

ETUDE QUANTITATIVE PAR RADIOAUTOGRAPHIE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE L'UTILISATION DE LA DL-LEUCINE-³H PAR LES CELLULES DE L'HYPOPHYSE DU CANARD EN CULTURE ORGANOTYPIQUE

A. TIXIER-VIDAL et R. PICART

From the Laboratoire de Médecine Expérimentale du Collège de France, Paris, France

ABSTRACT

The synthesis, intracellular transport, storing, and excretion of proteins by duck hypophysal cells in organ culture were studied with tritiated DL-leucine and high resolution radioautography (pulse-labeling experiments). Quantitative study of the radioautographs allowed a determination of the relative proportions of cytoplasmic radioactivity located in each cellular compartment (ergastoplasm, Golgi apparatus, and protein granules) as well as the variations in these proportions as a function of time. The number of labeled protein granules as opposed to the total number of granules in the cell was also determined (RSg). These data were separately analyzed for the two types of cells present in the explants: prolactin cells and "MSH" cells. The synthetic process follows a course common to both cell types, each of which is distinguished by its particular modalities. The labeled proteins, synthesized within several minutes in the ergastoplasm, are concentrated in the Golgi zone within 30 min. They then migrate out of this area, the emptying of which is accomplished in about 4 hr. These proteins become equally distributed between the protein granules, on the one hand, and the cytoplasm ("sedentary" proteins), on the other. The RSg reaches its maximum when the Golgi zone is emptied, but this figure remains very low (3%). The RSg then decreases slowly (1% in 40 hr). It is concluded that hypophysal cells are able to store protein in their granules and that their processes of synthesis and excretion are not continuous. The prolactin cells differ from the "MSH" cells in that they have a slower migration of newly synthesized proteins, and these proteins pass via the dilated ergastoplasmic cisterns in which they may possibly be stored.

INTRODUCTION

Les mécanismes réglant la biosynthèse et l'excrétion des hormones hypophysaires sont encore très mal connus. Les cellules de la préhypophyse ont la propriété de conserver généralement un stock important de granulations dont les caractères histochimiques, tinctoriaux, et ultrastructuraux varient suivant la nature du produit élaboré. Le problème des relations quantitatives entre synthèse et excrétion des hormones hypophysaires se

pose donc constamment aussi bien au cytologiste qu'à l'endocrinologiste. Dans l'état actuel des connaissances, aussi bien les données morphologiques statiques que les dosages biologiques hormonaux ne donnent qu'une idée très approximative de ce bilan de l'activité cellulaire. On pouvait penser que des méthodes dynamiques basées sur l'étude de l'incorporation d'acides aminés marqués, précurseurs des protéines

nouvellement synthétisées fourniraient des données nouvelles sur ces phénomènes.

La radioautographie en microscopie conventionnelle a déjà été appliquée à l'hypophyse du Rat, *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, l'étude de l'incorporation de glycine tritiée par l'hypophyse du Rat normal ou surrénalectomisé (Siperstein, 1963), a montré que le maximum d'activité est atteint 90 minutes après l'injection; pendant cette période, la radioactivité est surtout concentrée dans la région golgienne, au moins au niveau des cellules acidophiles. Ensuite, les grains d'argent se répartissent dans la zone granulaire et la décroissance de l'activité est alors très lente; le taux de fixation est plus élevé et la décroissance plus rapide au niveau des cellules activées par la surrénalectomie. Mais l'étude du phénomène n'a pas dépassé la 15^{ème} heure après l'injection. Des résultats très comparables ont été obtenus avec la proline tritiée chez le Rat normal et thyroïdectomisé (Ducommun, 1965). *In vitro*, en culture d'organe de très courte durée (2-4 jours) ou en incubation, les cellules hypophysaires du Rat maintenues en contact avec la leucine tritiée pendant des durées variant de 2-24 heures, incorporent le précurseur à des degrés variables suivant les types cellulaires (Kobayashi et collab., 1965). Ces expériences, bien que ne permettant pas d'aborder une étude cinétique à l'échelle intracellulaire, ouvraient cependant la voie à des recherches analogues en microscopie électronique.

Il nous a paru plus avantageux d'aborder cette étude sur des hypophyses placées en culture d'organe depuis plusieurs jours. Nous avons montré en effet, dans le cadre de recherches sur le contrôle hypothalamique de la fonction prolactinique chez les Oiseaux (Tixier-Vidal et Gourdj, 1965), que la préhypophyse du Canard placée en culture organotypique depuis 1 semaine ne contient plus que deux types cellulaires sur les sept types existant à l'origine dans la glande. Parmi ces deux types cellulaires, le plus fréquent est représenté par la cellule à prolactine. Les dosages de prolactine montrent que les explants élaborent des quantités de prolactine supérieures au contenu initial de la glande (Gourdj et Tixier-Vidal, 1966). Un second type moins fréquent présente des caractères ultrastructuraux voisins de ceux des cellules à MSH et des cellules à LH que nous avons définis *in vivo* au cours de recherches antérieures (Tixier-Vidal, 1965). Nous disposons ainsi d'un matériel plus simple que l'hypophyse

in situ et excréant de façon continue une hormone protéique, la prolactine. En outre, ce matériel présentait à priori l'avantage de permettre la poursuite des expériences pendant une plus longue durée, les risques de réincorporation de molécules d'acide aminé marqué résultant éventuellement du catabolisme étant à priori beaucoup plus faibles que dans les expériences *in vivo*.

Au cours d'expériences préliminaires (Tixier-Vidal et al., 1965), nous avons laissé les explants en contact avec le précurseur (DL-leucine-³H 4-5) pendant des durées de 2, 5, 10, 15, 20, 30, 60, et 120 minutes. Nous avons pu constater ainsi que le taux d'incorporation augmente en fonction du temps et que les différents compartiments de l'activité cellulaire ne sont pas marqués simultanément. Après 2 et 5 minutes, seuls le noyau et les structures ergastoplasmiques sont marqués. Après 15 minutes, le marquage commence à apparaître sur l'appareil de Golgi où il va devenir quantitativement prédominant à partir de 30 minutes de contact. Les granulations protéiques de la cellule ne sont marquées avec certitude qu'à partir de 1-2 heures de contact. Afin d'analyser la cinétique de ces phénomènes, il était nécessaire de reprendre cette étude par des expériences de type "Pulse-labeling": les explants étant d'abord marqués pendant un temps bref, on suit la progression des protéines néosynthétisées en l'absence de toute incorporation nouvelle du précurseur. Compte tenu de nos expériences préliminaires, nous avons adopté un temps de contact de 10 ou 15 minutes, de façon à avoir au départ un marquage complet des structures ergastoplasmiques. Les expériences de chasse ont été poursuivies à des intervalles variés pendant 48 heures après l'arrêt de l'incorporation du précurseur.

MATERIEL ET METHODES

Cultures

Les fragments étudiés proviennent de neuf hypophyses de Canards mâles. Celles-ci sont divisées en fragments de 1-2 mm³ cultivés en goutte pendant dans un milieu liquide comportant pour 100 ml de milieu, 25 ml de sérum de Canard, 12,5 ml de jus embryonnaire, 62,5 ml de tyrode, 5000 UI de pénicilline et 5 mg de streptomycine.

Les gouttes sont déposées sur le couvercle de boîtes de Petri en plastique (Falcon). Celui-ci est ensuite retourné, le fond de la boîte étant recouvert de tyrode. Les boîtes sont conservées dans des ré-

cupients étanches, en atmosphère humide et saturée d'un mélange 5% CO₂-95% O₂. L'ensemble est placé dans une étuve à 37°. Les repiquages ont lieu tous les 2-3 jours. Les fragments hypophysaires évoluent selon le processus de la culture d'organe. Au moment du marquage, ils sont maintenus en culture depuis 10 ou 13 jours suivant les expériences.

Marquage et Chasse

La DL-³H-leucine 4-5 est ajoutée à du milieu de culture frais à la dose de 200 µc par cm³ de milieu. Nous avons utilisé soit la DL-leucine du CEA¹ (activité spécifique 10 Ci/mm, puis 17 Ci/mm), soit la DL-leucine du Radiochemical Center (23 Ci/mm). Le milieu marqué est réparti dans des tubes à hémolyse (½ cm³ par tube) placés dans un bain-marie à 37°. Les explants fraîchement lavés sont placés dans les tubes contenant le milieu marqué pour une durée de 10-15 minutes. Ils sont récupérés à la pipette fine et rapidement rincés dans 100 cm³ de solution de tyrode répartie en trois bains successifs. Cette solution contient de la DL-leucine-¹H à une concentration 200 fois supérieure à celle de la solution de leucine marquée. Les explants sont ensuite remis en culture dans leur récipient d'origine sur un milieu de culture vierge enrichi en leucine-¹H à la même concentration que le liquide de lavage. Les pièces sont prélevées après des durées de chasse variables suivant les expériences: (a) "C.24": 10 minutes-20 minutes-30 minutes-1 heure; (b) "c.14": 15 minutes-30 minutes-1 heure-2 heures-4 heures; (c) "C.16": 30 minutes-1 heure-2 heures-4 heures-8 heures-24 heures-48 heures; (d) "C.19": 1 heure-8 heures-48 heures-4 jours. Pour chaque temps, trois à quatre explants sont fixés.

Technique Autohistoriographique

Les fragments sont fixés d'abord pendant 2 heures dans la glutaraldéhyde à 1% tamponnée selon Millonig, puis, après rinçage et séjour dans le même tampon, surfixés pendant ½ heure dans l'acide osmique à 2% tamponné selon Millonig. Ils sont inclus dans l'araldite selon la technique de Barnes (1963). Les coupes effectuées sur un microtome automatique Servall MT2 sont préparées en vue de la radioautographie selon la technique de Granboulan (1965). Pour chaque temps, deux épaisseurs de coupe sont utilisées séparément (argent et or). Avant d'être plongées dans l'émulsion Illford L 4 (diluée au 1/6), les coupes recueillies sur lame collodionnée sont colorées soit par l'acétate d'uranyle en solution alcoolique à 50°, soit par le citrate de Plomb selon Reynolds, puis recouvertes d'une pellicule de carbone isolant l'émulsion de l'action chimique des colorants. Les temps d'exposition varient entre 1 mois ½ et

¹ Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay, France.

3 mois suivant l'activité spécifique de la leucine utilisée. Le développement est effectué dans le microdol x à 18° pendant 5 minutes. Les coupes sont examinées à l'aide de l'Elmiskop Siemens EMU II. Pour chaque série expérimentale, la totalité des lames subit simultanément les différentes phases de la technique (coloration, enrobage d'émulsion, développement). Les causes d'erreur liées aux artefacts de la technique sont donc constantes.

Etude Quantitative des Radioautographies

RADIOACTIVITÉ RELATIVE DES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS: Les photos sont prises au hasard aux grossissements 5,000, 6,000, ou 7,000. Cependant, étant donné que nous nous proposons d'étudier la répartition de la radioactivité dans les trois compartiments cytoplasmiques: ergastoplasme, appareil de Golgi, granulations protéiques, il était indispensable d'établir une sélection. Il fallait choisir des cellules pourvues de granulations et donc éliminer les cellules agranulaires (chromophobes en microscopie optique). De plus, il fallait sélectionner les cellules dont le plan de coupe intéressait à la fois les trois compartiments cytoplasmiques. Malgré cette sélection, la disposition et la forme très irrégulière des cellules dans l'explant laissent encore une très grande place au hasard dans la récolte des données numériques. Enfin, les comptages relatifs aux cellules à prolactine d'une part (P), à MSH d'autre part (MSH), ont été groupés et analysés séparément.

Les comptages ont été faits systématiquement pour les temps de chasse suivants: 15 minutes, 30 minutes, 1 heure, 4 heures, 24 heures, et 48 heures. Au total, 160 cellules ont été mesurées sur des micrographies dont le grandissement final était de 16,000 ou 22,000. Pour chaque temps, 50-168 grains d'argent ont été comptés. La répartition de la radioactivité dans les trois compartiments cytoplasmiques a été exprimée en % des grains totaux comptés pour chaque temps envisagé. Les valeurs obtenues représentent la radioactivité relative (R.R.) de chaque compartiment (Tableaux I et II, Fig. 14).

RAPPORT NUMÉRIQUE ENTRE LE TOTAL DES GRANULATIONS MARQUÉES ET L'ENSEMBLE DES GRANULATIONS D'UN MÊME TERRITOIRE (RSg): Il nous a paru intéressant de déterminer la proportion % des granulations marquées par rapport à l'ensemble des granulations protéiques contenues dans un même territoire. Ce rapport fournit un indice de la concentration relative des protéines granulaires marquées ou encore de la radioactivité spécifique des granulations (RSg). Il était susceptible de nous aider à déterminer la vitesse de renouvellement des granulations. A l'inverse de la radioactivité relative qui reste théoriquement la même quel que soit le temps d'exposition des coupes, la RSg est une fonction directe de ce dernier. En effet, le nombre

TABLEAU I

Cellules à prolactine: évolution en fonction du temps de chasse de la radioactivité relative des différents compartiments cellulaires, exprimée en % des grains comptés. Résultats numériques et signification statistique étudiée par analyse directe de contingence 2×2 .

(n.s., non significatif. x, significatif $P < 5\%$.

xx, $P < 1\%$. xxx, $P < 0,1\%$.

Les signes placés en bas à gauche de chaque nombre indiquent les résultats des comparaisons verticales. Les signes placés en haut à droite indiquent les résultats des comparaisons horizontales.

Temps de chasse	Ergastoplasme + cytoplasme	Golgi	Granulations	Mitochondries et lysosomes	Total des grains comptés
15 minutes	41,4	43,5	14,8	0	101
30 minutes	49,1	31,1 (7,9%)	14,7	4,9	61
1 heure	55,3	26,2	16,5	1,7	103
4 heures	42,2	17,8	30,9	8,9	168
24 heures	50,7	7,8	38,2	3,1	128
48 heures	52,2	5,6	39,7	2,2	88

des désintégrations augmentant en fonction du temps d'exposition, les chances d'observer une granulation marquée doivent suivre la même loi. Pour effectuer des comparaisons en fonction du temps de chasse, il nous a paru préférable de recueillir les résultats sur des coupes ayant été exposées pendant la même durée et provenant de fragments ayant reçu la même dose de traceur. Ceci n'a été possible que pour les cellules à prolactine car les cellules de type MSH étant moins fréquentes, les données qui leur sont relatives sont recueillies de façon plus éparsée.

Interprétation Statistique des

Résultats Numériques

RADIOACTIVITÉ RELATIVE DES TROIS COMPARTIMENTS CYTOPLASMIQUES: L'analyse statistique des résultats numériques a été faite par

analyse directe de contingence 2×2 (Lison, 1958; Steel et Torrie, 1960). Cette méthode permet de comparer entre elles des proportions. Nous avons ainsi calculé la probabilité exacte pour que les différences observées dans les proportions respectives des grains localisés, ou bien sur deux structures différentes pour une même durée de chasse, ou bien sur une même structure mais pour deux durées de chasse différentes, soient significatives. Les comparaisons suivantes ont été faites: 1°, pour une même durée de chasse: ergastoplasme [E] vs appareil de Golgi, E vs granulations, appareil de Golgi vs granulations (comparaisons horizontales); 2°, pour un même compartiment: $\frac{1}{4}$ heure vs $\frac{1}{2}$ heure- $\frac{1}{4}$ heure vs 1 heure- $\frac{1}{4}$ heure vs 4 heures- $\frac{1}{4}$ heure vs 24 heures et $\frac{1}{4}$ heure vs 48 heures (comparaisons verticales). Les résultats de l'analyse statistique sont résumés par les Tableaux I et II pour chacun des deux types cellulaires.

TABLEAU II

Cellules de type MSH: évolution en fonction du temps de chasse de la radioactivité relative des différents compartiments cellulaires, exprimée en % des grains comptés. Résultats numériques et signification statistique étudiée par analyse directe de contingence 2×2 (mêmes légendes que Tableau 1).

Temps de chasse	Ergastoplasme + cytoplasme	Golgi	Granulations	Mitochondries et lysosomes	Total des grains comptés
15 minutes	20,6	68,4	7,6	3,2	92
30 minutes	x 32,7	56,8	7,7	2,6	116
1 heure	xxx 41,4	31,4	24,8	2,2	181
4 heures	xxx 58,0	8,0	34,0	0	50
24 heures	xxx 47,1	3,7	41,5	7,4	53

Dans la mesure où nous limitons notre objectif à la comparaison des proportions, la méthode statistique employée met en évidence une signification souvent très élevée à partir du nombre de grains effectivement comptés pour chaque point. Il n'était donc pas nécessaire d'augmenter le volume des comptages. Ceci aurait été indispensable si nous avions recherché une appréciation rigoureuse de la radioactivité de chacun des compartiments cellulaires pris indépendamment l'un de l'autre.

Dans le cas de la RSg, les comparaisons en fonction du temps de chasse ont été soumises au même type de calcul statistique.

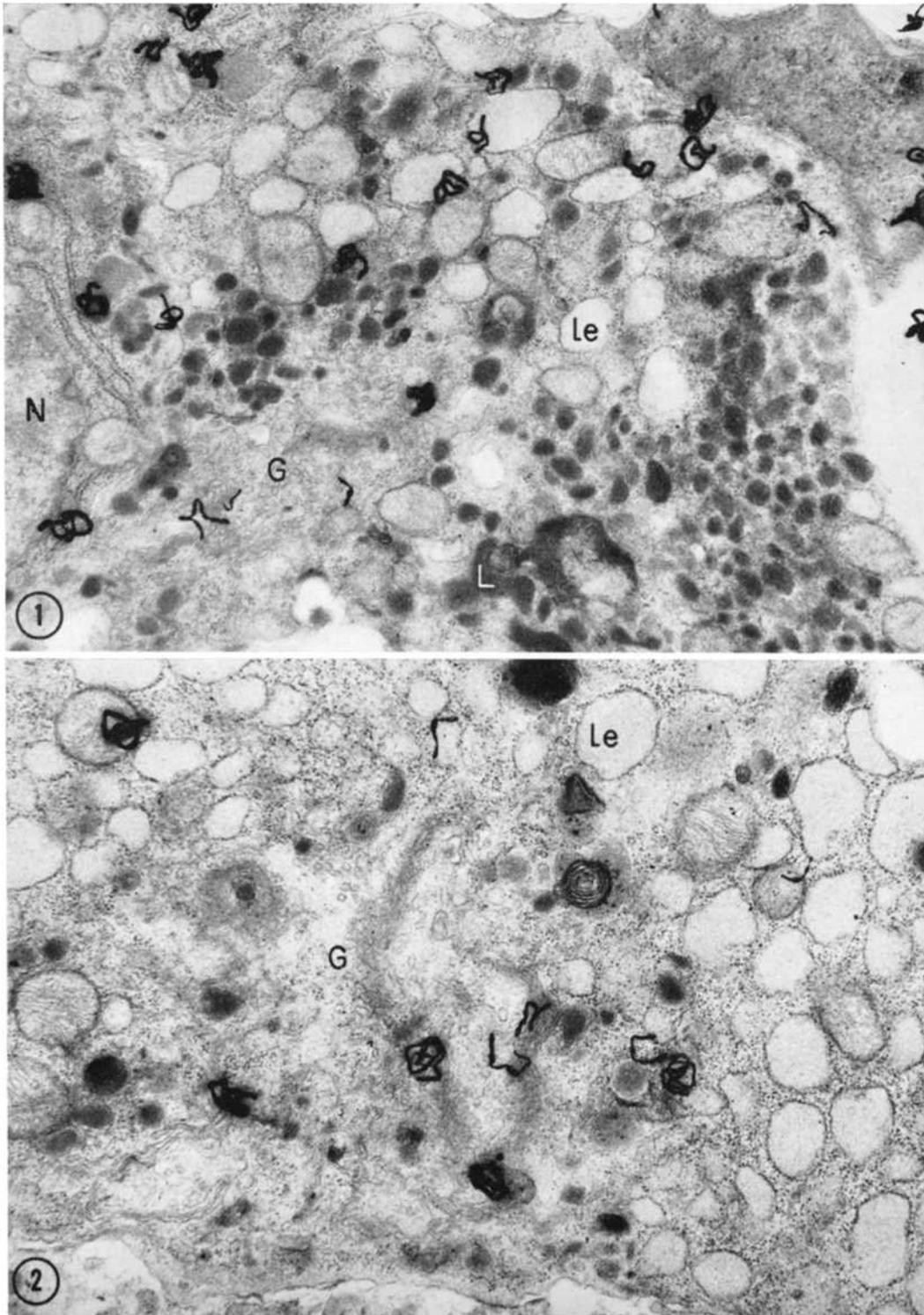
RESULTATS

Données Morphologiques

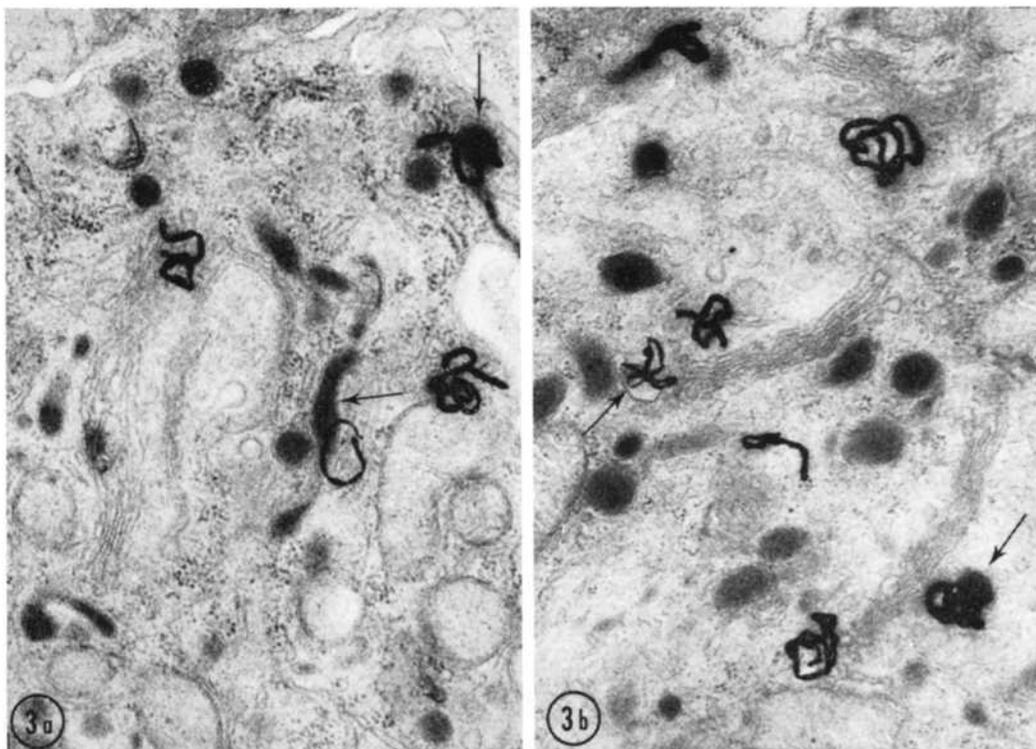
Ainsi que nous l'avons constaté au cours de recherches antérieures (Tixier-Vidal et Gourdj, 1965), les cultures soumises à l'examen radioautographique contiennent deux variétés cellulaires bien distinctes par leurs caractères ultrastructuraux que nous décrirons brièvement.

(a) *Les cellules à prolactine* sont caractérisées par leurs granulations polymorphes dont le volume

est très variable (Figs. 1-7). L'ergastoplasme comporte de nombreux ribosomes libres ou groupés en polysomes et des ribosomes liés à des membranes limitant des citernes. Celles-ci, remplies d'un matériel finement particulaire, sont presque toujours dilatées et arrondies (Figs. 1, 2, et 5). L'appareil de Golgi se caractérise par la présence d'empilement de saccules très étroits à disposition linéaire ou flexueuse (Figs. 1-3). Des microvésicules plus ou moins abondantes sont associées aux saccules. L'appareil de Golgi contient fréquemment des granulations en voie de ségrégation, ainsi que des corps denses de type lysosome. Suivant les cellules, les proportions relatives de l'ergastoplasme et des granulations protéiques sont très variables. Les formes extrêmes contiennent soit une prédominance des structures ergastoplasmiques, à vacuoles dilatées (forme A), soit au contraire une prédominance de granulations, l'ergastoplasme étant alors réduit à de minces lacunes aplaties (forme B); de nombreux intermédiaires existent entre ces deux états (formes A-B). Ces différents aspects se retrouvent dans l'hypophyse in vivo (Tixier-Vidal, 1965).



FIGURES 1 et 2 Cellules à prolactine après 10 minutes de chasse. La radioactivité est répartie sur le cytoplasme, en bordure et à l'intérieur des lacunes ergastoplasmiques. La concentration dans la zone golgienne est encore faible pour la Fig. 1, plus accusée pour la Fig. 2. Le marquage des grains est nul. Noter le marquage de quelques lysosomes et de quelques mitochondries et sur la Fig. 2, la localisation précise du marquage sur les saccules. *N*: noyau, *G*: appareil de Golgi, *le*: lacune ergastoplasmique, *L*: lysosome. Coloration: citrate de plomb, Fig. 1, $\times 22.000$, Fig. 2, $\times 25.000$.



FIGURES 3 a et b Cellule à prolactine. Détail de la zone golgienne après 20 minutes de chasse. Noter le matériel dense à l'intérieur des saccules, déjà marqué (flèche), les grains néoformés et marqués (flèches). Coloration au citrate de plomb. 3 a, $\times 24.500$. 3 b, $\times 35.000$.

(b) *Les cellules de "type MSH."* Le plan d'organisation ultrastructurale de ces cellules les distingue nettement des cellules à prolactine. Les grains sont ici sphériques et très denses; leur diamètre maximum varie entre 200 et 250 m μ (Figs. 11 et 12). L'ergastoplasme est riche en ribosomes libres ou accolés à la paroi de lacunes toujours linéaires, jamais dilatées, à l'inverse de celles des cellules à prolactine. Enfin, l'appareil de Golgi est caractérisé par ses systèmes de saccules élargis à disposition annulaire très différents de ceux observés au niveau des cellules à prolactine (Figs. 9 et 10). Il contient en outre des microvésicules localisées à l'intérieur des systèmes de saccules et très fréquemment des grains en voie de ségrégation, mais beaucoup plus rarement des corps denses. L'activité excrétrice de ces cellules est attestée par la présence fréquente de grains en voie d'expulsion. Des quantités croissantes d'hormone mélanophorotrope ont pu être mises en évidence dans le milieu de culture (Tougart et Tixier-Vidal, non publié).

Les cellules de ce type sont nettement plus

petites que les cellules à prolactine (surface moyenne calculée sur neuf cellules 18,820 μ^2 contre 41, 048 μ^2 pour les cellules à prolactine). Elles sont également plus petites que dans l'hypophyse in vivo.

Les explants contiennent en outre un certain nombre de cellules agranulaires. Les unes sont petites avec un rapport nucléoplasmique $\frac{c}{N}$ faible.

Les autres plus volumineuses ont un rapport $\frac{c}{N}$ élevé; leur appareil de Golgi est très développé et le reste du territoire cytoplasmique est occupé par de nombreux ribosomes libres ou accolés à des lacunes (Fig. 7). Certaines d'entre elles contiennent quelques grains souvent en voie d'excrétion, mais trop rares pour permettre l'identification du type cellulaire.

Résultats Radioautographiques

De façon constante, le background des préparations est extrêmement faible, ainsi qu'en attestent

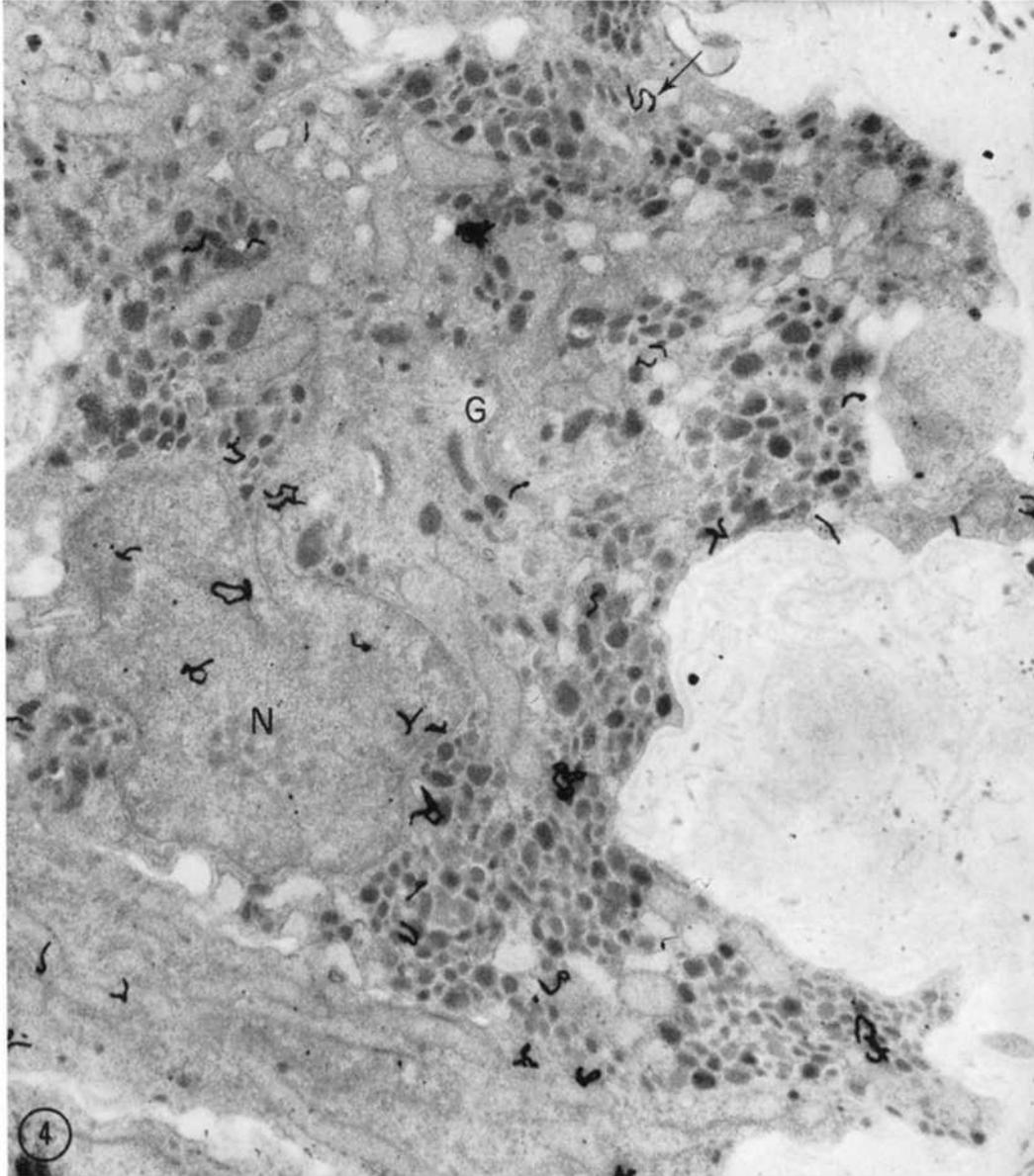


FIGURE 4 Cellule à prolactine après 1 heure de chasse. La zone golgienne est presque totalement dépourvue de marquage. Celui-ci est localisé sur les granulations, sur le cytoplasme et parfois à l'intérieur des lacunes (flèches). Noter la faible proportion numérique des granulations marquées et le marquage nucléaire persistant; Coloration acétate d'uranyle. $\times 16.000$.

les clichés montrant la quasi absence des grains d'argent dans les espaces intercellulaires (Fig. 4) ou à la périphérie de la culture (Fig. 9).

L'examen d'ensemble des coupes révèle que le taux de captation varie beaucoup d'une cellule à

l'autre. Les cellules agranulaires, à rapport $\frac{c}{N}$ élevé sont les plus fortement marquées (Fig. 7). Nous envisagerons essentiellement les cellules pourvues de granulations spécifiques.

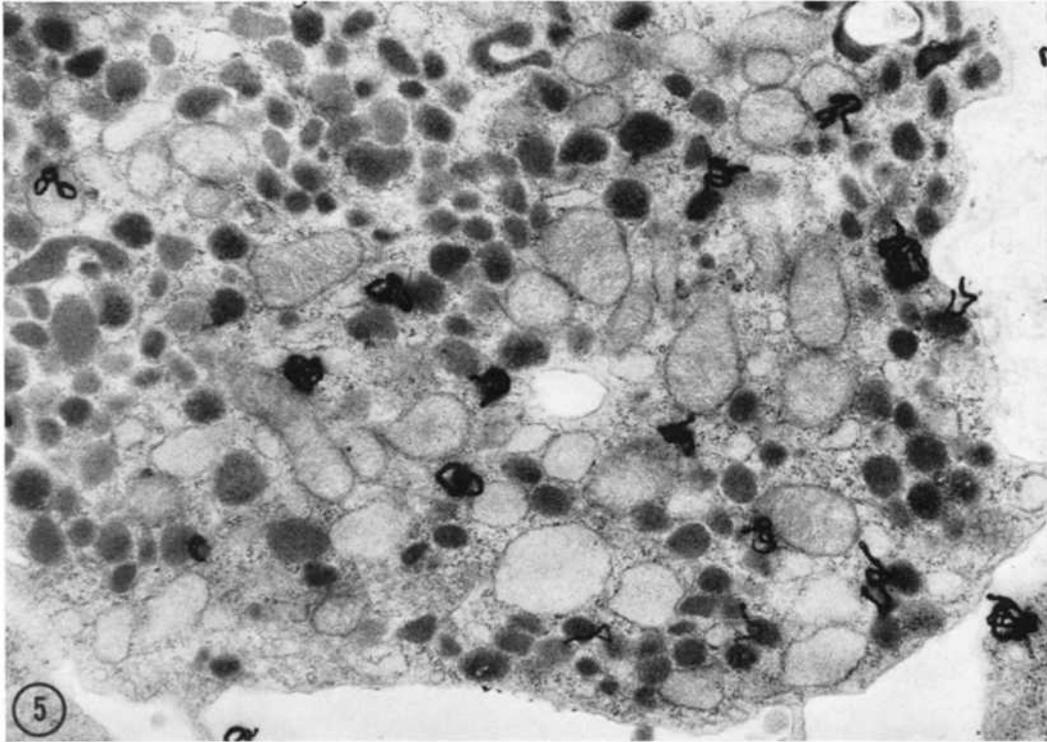


FIGURE 5 Cellule à prolactine après 1 heure de chasse. Détail d'une région du cytoplasme riche en granulations montrant la répartition des grains d'argent sur le cytoplasme et sur les granulations. Citrate de plomb. $\times 22.000$.

CELLULES À PROLACTINE : Les cellules de type A (dont le territoire est occupé en grande partie par des vacuoles ergastoplasmiques dilatées) sont constamment très peu marquées. De plus, quel que soit le temps de chasse, ce marquage reste réparti sur la région ergastoplasmique, en bordure ou à l'intérieur des lacunes, la zone golgienne n'étant jamais marquée. Par contre, les cellules de type B et de type A-B sont marquées et la radioactivité se déplace en fonction du temps sur les différents compartiments.

(a) Au niveau de l'*ergastoplasme*, après $\frac{1}{4}$ heure de chasse, la radioactivité relative (R.R.E.) est encore importante: 41,4% (Tableau I, Fig. 14). Les grains d'argent sont localisés soit sur les lacunes ergastoplasmiques, soit à leur périphérie, soit dans des zones cytoplasmiques contenant des ribosomes libres (Figs. 1, 2). Après 1 heure de chasse, la R.R.E. subit une augmentation brève mais transitoire. Les différences observées après 4, 24, et 48 heures ne sont pas significatives. On

peut donc considérer que la radioactivité de l'*ergastoplasme* reste sensiblement stationnaire pendant toute la période considérée.

Au niveau de l'*appareil de Golgi* (Tableau I, Fig. 14), la R.R. est déjà à son maximum après $\frac{1}{4}$ heures de chasse (43,5%). Mais elle n'est pas significativement différente de la R.R. de l'*ergastoplasme*. Les grains d'argent sont localisés sur les systèmes de saccules (Figs. 1-3) pouvant contenir du matériel dense déjà marqué (Fig. 3). Quelques rares grains d'argent sont localisés sur les granulations protéiques. Après $\frac{1}{2}$ heure de chasse la R.R. de la zone golgienne commence à décroître (la différence approche du seuil de signification (7,9% d'erreur). Mais après 1 heure de chasse, la décroissance est hautement significative. La zone golgienne contient cependant encore 26,2% de la radioactivité cytoplasmique. Sa R.R. va ensuite décroître plus lentement au cours des 3 heures suivantes (de 26,2-17,8%), puis très lentement entre 4 et 24 heures (de 17,8-7,8%). Entre 24 et

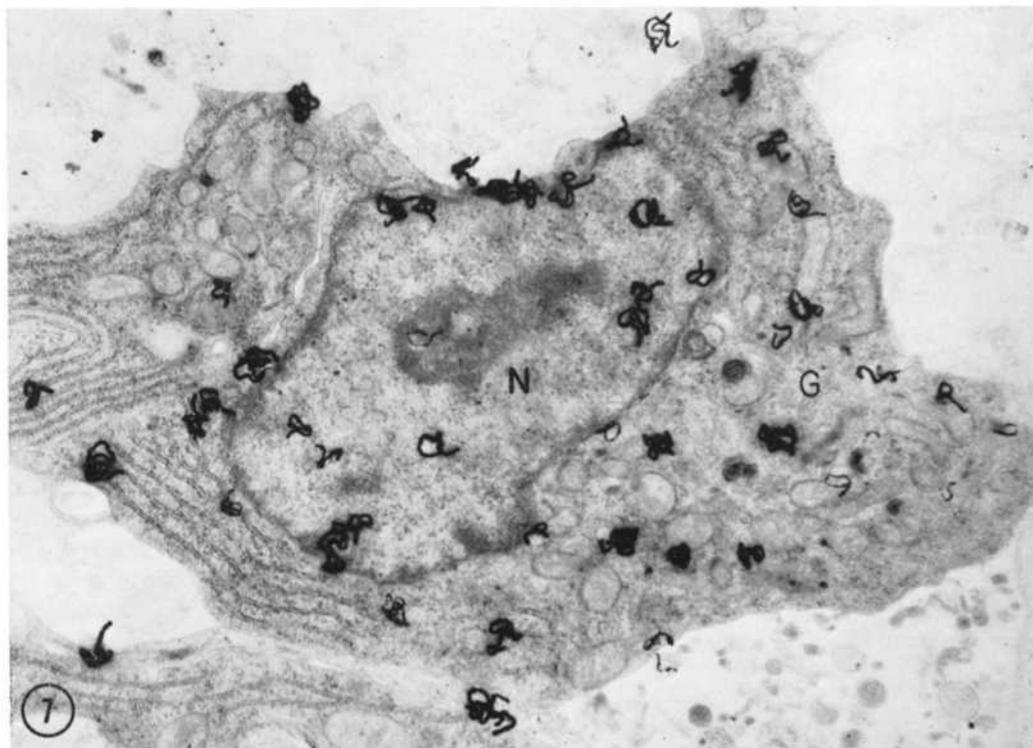
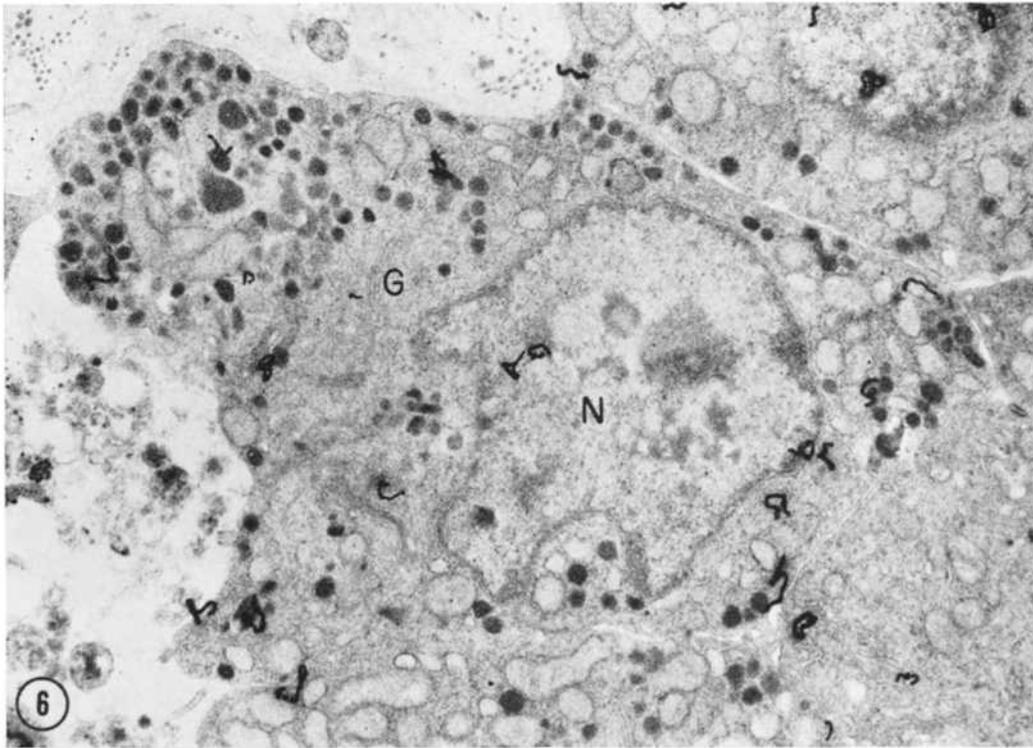


FIGURE 6 Cellule à prolactine après 24 heures de chasse. La répartition des grains d'argent n'est pas modifiée par rapport à la Fig. 4. Acétate d'uranyle. $\times 16.000$.

FIGURE 7 Cellule agranulaire après 1 heure de chasse. L'appareil de Golgi est peu marqué, mais un marquage persistant s'observe sur les structures cytoplasmiques et ergastoplasmiques. Noter le marquage très important du noyau. Citrate de plomb. $\times 22.000$.

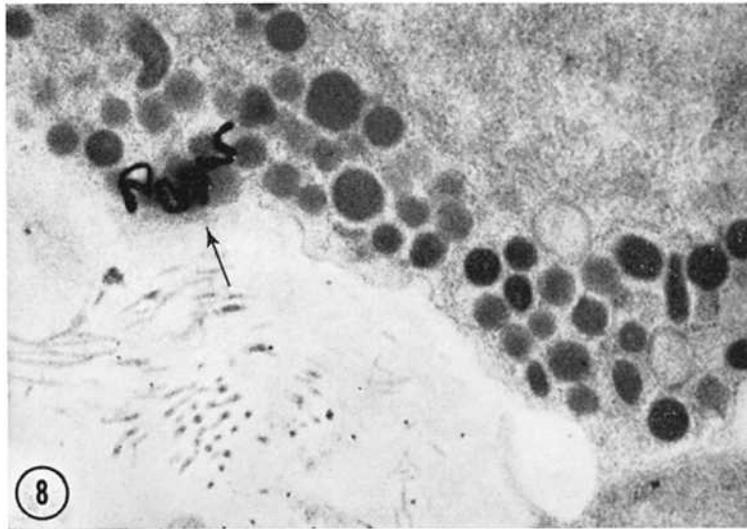


FIGURE 8 Cellule à prolactine après 4 heures de chasse. Granulations marquées en voie d'excrétion (flèche). Acétate d'uranyle. $\times 27.000$.

48 heures, cette valeur reste sensiblement constante. L'appareil de Golgi n'est alors pratiquement plus marqué (Figs. 4, 6). La vidange de la zone golgienne est donc lente. On note qu'elle n'est pas synchrone pour toutes les cellules rencontrées.

Au fur et à mesure que les grains d'argent se raréfient dans la zone golgienne, ils se rencontrent beaucoup plus fréquemment au-dessus des *granulations protéiques* (Figs. 5, 6). La R.R. des granulations suit une courbe inverse de celle de l'appareil de Golgi, traduisant un accroissement hautement significatif à partir de 4 heures de chasse. Au delà de ce temps, la R.R. des grains reste importante mais n'augmente plus que faiblement (Tableau I, Fig. 14). Sa valeur maximum atteint 39,7%. A la fin de la période de chasse, elle n'est donc pas significativement différente de la fraction de la radioactivité cytoplasmique localisée sur les structures ergastoplasmiques. Il nous a été possible d'observer, dans quelques cas, l'excrétion d'un grain protéique marqué d'un grain d'argent, attestant ainsi que les granulations protéiques néo-formées sont excrétées selon le processus habituel (Fig. 8). Indépendamment des granulations protéiques, des grains d'argent se rencontrent sur la membrane cellulaire (10-15% de la radioactivité cytoplasmique).

Si l'on envisage la proportion relative des granulations marquées par rapport à l'ensemble

des granulations protéiques (RSg), l'examen des préparations suggère d'emblée que celle-ci est très faible. Ces faits sont confirmés par les comptages: la valeur maximum du rapport est de 3,1% (Tableau III). Ce maximum très hautement significatif est atteint après 4 heures de chasse. Il est suivi d'une décroissance significative mais faible (de 3,1-1,9%) entre 4 et 48 heures de chasse.

CELLULES DE TYPE MSH: Après 15 minutes de chasse, la concentration des grains d'argent dans la *zone golgienne* est remarquable. Ils forment des amas denses (Fig. 9) au centre des dictyosomes annulaires. Dans certains cas, des grains néo-formés sont déjà marqués au sein de la zone golgienne (Figs. 10 et 11) et beaucoup plus rarement dans le cytoplasme périphérique. La zone golgienne concentre à ce stade 68,4% de la radioactivité cytoplasmique. Au cours des intervalles suivants, soit pendant 4 heures, la R.R. de la zone golgienne subit une chute rapide et très hautement significative, de 68,4%-8,0% (Tableau II, Fig. 14). Elle reste ensuite très basse.

Au niveau de la zone cytoplasmique occupée par les seules *structures ergastoplasmiques*, la R.R. est d'abord trois fois plus faible que celle de la zone golgienne. Elle subit ensuite une augmentation très hautement significative et rapide au cours des 4 premières heures de chasse, puis reste stationnaire jusqu'à 24 heures (47,1%). On remarque que l'évolution de la courbe est inversée par

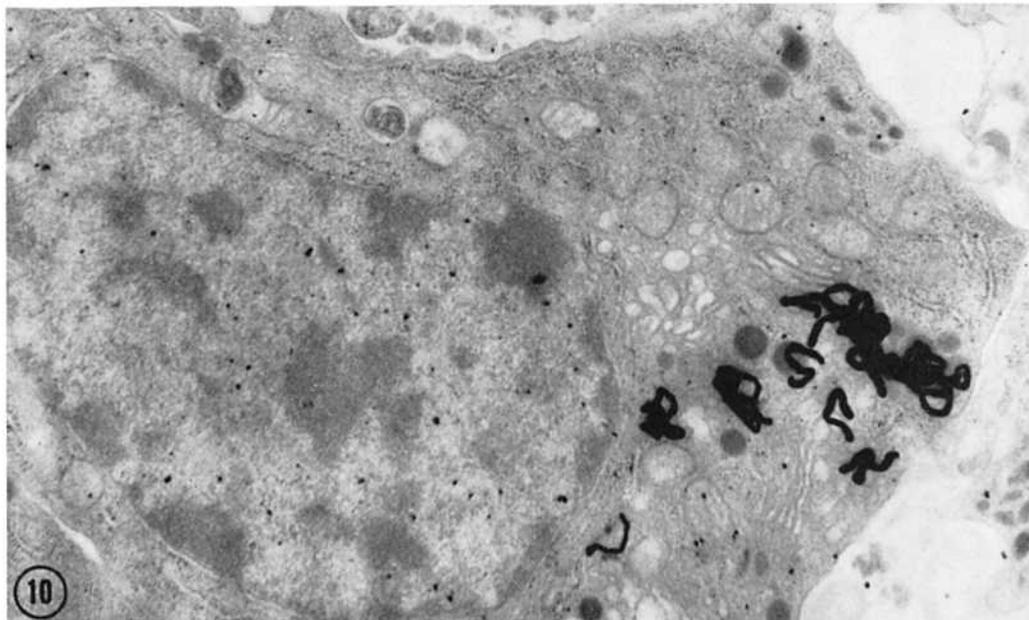
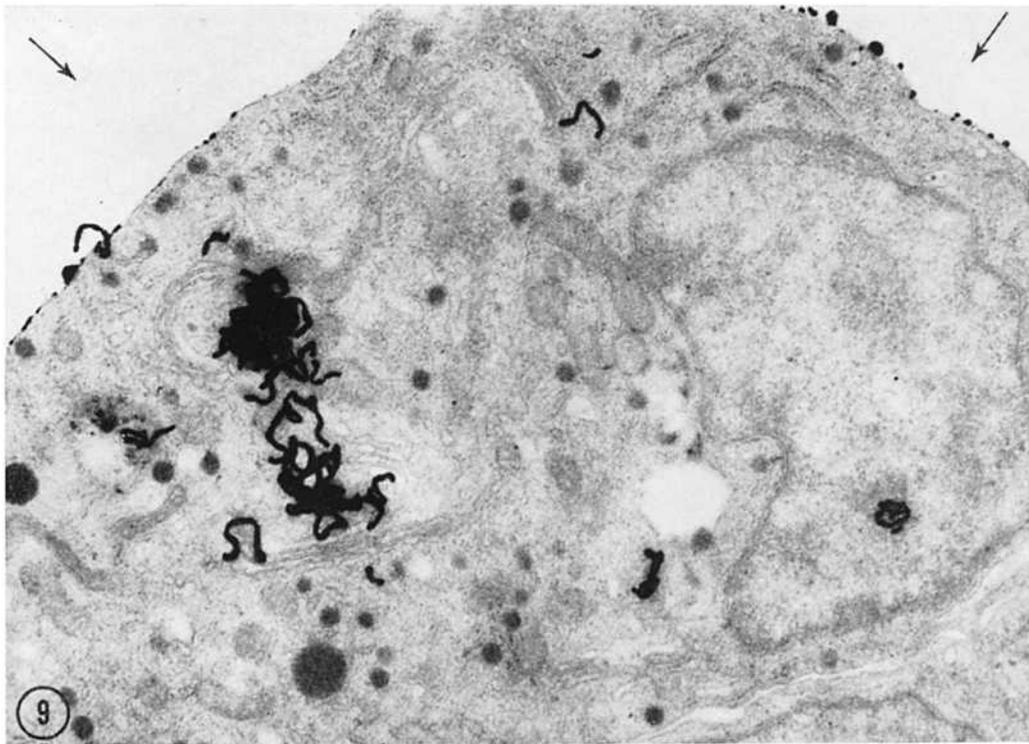


FIGURE 9 Cellule de "type MSH" après 15 minutes de chasse la concentration de la radioactivité dans la zone golgienne est très intense (comparer aux cellules à prolactine Figs. 1, 3). Il s'agit d'une cellule bordante de l'explant. Noter l'absence de radioactivité à l'extérieur de la culture (flèches). Acétate d'uranyle. $\times 24.000$.

FIGURE 10 Cellule de type MSH, après 30 minutes de chasse. Marquage de granulations néoformées au sein de la zone golgienne. Le cytoplasme n'est pas marqué. Acétate d'uranyle $\times 25.000$.

TABLEAU III

Cellules à prolactine: évolution du rapport:

$$\frac{\text{granulations marquées}}{\text{granulations totales}} \% = \text{RSg, en fonction du temps de chasse.}$$

Signification testée par analyse directe de contingence 2×2 (mêmes légendes que tableaux I et II).
(Les signes en bas à gauche indiquent la comparaison entre la valeur mesurée à 15 minutes et chacune des suivantes.)

Temps de chasse	15 minutes	30 minutes	1 heure	4 heures	24 heures	48 heures
Total des granulations	1996	1312	826	1648	2031	1801
Total des granulations marquées.....	15	9	17	52	49	35
RSg.....	0,7	0,6	2,0	3,1	2,4	1,9
		n.s.	xxx	xxx	n.s. ← x xxx	n.s. ← xxx

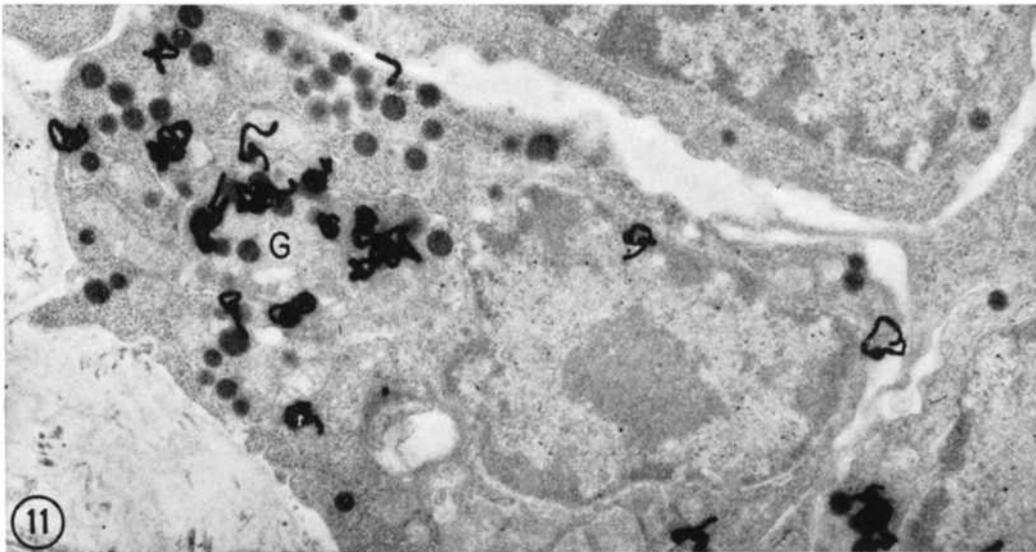


FIGURE 11 Cellule de type MSH après 30 minutes de chasse. Abondance des granulations marquées au voisinage de la zone golgienne. Des grains d'argent sont répartis sur le cytoplasme en dehors des granulations. Acétate d'uranyle. $\times 19.000$.

rapport à celle de la radioactivité relative de la zone golgienne (Fig. 14).

Au niveau des *granulations protéiques*, la fréquence des grains d'argent augmente également au fur et à mesure de la vidange de la zone golgienne (Fig. 12). La R.R. liée aux granulations suit en effet une courbe inversée par rapport à celle de la zone golgienne (Fig. 14). Elle conserve d'abord une valeur très basse pendant la première $\frac{1}{2}$ heure de chasse. Elle présente son accroissement relatif le plus intense au cours de la seconde

$\frac{1}{2}$ heure de chasse (de 7,7-24,8%). Pendant les 3 heures suivantes, elle augmente encore, mais moins rapidement (de 24,8-34%). Au-delà de 4 heures, elle reste sensiblement stationnaire. A la fin de l'expérience, ce compartiment contient 41,5% de la radioactivité cytoplasmique, mais les granulations marquées ne constituent que 6,1% des granulations protéiques totales. La radioactivité spécifique des granulations est donc faible. Elle ne varie pas significativement entre 4 et 24 heures (les données sont ici recueillies dans des

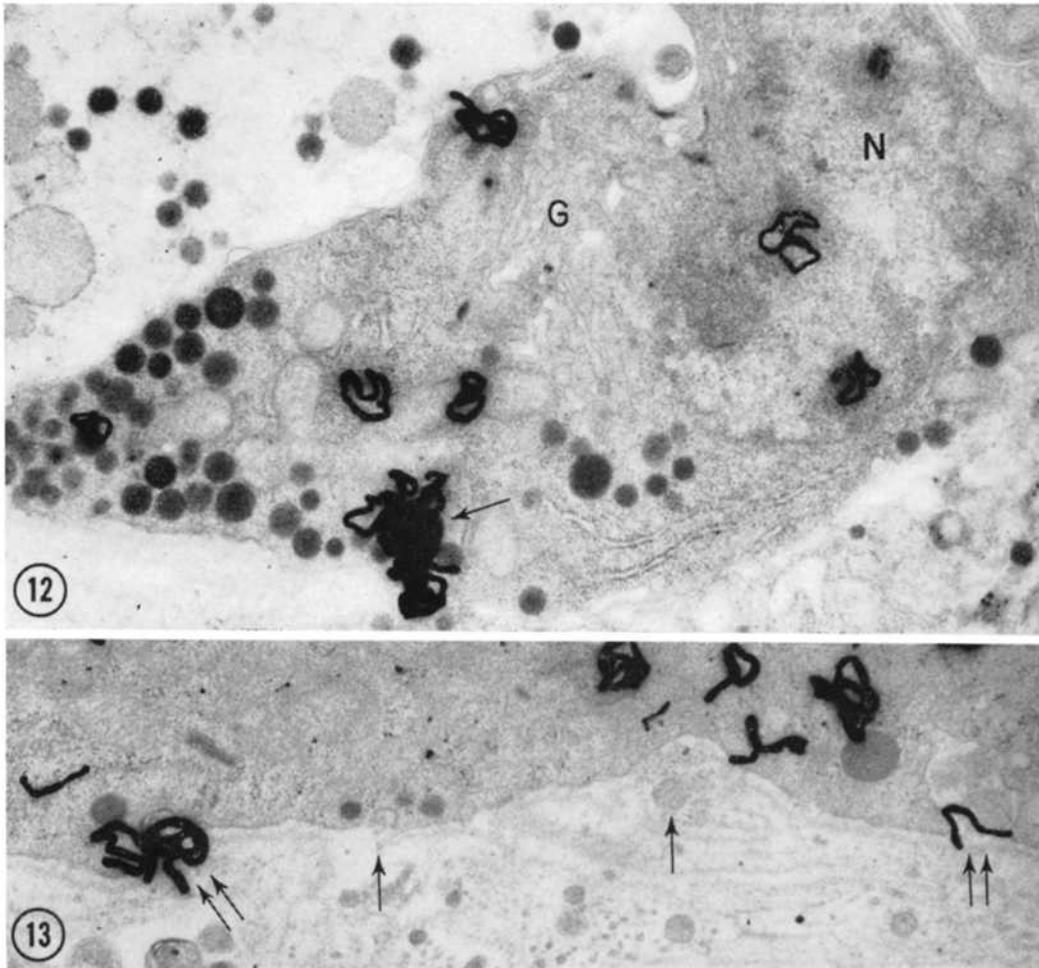


FIGURE 12 Cellule de type MSH après 4 heures de chasse. La zone golgienne est dépourvue de marquage. La proportion des granulations marquées est faible, mais le marquage de celles-ci est intense (flèche) (comparer avec Fig. 5). Acétate d'uranyle. $\times 23.000$.

FIGURE 13 Cellule de type MSH après 8 heures de chasse, détail de la membrane montrant l'excrétion de grains marqués (deux flèches) ou non marqués (une flèche). Noter aussi la radioactivité du cytoplasme. Acétate d'uranyle. $\times 30.000$.

conditions permettant la comparaison). Mais on remarque que les granulations marquées le sont très fortement (plusieurs filaments d'argent pour un même grain), ce qui les distingue des granulations des cellules à prolactine (Figs. 11 et 12). Nous avons pu observer au niveau des cellules de type MSH des images d'excrétion de granulations protéiques marquées (Fig. 13). Comme pour les cellules à prolactine, une proportion comparable de la radioactivité cytoplasmique se trouve liée à

la membrane, mais ces grains d'argent ne sont pas régulièrement associés à des granulations en voie d'excrétion.

DISCUSSION

Critique des Résultats Fournis par la Radioautographie Quantitative

Avant d'aborder l'interprétation biologique des résultats radioautographiques que nous venons de

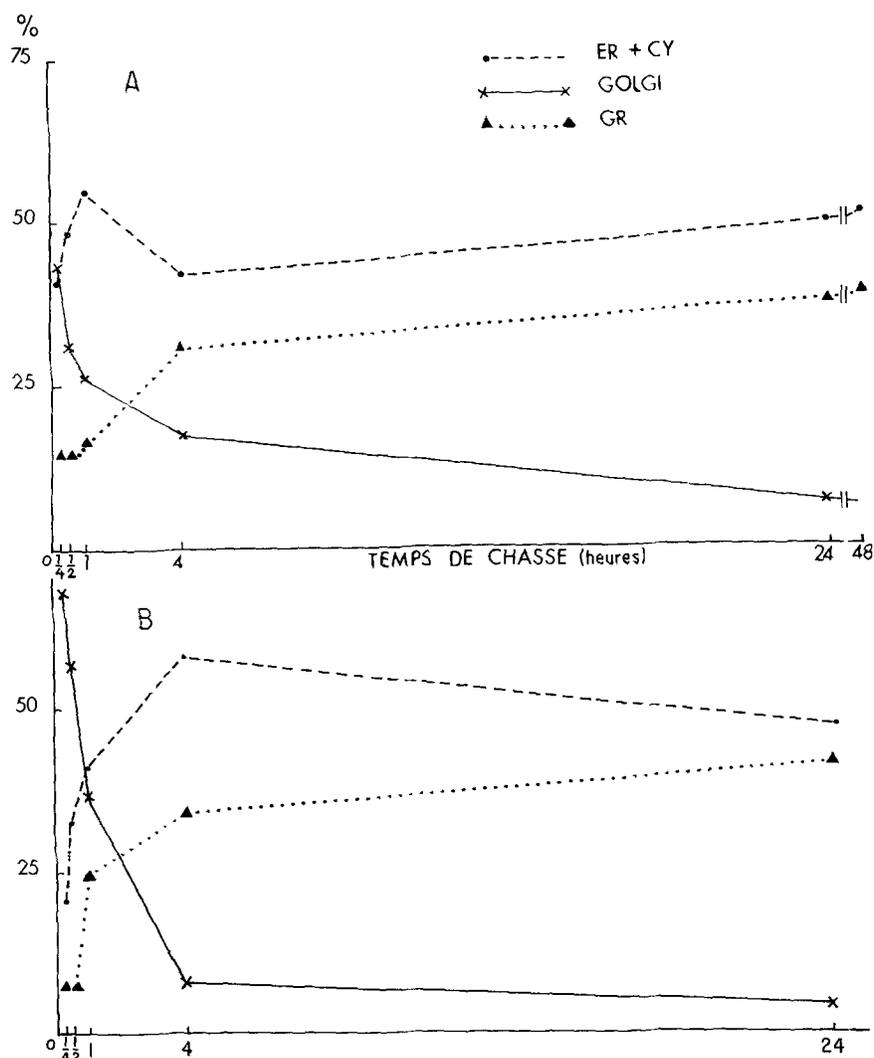


FIGURE 14 Courbes retraçant l'évolution de la radioactivité relative des différents compartiments cytoplasmiques (appareil de Golgi, ergastoplasme-cytoplasme, granulations protéiques) en fonction du temps de chasse. Origine située au début de la période de chasse. A, Cellule à prolactine. B, Cellule de type MSH.

rapporter, il est indispensable de faire une étude critique portant sur: 1°, la résolution de la méthode employée et la validité de la définition des trois compartiments cytoplasmiques que nous avons envisagés; 2°, la définition du temps 0 à partir duquel nous avons suivi l'évolution chronologique des phénomènes; 3°, l'origine de la réaction radioautographique observée après les fixateurs utilisés ici.

RÉSOLUTION ET DÉFINITION DES COMPARTIMENTS CYTOPLASMIQUES: La validité de la définition des différents compartiments cytoplas-

miques envisagés est fonction à la fois du pouvoir de résolution de la méthode et de la dimension des organites intracellulaires. On sait que le pouvoir de résolution de la technique radioautographique est limité par de nombreux facteurs (Caro, 1962, 1964; Salpeter et Bachmann, 1965; Granboulan, 1965; Ross et Benditt, 1965). Dans nos conditions techniques, il est théoriquement compris entre 0,1 et 0,26 μ (Droz et Bergeron, 1965; Droz, 1967).

Au niveau de l'ergastoplasme, la localisation des grains d'argent est rigoureuse lorsque ceux-ci sont situés au-dessus ou en bordure des lacune dilatées

dont le diamètre atteint 0,60–0,70 μ . Par contre, au niveau des ribosomes, des polyribosomes ou des lacunes linéaires, la précision est très mauvaise. Etant donné que dans les deux types cellulaires considérés ici, l'ergastoplasme présente souvent une répartition diffuse dans l'ensemble du cytoplasme, il ne nous est pas possible de distinguer, sauf dans le cas particulier des citernes dilatées des cellules à prolactine, l'ergastoplasme de la substance fondamentale du cytoplasme (ou hyaloplasme).

Au niveau de l'appareil de Golgi dont le diamètre excède largement les limites du pouvoir de résolution, la localisation est exacte. Il en est de même pour la localisation sur un système de saccules (Figs. 1–3) ou à l'intérieur des dictyosomes (Fig. 9).

La localisation sur les granulations protéiques est certainement moins rigoureuse, car celles-ci, par leurs dimensions (0, 25 μ) se situent à la limite du pouvoir de résolution de la méthode (Fig. 5). Nous avons pris comme principe de considérer une granulation protidique comme "marquée," lorsque le centre du cercle circonscrit au grain d'argent susjacent se trouvait sur la granulation. Etant donné que des ribosomes sont fréquemment répartis entre les granulations, une partie de la radioactivité ainsi comptée peut provenir de protéines liées aux ribosomes ou au hyaloplasme.

Ajoutons enfin que tout au long de notre étude, le maximum de précautions a été pris pour assurer la plus grande régularité dans l'épaisseur des coupes, la constance de l'épaisseur de l'émulsion et des conditions de développement.

DÉFINITION DE L'ORIGINE CHRONOLOGIQUE DES PHÉNOMÈNES ENVISAGÉS: Dans les expériences analogues effectuées *in vivo*, l'origine des phénomènes se situe au moment de l'injection du traceur. Au cours de nos expériences, nous avons adopté comme origine le début de la période de chasse. En effet, s'il est facile de définir avec précision la durée du marquage, il est plus difficile de définir celle du lavage (manipulations manuelles pendant 5 minutes environ) et de l'introduire dans le cycle des phénomènes de chasse (température inférieure à celle de la culture, liquide non nutritif).

D'autre part, nos expériences préliminaires portant sur des cultures rigoureusement comparables (Tixier-Vidal et collab., 1965) ont permis d'établir qu'après 10–15 minutes de contact avec

le traceur, les protéines néosynthétisées sont localisées sur l'ergastoplasme (en bordure et à l'intérieur des lacunes) et qu'elles abordent la périphérie de l'appareil de Golgi. Vis-à-vis des expériences effectuées *in vivo*, nos observations commencent donc un peu plus tard. C'est le déplacement des protéines marquées à partir de l'ergastoplasme que nous avons suivi au cours de nos expériences.

ORIGINE DE LA RÉACTION RADIOAUTOGRAPHIQUE DANS LES CONDITIONS DE FIXATION UTILISÉES: Des recherches récentes (Peters et Ashley, 1967; Droz, 1967) ont montré que, après fixation à la glutaraldéhyde ou à l'acide osmique, une partie de la DL-³H-leucine libre dans les tissus est retenue par des liaisons non peptidiques. Nous devons tenir compte de cette cause d'erreur dans l'interprétation de nos résultats radioautographiques. Cette radioactivité parasite étant proportionnelle à la concentration en acide aminé marqué libre dans le tissu, elle devrait être très faible au cours de nos expériences de chasse effectuées en présence de DL-leucine-³H et après le lavage très important des explants. Cependant, ces précautions n'éliminent pas les risques de liaisons non peptidiques de molécules d'acides aminés marqués résultant éventuellement du catabolisme intracellulaire de protéines marquées récemment synthétisées.

Interprétation des Résultats

Radioautographie: Hypothèses sur le trajet des Protéines Néosynthétisées

Tenant compte des causes d'imprécision liées à la technique radioautographique, il nous paraît cependant possible d'établir à partir des résultats exposés ci-dessus, des hypothèses relatives au trajet des protéines néosynthétisées dans les deux types de cellules hypophysaires envisagés au cours de ce travail. Pour le moment, ces hypothèses ne pourront être confrontées à des données biochimiques établies sur le même matériel, ni même sur un matériel analogue. Il n'existe en effet, à notre connaissance, aucune étude biochimique sur les mécanismes de la biosynthèse des hormones hypophysaires.

Rappelons tout d'abord que nos recherches préliminaires (Tixier-Vidal et collab., 1965) nous ont montré que, chronologiquement, c'est au niveau de l'ergastoplasme que s'observent les premiers grains d'argent de la réaction radioauto-

graphique. On en conclut que l'ergastoplasme constitue le premier site de synthèse des protéines néoformées. Comment peut-on envisager la migration de celles-ci à l'aide de nos présents résultats?

Dans les deux types cellulaires (prolactine et MSH), la radioactivité de l'appareil de Golgi est déjà à son maximum après 15 minute de chasse. Ce fait ne suffit pas pour affirmer que ces protéines golgiennes proviennent en totalité de l'ergastoplasme. Par contre, deux ordres de fait militent fortement en faveur de l'origine golgienne des protéines granulaires marquées: 1°, il existe des granulations néoformées marquées au sein de la zone golgienne; 2°, la courbe de décroissance de la R.R. de la zone golgienne est inverse de celle de la R.R. des granulations protéiques. On remarque que si le processus est identique dans les deux types cellulaires, ses modalités chronologiques diffèrent de l'un à l'autre: la vidange de la zone golgienne étant beaucoup plus rapide dans le cas de la cellule à MSH.

Les protéines radioactives ayant ainsi migré de la zone golgienne dans les granulations protéiques ne représentent qu'un faible pourcentage des granulations protéiques de la cellule, ainsi qu'on en juge par la faible "radioactivité spécifique" des granulations. Celle-ci subit une décroissance très lente, mais significative au cours de la période de chasse: de 3,1-1,9% entre 4 et 48 heures, soit une chute relative de plus du $\frac{1}{3}$ de la valeur maximum. Il y a donc bien dilution des protéines granulaires marquées au cours de la période de chasse. Cette dilution peut être attribuée à la fois à l'excrétion de granulations marquées et à la néosynthèse de granulations non marquées. Ces faits—la valeur basse de la RSg et sa lente et tardive décroissance—contrastent fortement avec la valeur de la R.R. des granulations et sa croissance précoce et rapide. Il semble donc que la migration hors de la zone golgienne des protéines néosynthétisées, d'une part, et la migration des granulations hors de la cellule, d'autre part, soient réglées par des mécanismes différents. Les données de la radioautographie conduisent à penser que le temps de renouvellement des granulations est long, mais ne permettent pas de le calculer exactement.

L'évolution de la R.R. de l'ergastoplasme au cours de la période de chasse pose des problèmes très difficiles à résoudre et qui diffèrent d'un type cellulaire à l'autre.

Dans le cas de la cellule à prolactine, il semble

clair qu'une partie des protéines néosynthétisées reste soit dans l'ergastoplasme, à l'intérieur ou en bordure des citernes dilatées, soit dans le hyaloplasme. L'évacuation lente de la zone golgienne pourrait être la conséquence d'une migration très lente des protéines néosynthétisées hors des structures ergastoplasmiques offrant dans le cas de la cellule à prolactine des possibilités de stockage. Il y aurait là un argument en faveur de l'origine ergastoplasmique de la radioactivité golgienne. Par ailleurs, la radioactivité de l'ergastoplasme ou du hyaloplasme peut représenter également des protéines "sédentaires." Nous ne pouvons faire la part exacte de chacune de ces deux possibilités.

Au niveau de la cellule à MSH, l'ergastoplasme, qui ne comporte jamais de citernes dilatées, ne contient après $\frac{1}{4}$ heure de chasse que le $\frac{1}{3}$ de la radioactivité de la zone golgienne. Mais au cours du déroulement de la période de chasse, on assiste à une augmentation de la R.R. du compartiment ergastoplasme-hyaloplasme, au fur et à mesure de la vidange golgienne. Tout se passe comme si une partie des protéines dérivant de la zone golgienne retournaient dans le hyaloplasme (que nous ne pouvons dissocier de l'ergastoplasme). Ceci pose un problème difficile pour lequel plusieurs interprétations peuvent être avancées. 1°, Il s'agit réellement de protéines de structures dérivant de la zone golgienne. Ce phénomène a rarement été observé jusqu'ici, mais à priori, il ne semble pas impossible. Notons à ce propos que les cellules à MSH ont des propriétés histochimiques très différentes de celles des cellules à prolactine (Tixier-Vidal, Herlant, et Benoit, 1962). 2°, Ces protéines résultent d'une incorporation continue de molécules de leucine- ^3H . Il semble peu probable que celles-ci proviennent du marquage initial, étant donné d'une part nos conditions de lavage et d'autre part le fait que la radioactivité du cytoplasme-ergastoplasme est d'abord faible après 15 minutes de chasse et celle de l'appareil de Golgi très faible après 24 et 48 heures. Par contre, il pourrait y avoir réutilisation de molécules de leucine- ^3H provenant du catabolisme cellulaire des protéines récemment synthétisées et marquées et dont le renouvellement serait rapide. 3°, Ces mêmes molécules de ^3H -leucine pourraient être retenues par des liaisons non peptidiques au moment de la fixation. Nous ne disposons d'aucun argument pour choisir une de ces trois hypothèses.

Conclusion Générale

Nos résultats radioautographiques permettent de conclure à l'origine golgienne des protéines granulaires. Ils sont sur ce point en accord avec les conclusions de Racadot et collab. (1965) établies *in vivo* et sur l'hypophyse du Rat. Les cellules sélectionnées par ces auteurs (somatotropes?) ont un plan d'organisation ultrastructural voisin de celui de nos cellules à MSH. Effectivement, le détail des phénomènes est identique dans les deux cas: forte condensation dans la zone golgienne, vidange totale et rapide de cette même zone en $\frac{1}{2}$ heure, suivie d'une concentration accusée de la radioactivité sur un petit nombre de granulations. Nous constatons en outre que le phénomène de la vidange golgienne peut être beaucoup plus lent quand le plan d'organisation ultrastructural de la cellule est différent. La présence de lacunes ergastoplasmiques dilatées assurerait une possibilité de stockage supplémentaire, s'ajoutant à celle offerte par les granulations. L'éventualité d'une double localisation de l'hormone a déjà été envisagée pour d'autres types cellulaires hypophysaires (cf. Herlant, 1964).

Nos résultats de radioautographie quantitative montrent que le taux d'incorporation du précurseur dans la fraction granulaire (vraisemblablement hormonale) est très faible. On en conclut que la cellule hypophysaire possède un stock important de granulations dont le renouvellement est très lent, mais nos résultats quantitatifs ne permettent pas de calculer ce temps de renouvellement.

Enfin, nos résultats posent le problème des protéines non granulaires (ergastoplasme ou hyaloplasme) qui représentent dans la cellule hypophysaire une fraction importante des protéines cytoplasmiques et font l'objet d'une synthèse active. Ce fait rapproche la cellule hypo-

physaire du myélocyte (Fedorko et Hirsch, 1966) et du fibroblaste (Ross et Benditt, 1965). Etant donné que dans nos cultures la croissance tissulaire est très faible, ces protéines représentent ici vraisemblablement des protéines "sédentaires" plutôt que des protéines de "renouvellement" (Leblond, 1965).

Dans l'ensemble, ces conclusions doivent être soumises à un contrôle biochimique pour acquérir leur validité. Celui-ci devra porter sur: 1° l'évolution en fonction du temps de chasse de la radioactivité spécifique des protéines contenues dans les explants d'une part, libérées dans le milieu de culture d'autre part. 2° l'évolution de la radioactivité spécifique de l'hormone élaborée par chacun des deux types cellulaires. A notre connaissance, aucun travail de ce type n'a encore été fait sur l'antéhypophyse. Signalons cependant que dans une récente étude consacrée à l'influence des androgènes sur la biosynthèse de l'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse du Rat (Wakabayashi et Tamaoki, 1967), le rapport entre la radioactivité de la fraction LH marquée et celle de la totalité des protéines marquées de la glande est de l'ordre de 1-100. Bien que les conditions expérimentales soient très différentes des nôtres, ceci laisse supposer que le taux d'incorporation du précurseur dans une fraction hormonale est faible par rapport à l'ensemble des protéines de la glande (comportant ici cinq autres hormones). Ceci semble en accord avec nos observations.

L'analyse statistique des résultats a été effectuée par Monsieur Gérard Vassent, du laboratoire de Morphologie Expérimentale du Collège de France, que nous remercions très vivement. Nous remercions également Mlle Maryvonne Le Falchier pour sa collaboration technique aux cultures d'hypophyse et Monsieur Claude Pennarun pour les photographies.

Received for publication 31 March 1967; revision accepted 13 June 1967.

BIBLIOGRAPHIE

1. BARNES, B. 1963. The fine structure of the mouse adenohypophysis in various physiological states. In *Cytologie de l'adénohypophyse*. J. Benoit et C. Da Lage, éditeurs. Editions du C.N.R.S., Paris. 91.
2. CARO, L. G. 1962. High resolution autoradiography. II. The problem of resolution. *J. Cell Biol.* 15:189.
3. CARO, L. G. 1964. High resolution autoradiography. In *Methods in Cell Physiology*. 1:327.
4. DROZ, B. 1967. Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires. Etude radioautographique quantitative en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6:201.
5. DROZ, B., et M. BERGERON. 1965. Détection radioautographique de protéines nouvellement synthétisées à partir de leucine H³ dans les mitochondries du foie et du rein chez le Rat. *Compt. Rend.* 261:2757.

6. DUCOMMUN, S. 1965. Etude autoradiographique de l'incorporation de la proline tritiée par les cellules basophiles de l'adénohypophyse du Rat. *Ann. Endocrinol.* **26**:385.
7. FEDORKO, M. E., et J. G. HIRSCH. 1966. Cytoplasmic granule formation in myelocytes. An electron microscope radioautographic study on the mechanism of formation of cytoplasmic granules in rabbit heterophilic myelocytes. *J. Cell Biol.* **29**:307.
8. GOURDJI, D., ET A. TIXIER-VIDAL. 1966. Mise en évidence d'un contrôle hypothalamique stimulant de la prolactine hypophysaire chez le Canard. *Compt. Rend.* **263D**:162.
9. GRANBOULAN, P. 1965. Comparison of emulsions and techniques in electron microscope radioautography. Symposia of the International Society for Cell Biology. **4**:43.
10. HERLANT, M. 1964. The cells of the adeno-hypophysis and their functional significance. *Intern. Rev. Cytol.* **17**:299.
11. KOBAYASHI, T., T. KOBAYASHI, T. KIGAWA, M. MIZUNO, Y. AMENOMORI, ET T. WATANABE. 1965. Autoradiographic studies on ³H-Leucine uptake by adeno-hypophysial cells in vitro. *Endocrinol. Japon.* **12**:47.
12. LEBLOND, C. P. 1965. What radioautography has added to protein lore. In Symposia of the International Society for Cell Biology. **4**:321.
13. LISON, L. 1958. Chapter 10, Statistique Appliquée à la Biologie Expérimentale. Gauthier-Villars, Paris.
14. PETERS, T., et C. A. ASHLEY. 1967. An artefact in radioautography due to binding of free amino acids to tissue by fixatives. *J. Cell Biol.* **33**:53.
15. RACADOT, J., L. OLIVIER, E. PORCILE, et B. DROZ. 1965. Appareil de Golgi et origine des grains de sécrétion dans les cellules adéno-hypophysaires chez le Rat. Etude autoradiographique en microscopie électronique après injection de leucine tritiée. *Compt. Rend.* **261**:2972.
16. ROSS, R., et E. P. BENDITT. 1965. Wound healing and collagen formation. V. Quantitative electron microscope radioautographic observations of proline-H³ utilization by fibroblasts. *J. Cell Biol.* **27**:83.
17. SALPETER, M. M., et L. BACHMANN. 1965. Assessment of technical steps in electron microscope autoradiography. Symposia of the International Society for Cell Biology. **4**:23.
18. SIPERSTEIN, E. R. 1963. Identification of the adrenocorticotrophin-producing cells in the rat hypophysis by autoradiography. *J. Cell Biol.* **17**:521.
19. STEEL, G. D., et TORRIE, J. S. 1960. Chapter 19, Principles and procedures of statistics. McGraw Hill Publishing Co., New York. 19-8.
20. TIXIER-VIDAL, A. 1965. Caractères ultrastructuraux des types cellulaires de l'adénohypophyse du canard mâle. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl.* **54**:719.
21. TIXIER-VIDAL, A., M. HERLANT, et J. BENOIT. 1962. La préhypophyse du Canard Pékin mâle au cours du cycle annuel. *Arch. Biol.* **73**:317.
22. TIXIER-VIDAL, A., S. FISKE, R. PICART, et F. HAGUENAU. 1965. Autoradiographie au microscope électronique de l'incorporation de leucine tritiée par l'hypophyse du Canard en culture organotypique. *Compt Rend.* **261**:1133.
23. TIXIER-VIDAL, A., et D. GOURDJI. 1965. Evolution cytologique ultrastructurale de l'hypophyse du Canard en culture organotypique. Elaboration autonome de prolactine par les explants. *Compt. Rend.* **261**:805.
24. WAKABAYASHI, K., et B. TAMAOKI. 1967. In vivo and in vitro effects of androgens on the biosynthesis of luteinizing hormone (LH) in the anterior pituitary glands of male rats. *Endocrinology.* **80**:409.