH (1-24 ACTH, 1-39 ACTH,  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH, LPH) et les résultats paradoxaux associés à la surrénalectomie pose la question de l'adaptation du parenchyme hypophysaire (*pars distalis* et *pars intermedia*) à un dérèglement de la fonction corticotrope : le métabolisme des glucides et des lipides associe ACTH, MSH et LPH ; l'aldostérone et le métabolisme des électrolytes sont influencés par l'ACTH (PALMORE *et al.*, 1970) qui interfère avec le système rénine-angiotensine (BIGLIERI *et al.*, 1970) ; la régulation des électrolytes sanguins et les mouvements de l'eau dans l'organisme sont liés et ils ont des rapports avec l'activité de la *pars intermedia* (LEGATT, 1963).

La même cellule est-elle capable de s'adapter à la synthèse de ces différents peptides en fonction des besoins de l'organisme ? Si oui, ces activités de synthèse sont-elles simultanées ou apparaissent-elles successivement, d'une manière échelonnée dans le temps ? GESCHWIND (1968) a souligné les rapports existant dans les « codes » présidant aux synthèses cellulaires des différentes hormones polypeptidiques du groupe ACTH. Il est tentant d'imaginer la plasticité d'un type cellulaire *unique*, élaborant des hormones *différentes*, mais possédant des caractères communs dus à un certain agencement du code génétique qui contrôle leur synthèse, et de faire appel, pour rendre compte de cette plasticité, aux centres supra-hypophysaires et à leur spécialisation dans l'élaboration des facteurs de décharge spécifiques (qui seraient aussi des inducteurs de synthèse).

Une telle hypothèse a été également émise en ce qui concerne le groupe d'hormones glycoprotidiques (TSH, LH, FSH).

Dans ce cas, doit-on réduire l'activité de l'hypophyse, comme le pense GESCHWIND, à celle de trois familles cellulaires, l'une élaborant prolactine et STH, la deuxième les trois hormones glycoprotidiques (TSH, LH, FSH), la 3<sup>e</sup>, l'ensemble des polypeptides apparentés à l'ACTH ? Y a-t-il 3 types de cellules souches, ou un seul type indifférencié s'orientant vers l'une de ces 3 catégories, ou autant de lignées prédéterminées qu'il y a d'hormones hypophysaires ?

On en revient ainsi au problème fondamental de la différenciation cellulaire au niveau de la glande pituitaire et de son déterminisme : le recours aux techniques *in vitro* (cultures cellulaires), l'isolement et la purification des facteurs hypothalamiques de différenciation (vraisemblablement très proches des « facteurs de décharge », sinon identiques) associés à la sensibilité des dosages radioimmunologiques et de l'immunocytologie utilisés comme instruments de contrôle, mettent aujourd'hui à la portée du chercheur la solution de ce problème.

## SUMMARY

THE ADRENOCORTICOTROPHIN-PRODUCING CELLS  
OF CATTLE, SHEEP AND PIG PITUITARY GLANDS  
IMMUNOFLUORESCENT LOCALIZATION AND CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS

1. The current paper presents immunocytochemical identification of corticotrophic cells with regard to previous literature.

2. The following antibodies were used :

a). Rabbit antibodies against  $\beta$ -(1-24) synthetic corticotrophin linked with bovine serum-albumine (BSA) by means of glutaraldehyde.

b). Antibodies against natural bovine adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which were observed to contaminate an anti-prolactin serum (NIH-P-B<sub>3</sub>).

The two antibodies distinguished the same cells from the *pars distalis*. Bovine  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone (MSH) did not react to anti- $\beta$ -(1-24) corticotrophin antibody either by precipitation and complement fixation or by inhibition of the fixation. No immunofluorescent reaction of the *pars intermedia* was noticed for the species investigated.

The natural bovine-ACTH antibody could only be located by the immunofluorescence reaction and was identified only by inhibitory reactions in the presence of specific antigens.

3. ACTH cells were only located in the *pars distalis* in the bovine ovine and porcine pituitary, they were mainly located in the basophil area and sparse in the acidophil area. In the three species investigated, ACTH cells had the staining properties that have usually been attributes to LH cells ; with combined Alcian blue (pH 2.5) — PAS<sup>-</sup> orange-G staining, they were PAS-positive and Alcian blue-negative, this distinguishable from acidophil cells (PAS<sup>-</sup>, Alcian blue—) and glycoprotein hormone cells (Alcian blue +).

The morphological traits of ACTH cells varied depending on the species. Bovine cells were irregular-shaped and inserted between other cells ; ovine and porcine cells were oval shaped and regular (see plate III). Porcine ACTH cells occasionally showed degenerating micro vacuolar enlargement and nuclear picnosis (see plate II) as the end of their evolution.

The PAS chromophilia of ACTH cells was not maintained in adrenalectomized pigs. The hormonal cell contents as estimated by immunofluorescence was scarce.

Generally speaking, there was no relationship between PAS-philic of ACTH cells and the intensity of the immunofluorescent reaction.

4. ACTH cell identification by means of the two described antibodies was performed in Man, in the lemur, bat, rat, mouse, hedgehog, hen, amphibians and fishes.

5. The specificity of the immunoreaction is discussed in view of contingent cross reactions with various natural or synthetic polypeptides related to ACTH.

## ADDENDUM

Depuis la rédaction de ce travail, 1<sup>o</sup> le comportement de la  $\beta$ -MSH bovine synthétique a été étudié vis-à-vis de l'Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine : la  $\beta$ -MSH ne fixe pas le Complément en présence de l'Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine et n'inhibe pas la fixation du C' en présence de l'Ac. et de l'Ag. homologue. 2<sup>o</sup> les sites d'élaboration respectifs de ACTH,  $\alpha$  et  $\beta$ -MSH ont été précisés et font l'objet d'un travail à paraître dans Z. für Zellforschung und mikroskopische Anatomie.

## REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos remerciements.

- 1° A la Société Ciba qui nous a fourni les antigènes synthétiques nécessaires à notre étude,
- 2° Au National Institut of Health, Bethesda (Dr. WILHELMI) pour les différents standards hormonaux mis obligeamment à notre disposition,
- 3° A la Société Organon qui nous a fourni les ACTH naturelles (porcine),
- 4° Aux Laboratoires Clin-Byla (Dr. STOLIAROFF) pour leur fourniture en antigènes hormonaux.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMBROISE-THOMAS P., GARIN J. P., RIGAUD A., 1966. Amélioration de la technique d'immunofluorescence par l'emploi de contre-colorants. Applications aux toxoplasmes. *Presse Méd.*, **74**, 2215-2216.
- AUBERT M. C., FELBER J. P., 1969. Studies on ACTH binding antibodies : characterization of immunological specificities. *Acta Endocr. (Kbh)*, **82**, 521-536.
- BAKER B. L., PEK S., MIDGLEY A. R. Jr., GERSTEN B. E., 1970. Identification of the corticotroph cell in rat hypophyses with peroxidase-labeled antibody. *Anat. Rec.*, **166**, 557-568.
- BAZEMORE A. W., RICHTER J. W., AYER D. E., FINNERTY J., BRINK N. G., FOLKERS K., 1953. Pituitary hormones. IV. The preparation of potent concentration of corticotropin and corticotropin- $\beta$ . *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 1949-1959.
- BIGLIERI E. G., STOCKIGT J. R., SCHAMBERLAN M., LEE T., GANONG W. F., 1970. Subsidiary influence on deoxycorticosterone production. *J. Clin. Invest.*, **49**, Suppl. 9 a, n° 30.
- BREUSTEDT H. J., 1968. Zur immunhistologischen ACTH-lokalisierung in der Ratten hypophyse. *Endokrinologie*, **53**, 1-19.
- BROOKES L. P., 1968. A stain for differentiating two types of acidophil cells in the rat pituitary. *St. Techn.*, **43**, 41-42.
- BROZMAN M., 1967. Histochemical localization of ACTH and TSH in the human hypophyse. *Acta Histochem.*, **26**, 261-270.
- BROZMAN M., 1970. Immunohistochemical localization of hormones in the human adenohypophysis. *Rev. Czechosl. Méd.*, **16**, 1-15.
- BUGNON C., 1963. Les types cellulaires de la *pars distalis* de l'adénohypophyse chez le Porc, leur modification dans divers états endocriniens : castration, gestation, lactation. *Arch. Anat. Histol. Embryol.*, **56**, 395-407.
- BUGNON C., RACADOT J., 1963. Les types cellulaires du lobe antérieur de l'hypophyse chez le Porc. *C. R. Soc. Biol.*, **158**, 1882-1886.
- COLE R. D., LI C. H., 1955. Studies on pituitary lactogenic hormone. XIV. A simplified procedure of isolation. *J. Biol. Chem.*, **213**, 197-201.
- COSTANZI G., COSTANZI-LANGER M., MASALA C., POZZUOLI R., 1965. Ricerche istoimmunologiche sulle cellule ACTH produttrici nella ipofisi bovina. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, **41**, 782-784.
- CRUICKSHANK B., CURRIE A. R., 1958. Localization of tissue antigens with the fluorescent antibody technique : application to human anterior pituitary hormones. *Immunology*, **1**, 13-26.
- CURRIE A. R., 1962. *Ciba Found. Coll. on Endocrin.*, **14**, 379.
- DOERR-SCHOTT J., DUBOIS M. P., 1970. Les cellules corticotropes de l'hypophyse de triton. *C. R. Acad. Soc.*, Paris, **271**, 1534-1536.
- DUBOIS M. P., 1969 a. Cytologie de l'adénohypophyse. *Entretiens de Chizé* (sous presse).
- DUBOIS M. P., 1969 b. Cytologie de l'hypophyse des bovins : séparation des cellules somatotropes et des cellules à prolactine par immunofluorescence. *Bull. Ass. Anat.*, 54<sup>e</sup> Cong., Sofia, **145**, 139-146.
- ELFTMAN H., 1957. A chrome alum fixative for the pituitary. *St. Techn.*, **32**, 25-28.
- ELFTMAN H., 1959. Aldehyde fuchsin for pituitary cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **7**, 8.
- EVANS H. M., SPARKS L. L., DIXON J. S., 1966. The physiology and chemistry of ACTH. In *The Pituitary Gland*, Harris G. W., B. T. Donovan, Butterworths, Lond. **1**, 317-372.
- FELBER J. P., 1963. ACTH antibodies and their use for a radioimmunoassay for ACTH. *Experientia*, **19**, 227-229.
- FELBER J. P., ASHCROFT S. J. H., 1965. The relationship between structure and antigenicity and properties of ACTH. *Europ. Biochem. Soc. Vienna*, 225-226.

- FELBER J. P., ASHCROFT S. H. J., VILLENUEVA A., VANNOTTI H., 1966. Antibodies to synthetic corticotrophin. *Nature*, **211**, 654-655.
- FISCHER K., HACHMEISTER V., KRACHT J., 1965. Immunohistologische Befunde mit Anti  $\beta$ -1-24 corticotropin am Hypophysenvorderlappen der Ratte. *Naturwissenschaften*, **52**, 432.
- FISHMAN J., MCGARRY E. E., BECK J. C., 1959. Studies using anterior pituitary hormones as antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**, 446-447.
- FLEISCHER N., GIVENS J. R., ABE K., NICHOLSON W. E., LIDDLE G. W., 1965. Studies of ACTH antibodies and their reactions with inactive analogous of ACTH. *J. Clin. Invest.*, **44**, 1047-1048.
- FLEISCHER N., GIVENS J. R., ABE K., NICHOLSON W. E., LIDDLE G. W., 1966. Studies of ACTH antibodies and their reactions with inactive analogous of ACTH. *Endocrinology*, **78**, 1067-1075.
- GABE M., 1963. Histochimie des produits de sécrétion du lobe distal de l'adénohypophyse. In *Cytologie de l'Adénohypophyse*, J. Benoit, C. Da Lage Ed. (C. N. R. S., Paris), 49-63.
- GANTER P., JOLLES G., 1969. *Histochimie générale et pathologique*. Gauthier-Villars, Paris.
- GELZER J., 1968. Immunochemical study of  $\beta$ -corticotropin (1-24)-tetracosapeptide. *Immunochemistry*, **5**, 23.
- GEMZELL C. A., VAN DYKE D. C., TOBIAS C. A., EVANS H. M., 1951. Increase in the formation and secretion of ACTH following adrenalectomy. *Endocrinology*, **49**, 325.
- GESCHWIND I. I., 1968. The main lines of evolution of the pituitary hormones. In *Spécif. Zool. Horm. Hypophys. Activ.*, Paris, C. N. R. S. Éd., 1969, 385-406.
- GOSBEE J. L., KRAICER J., KASTIN A. J., SCHALLY A. V., 1970. Functionnal relationship between the *pars intermedia* and ACTH secretion in the rat. *Endocrinology*, **86**, 560-567.
- HACHMEISTER V., KRACHT J., 1965. Antigene Eigenschaften von  $\beta$ -1-24 corticotropin. *Virch. Arch. path. Anat.*, **339**, 254-261.
- HEATH E., 1970. Cytology of the *pars anterior* of the bovine adenohipophysis. *Amer. J. Anat.*, **127**, 131-157.
- HERLANT M., 1960. Étude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires dans la glande pituitaire. *Bull. Micr. Appl.*, **10**, 37-44.
- HERLANT M., ECTORS F., 1969. Les cellules gonadotropes de l'hypophyse du Porc. *Z. Zellforsch Mikr. Anat.*, **101**, 212-231.
- HESS R., BARRATT D., GELZER J., 1968. Immunofluorescent localization of  $\beta$ -corticotropin in the rat pituitary. *Experientia*, **24**, 584-585.
- IMURA H., SPARKS L. L., TOSAKA M., HANE J., GRODSKY G. M., FORSHAM P. H., 1967. Immunologic studies of ACTH : effect of carboxypeptidase digestion on biologic and immunologic activities. *J. Clin. Endocr.*, **27**, 15-21.
- IMURA H., SPARKS L. L., RODSKI G. M., FORSHAM P. H., 1965. Immunologic studies of ACTH-association of biologic and immunologic activities. *J. Clin. Endocr.*, **25**, 1361-1369.
- JARETT L., LACY P. E., KIPNIS D. M., 1964. Characterization by immunofluorescence of an ACTH-like substance in non-pituitary tumors from patients with hyperadrenocorticism. *J. Clin. Endocr.*, **24**, 542-549.
- KASS E. H., KENDRICK M. I., FINLAND M., 1955. Effects of corticosterone, hydrocortisone and corticotropin on production of antibodies in rabbits. *J. exp. Med.*, **102**, 767.
- KITAY J. L., 1963. Pituitary adrenal function in the rat after gonadectomy and gonadal hormone emplacement. *Endocrinology*, **73**, 253-260.
- KRACHT J., BREUSTEDT H. J., HACHMEISTER U., 1965. Immunohistologische Befunde mit Anti  $\beta$ -(1-24) corticotropin am Hypophysenvorderlappen der Ratte. *Naturwissenschaften*, **52**, 432.
- KRACHT J., HACHMEISTER U., 1966. Immunohistological studies on Crooke cells. *IInd int. Cong. on Hormonal Steroids*, Abstr. n° 555.
- KRACHT J., HACHMEISTER U., BREUSTEDT H. J., FISCHER K., 1965. Immunohistological studies on the pituitary ACTH-production sites using anti  $\beta$ -(1-24) corticotropin. *Acta Endocr. (KbH)*, Suppl. **100**, 36.
- KRACHT J., HACHMEISTER U., BREUSTEDT H. J., ZIMMERMANN H. D., 1967. Immunohistologische Hormonlokalisation im Hypophysenvorderlappen des Menschen. *Materia Medica Nordmark*, **19**, 224-238.
- KRACHT J., ZIMMERMANN H. D., HACHMEISTER U., 1966. Immunohistologischer ACTH-Nachweis in einem R-Zellen-Adenom des Hypophysenvorderlappens bei M. Cushing. *Virch. Arch. path. Anat.*, **340**, 270-275.
- LANDON J., FRIEDMAN M., GREENWOOD F. C., 1967. Antibodies to corticotrophin and their relations to adrenal function in children receiving corticosteroid therapy. *Lancet*, **i**, 659.
- LANDON J., GIRARD J., GREENWOOD F. C., 1968. The specificity of a radioimmunoassay for human plasma ACTH. In *Protein and polypeptidic Hormones*, Margoulies Ed., Excerpta Med. Found., Int. Cong., Ser. n° 161, **1**, 29-31.
- LANDON J., LIVANOU T., GREENWOOD F. C., 1967. The preparation and immunological properties of radioiodinated ACTH. *Biochem. J.*, **105**, 1075.
- LEGAIT E., 1963. Cytophysiology of lobe intermédiaire de l'hypophyse des mammifères. In *Cytologie de l'Adénohypophyse*, C. N. R. S. Paris Éd., 216-230.

- LEVINE L., 1967. Microcomplément fixation. In *Hand book of experimental immunology*, Weir D. M. Ed., (Blackwell, Oxford), 707-718.
- LEZNOFF A., FISHMA J., TALBOT M., MCGARRY E. E., BECK J. C., ROSE B., 1962. The cytological localization of ACTH in the human pituitary. *J. Clin. Invest.*, **41**, 1720-1724.
- LOWRY P. J., CHADWICK A., 1970. Interrelations of some pituitary hormones. *Nature*, **226**, 219-222.
- LYCETTE R. M., DANFORTH W. F., KOPPEL J. L., OZWIN J. H., 1970. The binding of Luxol Fast Blue ARN by various biological lipids. *St. Techn.*, **45**, 155-160.
- MCGARRY E. E., BALLANTYNE A., BECK J. C., 1962. Studies with antisera to ACTH. *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, **14**, 273-295. — *Ib.*, p. 375, p. 384.
- MCGARRY E. E., BECK J. C., AMBE L., NAYAK R., 1964. Some studies with antisera to growth hormone, ACTH and TSH. *Rec. Progr. Horm. Res.*, **20**, 1-23.
- MCGUIRE J., MCGILL R., LEEMAN S., GOODFRIEND T., 1965. The experimental generation of antibodies to  $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone and Adrenocorticotrope Hormone. *J. Clin. Invest.*, **44**, 1671-1678.
- MCKEOWN B. A., VAN OVERBEEKE A. P., 1969. Immunohistochemical localization of ACTH and prolactin in the pituitary gland of adult migratory Sockeye Salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **26**, 1837-1846.
- MARSHALL J. M., 1951. Localization of ACTH by histochemical and immunochemical methods. *J. Exp. Med.*, **94**, 21-30.
- MIKAMI S. I., DAIMON T., 1968. Cytological and cytochemical investigations of the adenohipophyse of the sheep. *Arch. Hist. Jap.*, **29**, 427-445.
- MOSCA L., CHIAPPINO G., 1964. Localization of corticotrophin and luteinizing hormone production in human pituitary. *Lancet*, **2**, 1016-1017.
- NAKANE P. K., 1968. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J. Histochem. Cytochem.*, **16**, 557-5560.
- NAKANE P. K., PIERCE G. B., 1967. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Cell Biol.*, **33**, 307-318.
- PALMORE W. P., ANDERSON R., MULROW P. J., 1970. Role of the pituitary in controlling aldosterone production in sodium depleted rats. *Endocrinology*, **86**, 728-734.
- PEARSE A. G. E., VAN NOORDEN S., 1963 a. The histoenzymology of the human adenohipophysis. In *Cytologie de l'adenohipophyse* (C. N. R. S., Paris), 63.
- PEARSE A. G. E., VAN NOORDEN S., 1963 b. The functional cytology of the human adenohipophysis. *Canad. Med. Ass., J.*, **88**, 462-471.
- PIFER R. H., SPICER S. S., 1970. Specific immunologic demonstration of ACTH in the *pars intermedia* of the adenohipophysis. *Fed. Prod.*, **70**, 509.
- QUIOCHO F. A., RICHARDS F. M., 1966. The enzymic behavior of carboxypeptidase-A in the solid state. *Biochemistry*, **5**, 40-62.
- RICCI V., RUSSOLO M., 1968. Osservazioni immuno-citologiche sulla localizzazione dell'ACTH nella ipofisi di cane. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, **44**, 1624-1626.
- RUSSOLO M., BET E., 1969. Localizzazione di anticorpi anti  $\beta$ -(1-24) corticotropina *in vivo* in cellule ipofisarie. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, **45**, 924-925.
- RUSSOLO M., RASTRELLI A., 1968. Anticorpi anti  $\beta$ -(1-24) corticotropina. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.*, **44**, 1195-1196.
- RUSSOLO M., RASTRELLI A., CALZAVARA F., 1968. Lesione dell'adenoipofisi anticorpi anti  $\beta$ -(1-24) corticotropina-J<sup>121</sup>. *Atti della Societa Medico Chirurgica di Padova*, **43**, 1-7.
- SAYERS M. A., SAYERS G., WOODBURY L. A., 1948. The assay of ACTH by the adrenal ascorbic acid depletion. *Endocrinology*, **42**, 379-393.
- SHINO M., 1967. Immunocytological observations on cellular localization of ACTH in the rat anterior pituitary gland. *Anat. Rec.*, **157**, 389.
- SIPERSTEIN E. R., 1963. Identification of the ACTH producing cells in the rat hypophysis by autoradiography. *J. Cell. Biol.*, **17**, 521-546.
- SLIDDERS W., 1961. The OFG and Br. AB-OFG methods for staining the adenohipophysis. *J. Path. Bact.*, **82**, 522-526.
- SPARKS L. L., IMURA H., GRANT S. P., FORSHAM P. d. A., 1965. Dissociation of immunological and biological activity of ACTH. *J. Clin. Invest.*, **44**, 1100.
- VANCE V. K., SCHNURE J. J., REICHLIN M., 1968. Induction of antibodies to porcine ACTH in rabbits with non steroidogenic polymers of BSA and ACTH. In *Protein and polypeptide Hormones*, M. Margoulies Ed. (Excerpta Méd. Found.), Int. Congr. Ser. n° 161, **2**, 380-384.
- WASSERMAN E., LEVINE L., 1961. Quantitative micro complement fixation and its use in the study of antigenic structure by specific antigen antibody inhibition. *J. Immunol.*, **87**, 290.
- WEIR D. W., 1967. *Handbook of experimental immunology*. (Beckwell, Oxford).

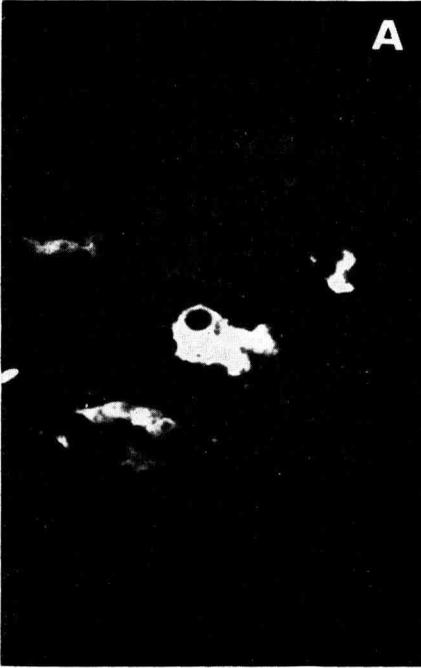
## PLANCHE I

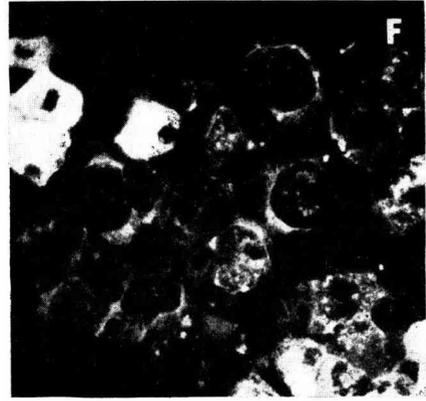
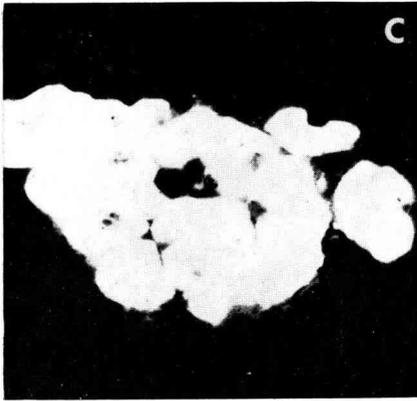
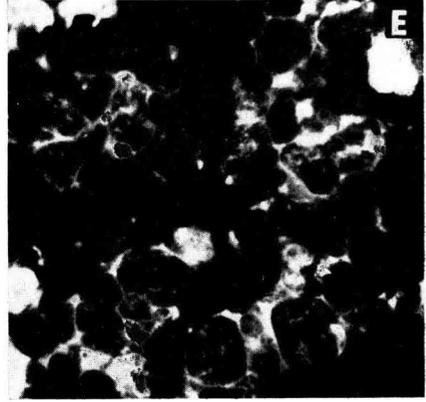
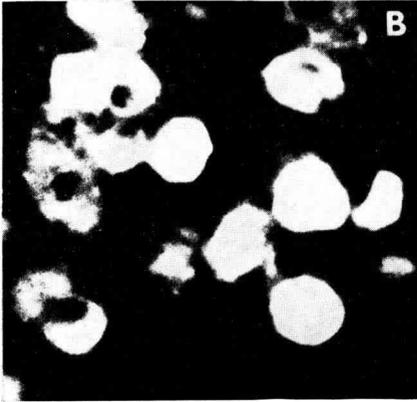
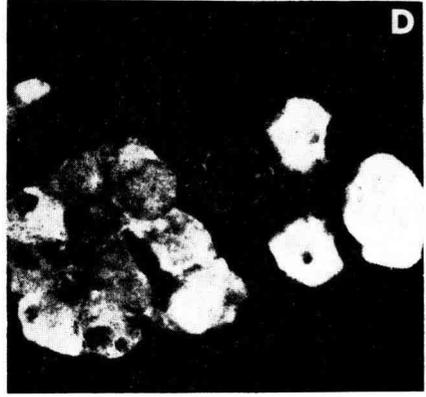
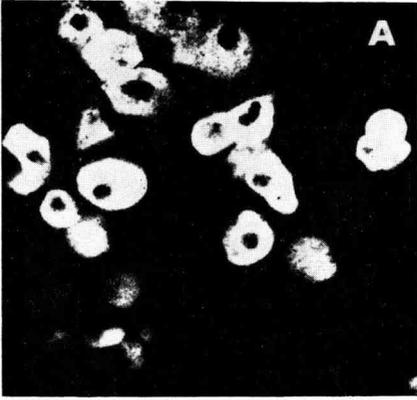
*Immunofluorescence : anticorps anti ACTH (contaminant du sérum anti prolactine bovine) et anticorps anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine.*

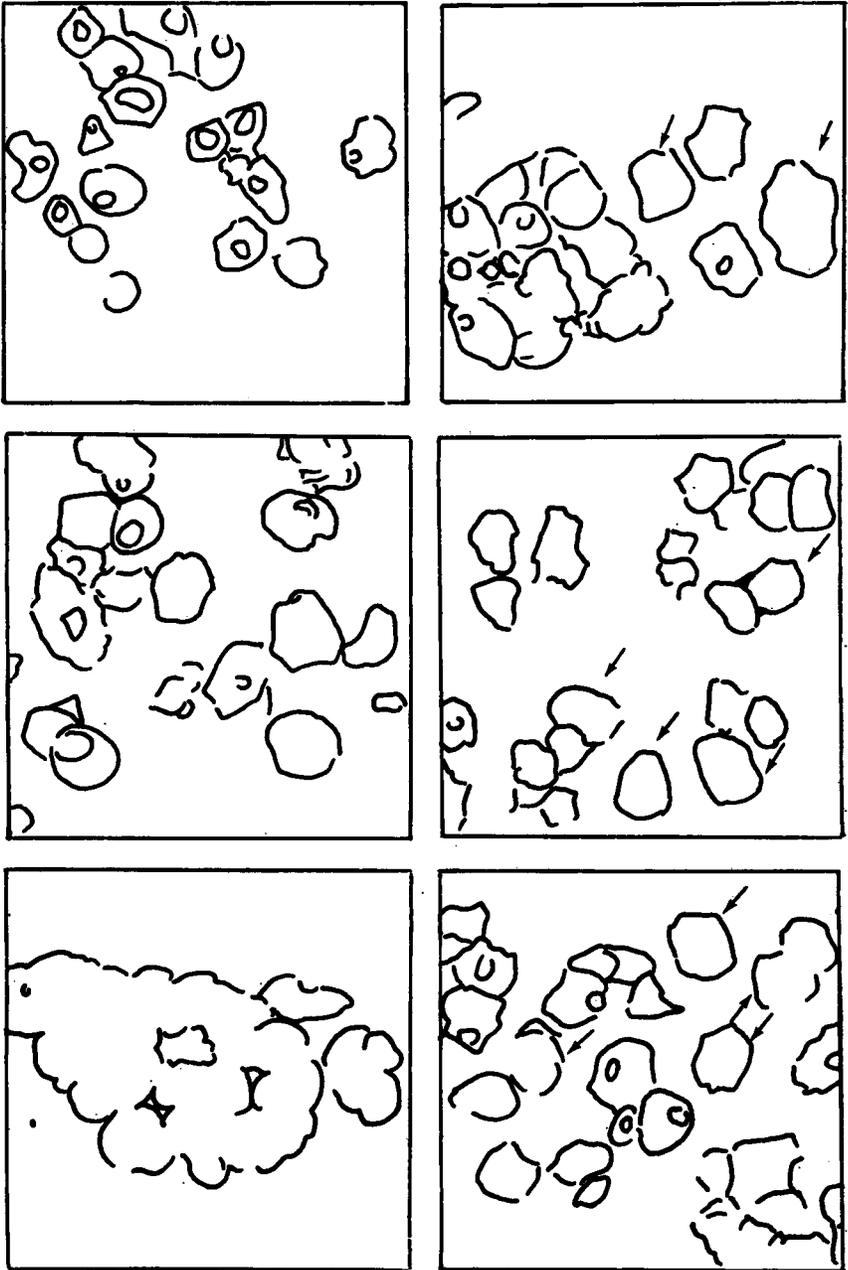
Mise en évidence des cellules corticotropes : les mêmes cellules présentes sur les champs homologues de deux coupes sériées contiguës sont révélées par l'un et l'autre de ces Anticorps.

N. R. : le sérum anti prolactine a été saturé par de la prolactine pour le rendre spécifique).

- 1<sup>er</sup> champ : A : Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine  
          B : Ac. anti ACTH  
2<sup>e</sup> champ : C : Ac. anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine  
          D : Ac. anti ACTH







*Hypophyse de porc. Cellules corticotropes. Comparaison entre immunofluorescence et coloration de contrôle.*

PLANCHE II A

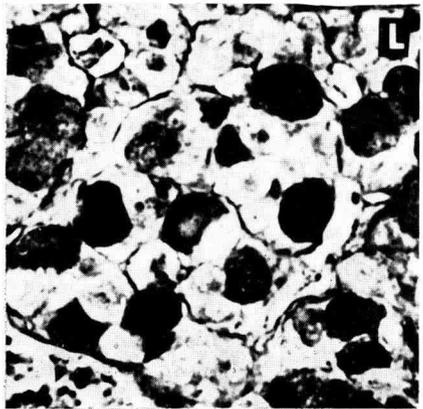
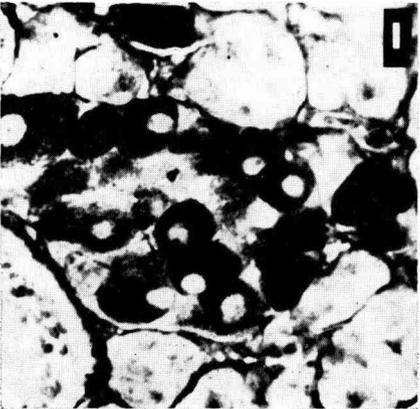
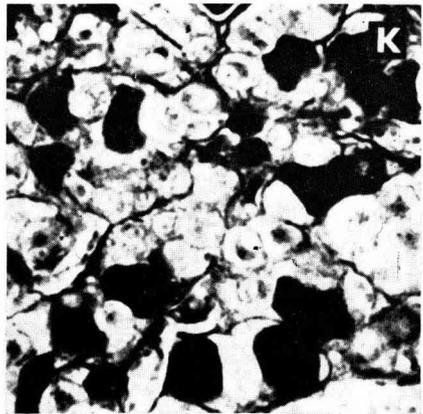
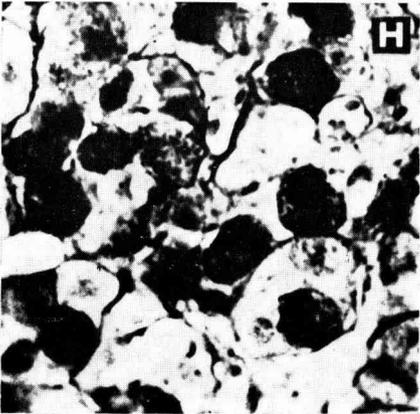
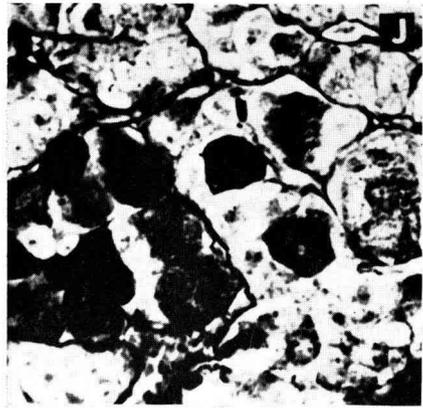
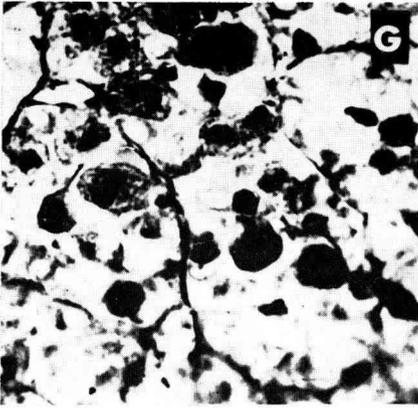
Immunofluorescence (Ac.  $\beta$ -(1-24) corticotropine. Coloration de contraste par le Bleu Evans).

A-B : Cellules en phase de croissance (cytoplasme fluorescent dans son ensemble).

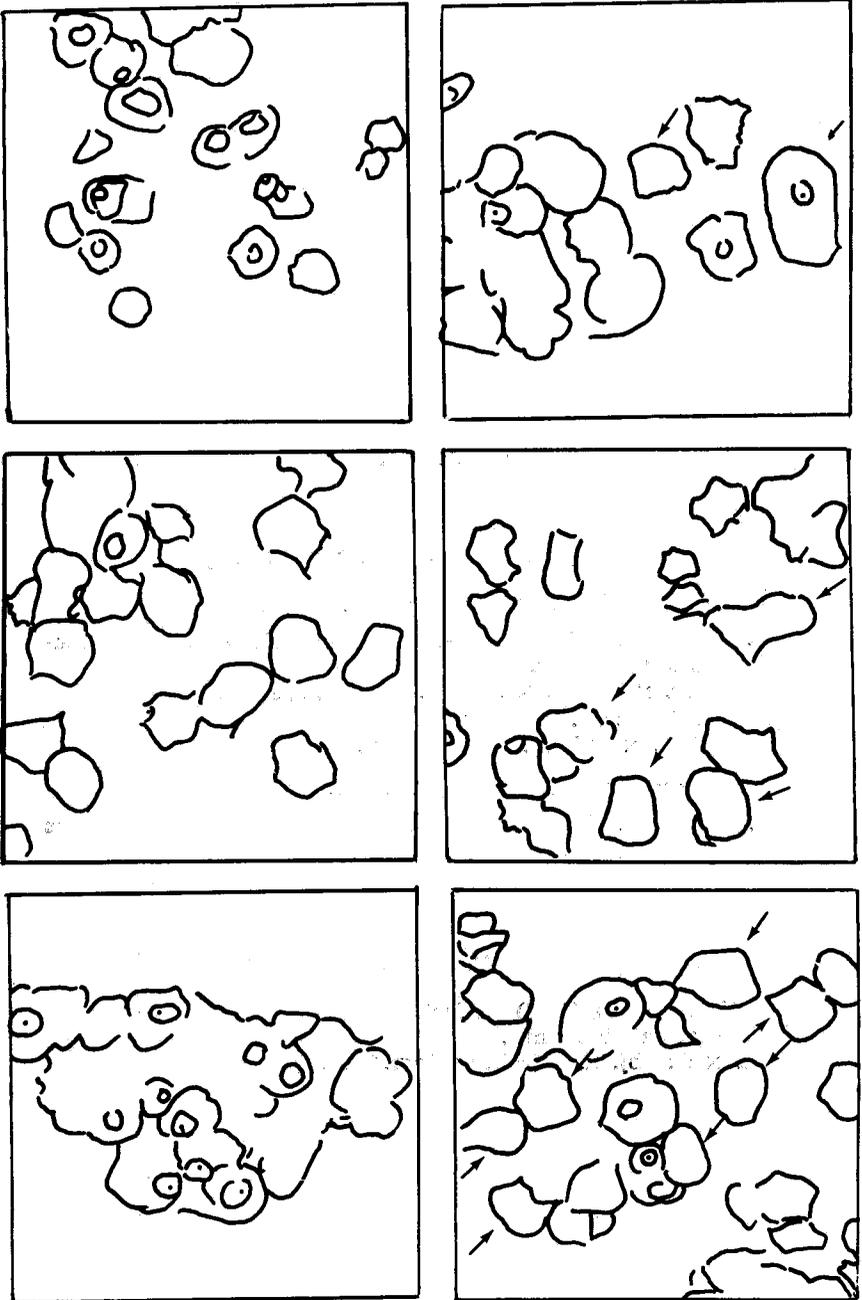
C : Phase d'état.

D : Début de la période d'hypertrophie dégénérative : le matériel antigénique n'apparaît plus avec un aspect homogène, mais sous la forme d'un fin piqueté remplissant l'aire cytoplasmique.

E-F : Disparition progressive du matériel antigénique dans la cellule.



M. DUBOIS



*Hypophyse de porc. Cellules corticotropes. Comparaison entre immunofluorescence et coloration de contrôle.*

PLANCHE II B

Même préparation, mêmes champs : coloration [Bleu Alcian (pH 2,5), PAS, Orange G].

*La discordance entre fluorescence et affinité pour le PAS est évidente, notamment en (D, J), (E, K), (F, L) (cellules marquées ↘ sur les schémas).*

Obj.  $\times 6$  ; Oc.  $\times 54$  imm. ; G. photographique  $\times 8$  ; Filtre vert ; Film couleur Kodachrome II A.

### PLANCHE III

#### *Hypophyse de bovin. Cellules corticotropes.*

##### **1° Anticorps anti $\beta$ -(1-24) corticotropine. Vache.**

A. — Zone basophile centro-médiane : Cellules ACTH nombreuses et groupées.

Oc.  $\times$  6 ; Obj.  $\times$  25 (Réf. fotogr. 318-17).

B. — Même zone.

Obj.  $\times$  54 imm. (Réf. fotogr. 318-15).

##### **2° Anticorps anti ACTH bovine. Taureau.**

C. — Zone latérale acidophile, à cellules corticotropes rares et dispersées.

Cellule isolée avec de larges expansions cytoplasmiques finement vacuolisées.

#### *Hypophyse de mouton. Cellules corticotropes (D).*

Anticorps anti  $\beta$ -(1-24) corticotropine.

Zone latérale basophile.

Oc.  $\times$  6 ; Obj.  $\times$  25 (Réf. fotogr. 373-22).

