

Méthodes alternatives : développement et utilisation de deux modèles "in vitro" pour des études endocriniennes

Autor(en): **Bestetti, G.E. / Boujon, C.E. / Tontis, D.K.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **131 (1989)**

Heft 9

PDF erstellt am: **18.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-592649>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

MÉTHODES ALTERNATIVES: DÉVELOPPEMENT ET UTILISATION DE DEUX MODÈLES «IN VITRO» POUR DES ÉTUDES ENDOCRINIENNES

G. E. BESTETTI, C. E. BOUJON, D. K. TONTIS, U. FORSTER, S. GRIMM, G. L. ROSSI

RÉSUMÉ

Les études endocriniennes sont souvent effectuées en utilisant plusieurs groupes d'animaux: un premier groupe pour des dosages quantitatifs d'hormone tissulaire et plasmatique sous conditions basales, un deuxième groupe pour les mêmes mesures après traitement «in vivo» des animaux (stimulation ou inhibition endocrinienne) et deux groupes supplémentaires pour les études morphologiques correspondantes. Dans le cadre du traitement «in vivo», des interventions chirurgicales sont très souvent nécessaires. En outre, les résultats provenant des différents groupes doivent être extrapolés pour obtenir une interprétation unitaire de l'expérience.

Pour éliminer ces inconvénients, nous avons développé deux modèles «in vitro» qui permettent d'étudier sur des tissus provenant d'un même animal: 1. le fonctionnement et la structure de l'hypothalamus et 2. le fonctionnement et la morphologie de cellules hypophysaires isolées. Grâce à une combinaison rationnelle des investigations biochimiques, morphologiques et densitométriques sur plusieurs tissus provenant d'un même animal, nos deux modèles permettent de réduire fortement le nombre d'animaux nécessaires pour une étude endocrinienne. En outre les expériences «in vivo» sont remplacées par des expériences «in vitro», les méthodes d'investigation sont raffinées et une extrapolation des résultats entre les groupes peut être évitée.

MOTS-CLÉS: méthodes alternatives – modèles «in vitro» – endocrinologie – hypothalamus – hypophyse

ALTERNATIVE METHODS: DEVELOPMENT AND USE OF TWO "IN VITRO" MODELS FOR ENDOCRINOLOGICAL STUDIES

Most endocrinological studies are normally performed on several animal groups: one group for the determination of hormonal levels in tissues and plasma under basal conditions, a second group for the same determinations after "in vivo" treatment of the animals (stimulation or inhibition of the endocrine activities) and two additional groups for morphological investigations. Surgical approaches belong not rarely to the "in vivo" treatment of the animals. Moreover, the results from the different animal groups have to be extrapolated.

In order to overcome these drawbacks, we have developed two "in vitro" models by means of which we can study on the tissues from the same animal: 1. function and structure of the hypothalamus and 2. function and structure of isolated pituitary cells.

By using these models we can considerably reduce the number of animals needed for the studies, replace the "in vivo" by the "in vitro" experiments and refine the methods avoiding, among others, the extrapolation of results.

KEY WORDS: alternative methods – "in vitro" models – endocrinology – hypothalamus – pituitary gland

INTRODUCTION

Le système endocrinien est un centre de contrôle important du métabolisme intermédiaire. C'est pour cette raison

que la majorité des études endocriniennes ont une grande importance dans les recherches fondamentales et appliquées effectuées dans les universités et l'industrie.

Ces études se déroulent souvent d'après un schéma complexe, qui fait intervenir: a) des mesures quantitatives de l'hormone dans le tissu et le plasma (par test radioimmuno-logique ou par méthode immunoenzymatique) pour un groupe d'animaux, en conditions basales, b) ces mêmes mesures dans un second groupe d'animaux après un traitement «in vivo» (stimulation et/ou inhibition de la sécrétion hormonale), et c) des investigations morphologiques (microscopie photonique et électronique conventionnelle et immunohistochimie, morphométrie, stéréologie) sur les tissus de deux groupes supplémentaires, l'un en conditions basales, l'autre après traitement «in vivo».

Par conséquent, l'interprétation correcte d'une grande partie des expériences endocriniennes a souvent nécessité: a) un grand nombre d'animaux (4 groupes), et b) des expériences «in vivo» qui comprennent souvent des interventions chirurgicales. En outre, les résultats doivent être extrapolés entre les groupes, afin d'obtenir une interprétation unitaire de l'expérience.

Pour éliminer ces handicaps, nous avons développé deux modèles «in vitro» en employant du tissu hypothalamique et hypophysaire comme base de travail, car ces tissus endocriniens sont importants et de nature complexe. Notre premier modèle permet des investigations fonctionnelles et morphologiques sur l'hypothalamus médiobasal (MBH), le second rend possible des études fonctionnelles et morphologiques sur des cellules isolées de la glande hypophysaire du même animal.

Ces modèles permettent des études reproductibles «in vitro» sur de faible quantité de tissu, ainsi qu'une combinaison des aspects morphologiques et fonctionnels.

Le but de ces méthodes est de réduire le nombre d'animaux utilisés, de remplacer des expériences «in vivo» par des études «in vitro» et de raffiner la technique en évitant l'extrapolation des résultats.

UTILISATION DES MODÈLES DÉVELOPPÉS

Notre premier modèle «in vitro» permet l'étude des aspects fonctionnels et morphologiques sur un même MBH (Boujon et al., 1987; Bestetti et al., 1987a). Ainsi, l'hypothalamus est étudié dans des conditions basales ou de stimulation et les sécrétions hormonales du MBH peuvent être dosées dans le milieu d'incubation. A la fin du traitement «in vitro» le MBH est fixé et préparé pour des investigations conventionnelles et immunohistochimiques en microscopie photonique et électronique. La bonne préservation du tissu permet toutes sortes d'investigations morphologiques qualitatives et quantitatives.

Notre deuxième modèle permet de combiner des études structurales et fonctionnelles sur les mêmes cellules hypophysaires isolées. Il est basé sur le «reverse haemolytic plaque assay» (Smith et al., 1986) avec modifications personnelles (Rossi et al., 1987; Rossi et al., 1988).

MÉTHODOLOGIE

Des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 3 mois sont utilisés comme donneurs de tissus. Ils sont maintenus dans des conditions d'environnement et de diète standard.

Suite à une légère narcose par inhalation d'halothane (May et Baker LTD., Dagenham, England; l'animal est exposé à une faible concentration d'halothane environ pendant 15 secondes), les rats sont tués par décapitation et le sang est récolté pour des déterminations ultérieures des niveaux plasmatiques d'hormones; la boîte crânienne est ouverte, le cerveau et l'hypophyse sont rapidement isolés et le MBH est disséqué à l'aide de ciseaux fins pour chirurgie de l'iris.

Modèle pour l'étude «in vitro» du MBH

L'échantillon de tissu prélevé est limité antérieurement par le chiasma optique, postérieurement par les corps mamilaires et latéralement par les artères carotides internes (Fig. 1, a-c). Sa forme est lenticulaire et son épaisseur maximale ne doit pas dépasser 1 mm. L'échantillon contient l'éminence médiane, la moitié ventrale du noyau arqué et la partie basale du noyau ventromédial.

Après dissection, le tissu est immédiatement placé dans le système d'incubation qui contient un milieu «basal» ou de «stimulation». Le temps entre la décapitation et l'immersion du MBH est inférieur à 3 min. La quantité de neuro-peptides (p. e. LHRH, TRH) relâchée par le tissu est déterminée par dosages radioimmunologiques (Boujon et al., 1987; Bestetti et al., 1987a). A la fin de l'incubation, le tissu est fixé, coupé, puis enrobé dans de la résine de «Spurr» à faible viscosité et des coupes semi-fines et fines sont confectionnées. Des études morphométriques en microscopie photonique, ultrastructurales en microscopie électronique et densitométriques en immunohistochimie (p. e. pour LHRH, TRH) permettent d'établir une relation directe entre le comportement fonctionnel et l'aspect morphologique d'un même échantillon hypothalamique.

1. Détails du système d'incubation (Fig. 2)

Une bonbonne contenant 95% O₂ et 5% CO₂ est connectée à deux débitmètres-régulateurs massiques (Modèle 5850 TR, Brooks Instrument B. V., Veenendaal, Hollande) couplés à

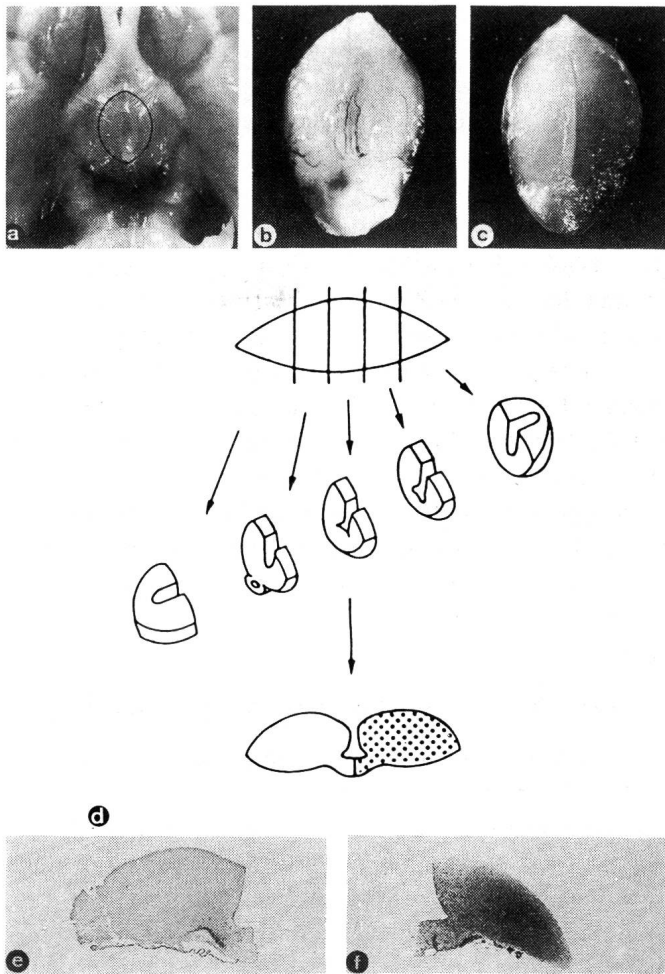


Fig. 1: Isolation de l'hypothalamus. a Vue ventrale du cerveau montrant les limites de l'échantillon prélevé. b Vue ventrale de l'échantillon. c Vue dorsale de l'échantillon. d Représentation schématisée tridimensionnelle de la coupe du morceau hypothalamique. e, f Coupes semi-fines. e Moitié gauche non postfixée, anti-LHRH, méthode à la phosphatase alcaline. f Moitié droite postfixée, coloration au bleu de toluidine. x53 (de Neuroendocrinology 45: 311-317, 1987).

un indicateur de flux (Modèle 5876, Brooks Instrument B. V., Veenendaal, Hollande) qui délivrent chacun 4 ml de gaz/min dans un tuyau vinyle relié à une bouteille d'humidification.

Un capillaire en silicone (diamètre interne: 0,76 mm, Silastic, Dow Corning Co., Midland, Mich., U.S.A.) sort de chaque bouteille et délivre 4 ml de gaz/min dans chacune des deux chambres d'incubation. Après mélange avec le milieu, le gaz quitte les éprouvettes par deux tronçons d'aiguilles fixés dans leur couvercle.

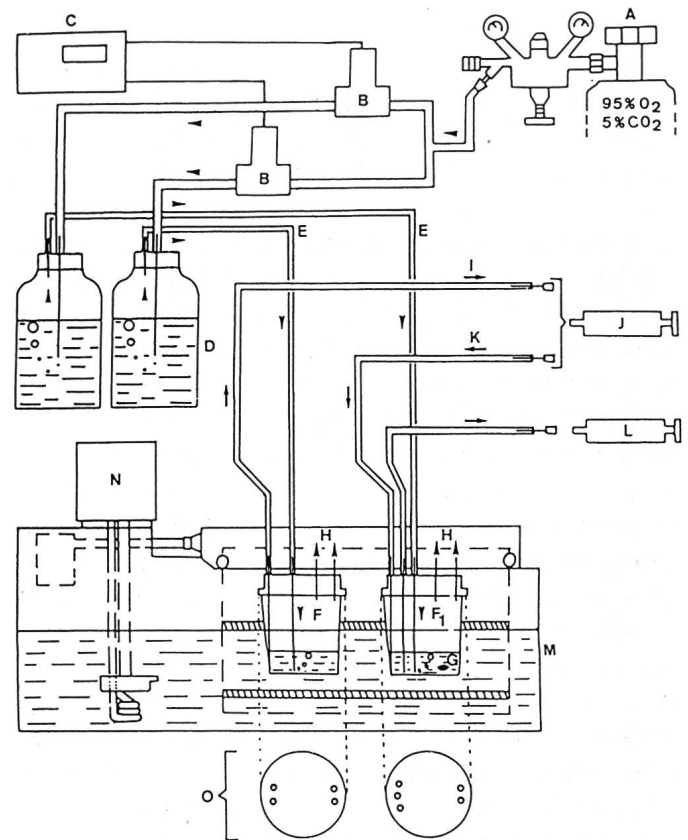


Fig. 2: Représentation schématique du système d'incubation. Bonbonne et réducteur de pression (A). Débitmètre-régulateur massique (B). Indicateur de flux (C). Bouteilles d'humidification (D). Capillaires d'amenée du gaz aux éprouvettes (E). Chambre d'incubation (F) et chambre contenant le milieu de réserve (F). Hypothalamus (G). Aiguilles d'évacuation du gaz (H). Capillaires et seringues (I, J, K, L). Incubateur (M). Thermostat (N). Vue en plan de la position des aiguilles dans les bouchons des éprouvettes (O).

Nous utilisons une chambre d'incubation et une chambre de réserve constituées chacune d'une éprouvette de 2 ml en polystyrène (Milian Instrument S.A., Genève, Suisse) fermée par un bouchon étanche en polyéthylène. Ce dernier est transpercé par des segments d'aiguilles hypodermiques (Luer 0,9 × 40 mm), fixés par une colle à base de cyanoacrylate. Il y a cinq aiguilles dans l'éprouvette d'incubation et quatre aiguilles dans celle contenant le milieu de réserve. Dans chaque chambre, deux segments d'aiguille dépassent de 5 mm la surface inférieure du bouchon, alors que les autres touchent le fond de la chambre. Les deux éprouvettes sont emboîtées dans un support en verre acrylique, placé dans un bain-marie à 37 °C, sous agitation à 140 mouvements/min.

Chaque éprouvette contient 0,4 ml de milieu de «Locke». Le milieu basal est composé de 2 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Merck, Darmstadt, Allemagne), 154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 6 mM Na HCO_3 , 10 mM glucose, 1,25 mM $CaCl_2$ (Drouva et al., 1981), 2×10^{-2} mM de bacitracine (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.; McKelvy et al., 1976; Rotsztein et al., 1976). La bacitracine inhibe l'activité des protéases endogènes.

Dans le milieu de «stimulation», la concentration de KCl est augmentée à 61,6 mM et celle de NaCl réduite à 98 mM. Différentes seringues permettent de prélever le milieu de la chambre d'incubation et de la substituer par celui de la chambre de réserve après chaque période expérimentale. Le milieu prélevé est congelé à $-70^\circ C$ dans un tube en polystyrène. Tous les tubes et éprouvettes ont été prétraités dans une solution eau distillée-Tween 20 0,05%, puis rincés plusieurs fois à l'eau distillée.

2. Incubation de l'hypothalamus

Un pH de $7,10 \pm 0,03$ et une température de $37^\circ C$ sont atteints 5 minutes après l'immersion de la chambre dans l'incubateur si un milieu de 0,4 ml est soumis à un flux gazeux de 4 ml/min. Chaque échantillon d'hypothalamus est lavé pendant 10 min, préincubé pendant 20 min, puis incubé pendant 20 min dans le milieu «basal» ou de «stimulation». A la fin de l'incubation, le tissu est fixé dans une solution modifiée de Karnowsky (Rossi et al., 1983).

3. Microscopie photonique conventionnelle et immunohistochimique

L'échantillon hypothalamique est orienté sous un stéréomicroscope (5 $\times$) et coupé en cinq sections transversales entre le niveau II et VI (Fig. 1, d; Rossi et al., 1983).

Les tranches 2 à 4 sont coupées en deux moitiés, celle de droite étant postfixée dans OsO_4 2%, celle de gauche, ainsi que les coupes 1 et 5 n'étant pas postfixées.

Tous les échantillons sont enrobés dans de la résine de «Spurr» à faible viscosité (Rossi et al., 1983).

Des coupes semi-fines sont confectionnées à partir des tissus postfixés et colorées au bleu de toluidine. Des coupes semi-fines des tissus non-osmifiés sont utilisées pour l'immunohistochimie (Fig. 1, e-f).

LHRH, SRIF et TRH sont mises en évidence dans les coupes semi-fines par la technique PAP ou une méthode indirecte à la phosphatase alcaline. La résine de «Spurr» est enlevée des coupes, comme décrit précédemment (Rossi et al., 1983). La peroxidase endogène est inhibée par immer-

sion dans H_2O_2 /alcool méthylique 1:10, la phosphatase est inhibée dans de l'acide acétique glacial 15%. Les colorations PAP ou à la phosphatase alcaline sont ensuite effectuées en utilisant des séras de lapin: antiLHRH 1:400 (Bio-Yeda Ltd., Rehovot, Israel), antiSRIF humain 1:200 (Dako Corporation, Santa Barbara, Calif., USA), antiTRH 1:200 (Dr. C. Oliver, Université d'Aix-Marseille, France), ainsi qu'un sérum porcin antilapin 1:20 et un complexe PAP de lapin 1:100 (Miles-Yeda LTD., Rehovot, Israel) ou un antilapin conjugué à la phosphatase alcaline 1:100 (Sigma, St. Louis, MO, USA), de la diaminobenzidine (méthode PAP) ou du «fast red TR salt» et un sel disodique de naphthol AS-MX-phosphate (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A) (méthode à la phosphatase alcaline).

Les coupes sont finalement rincées dans une solution saline tamponnée au phosphate et contenant 0,5% de Tween 20.

4. Microscopie électronique conventionnelle et immunohistochimique

Des coupes fines sont confectionnées à partir des tissus postfixés et elles sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb. Des photos de l'éminence médiane sont effectuées à l'aide d'un microscope électronique Zeiss 902/PC. Pour des études immunohistochimiques, des coupes fines (60 nm) de tissus non osmifiés sont utilisées.

LHRH est mise en évidence en utilisant l'antisérum primaire déjà mentionné et un antisérum ovin antilapin, conjugué à des particules d'or colloïdal (diamètre: 15 nm), dilué 1:40 (Janssen Life Science Products, Beerse, Belgique). L'intensité des réactions immunohistochimiques peut être mesurée sur les coupes semi-fines et fines par densitométrie grâce au système d'analyse automatique d'image (Datalab, Thorigen, Suisse). Ce système permet d'analyser l'intensité de la réaction immunohistochimique en la décomposant en 127 degrés de gris. A chaque degré correspond une certaine intensité de réaction.

5. Investigations entreprises

Pour chaque MBH incubé, les études suivantes ont été effectuées:

a) Déterminations biochimiques dans les milieux récoltés à la fin de chaque période de préincubation et d'incubation. Le contenu en neuropeptide du milieu (p.e. LHRH, TRH) est déterminé par dosage radio-immunologique en utilisant les mêmes antiséras que ceux employés pour les investigations immunohistochimiques (Boujon et al., 1987; Bestetti et al., 1987a).

Lors de la dernière incubation de 20 min dans un milieu de stimulation (dépolariation induite par K^+), la relâche de LHRH s'accroît d'environ 300% (Boujon et al., 1987; Bestetti et al., 1987a).

b) Histologie (postfixation, coupes semi-fines, coloration au bleu de toluidine) pour juger de l'état de préservation du tissu incubé et avoir une vue d'ensemble de la région considérée (Fig. 3).

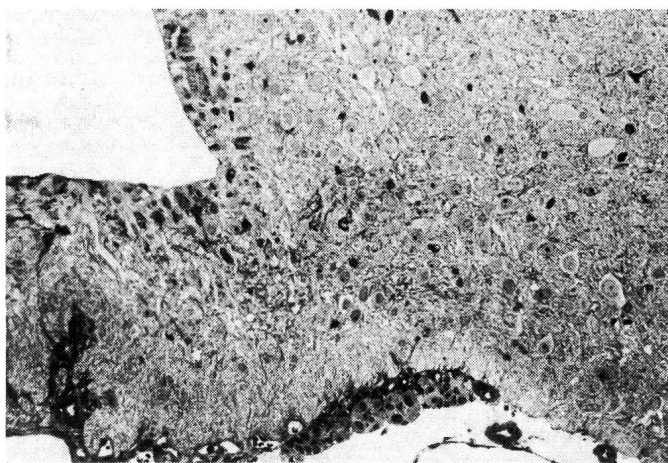


Fig. 3: Microscopie photonique. Région de l'éminence médiane et du noyau arqué. a Tissu postfixé, coupe semi-fine, coloration au bleu de toluidine. x210 (de Neuroendocrinology 45: 311–317, 1987).

c) Morphométrie (postfixation, coupes semi-fines, coloration au bleu de toluidine) pour étudier la taille des neurones et des axones hypothalamiques. La stimulation ionique du MBH provoque une dilatation des axones à LHRH, consécutive à l'augmentation des exocytoses associées à la dépolariation membranaire (Fig. 4). Par conséquent, l'évaluation quantitative de cette dilatation nous indique l'intensité des phénomènes d'exocytose qui ont eu lieu (Zamora et al., 1983).

d) Microscopie électronique (postfixation, coupes fines, photographies de l'éminence médiane) pour juger de l'état de préservation du tissu incubé et analyser les phénomènes d'exocytose au niveau ultrastructural (Fig. 5, a–b). Sur les photographies, les granules neurosécrétoires peuvent être comptés dans les sections transverses des axones, ainsi que les granules en contact avec la membrane axonale qui reflètent un phénomène d'exocytose (Stoeckart et al., 1972; Rossi et al., 1983; Zamora et al., 1983). Ce dernier est intensifié lors de l'incubation du MBH dans un milieu de «stimulation» (Zamora et al., 1983; Boujon et al., 1987).

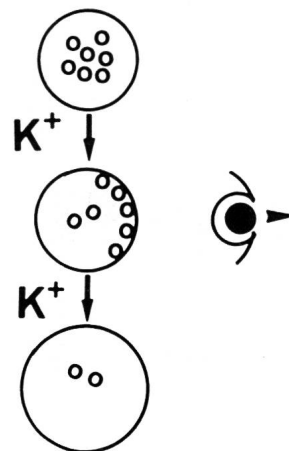


Fig. 4: Représentation schématique des phénomènes d'exocytoses induits par dépolariation à K^+ et de la dilatation axonale qui en résulte. Le schéma montre des axones remplis de granules neurosécrétoires. La dépolariation à K^+ provoque un déplacement des granules, leur fusion avec la membrane de l'axone et la libération du neuropeptide qu'ils contiennent (disque noir). L'incorporation des membranes des granules à celle de l'axone conduit à une dilatation de ce dernier (Zamora et al., 1983).

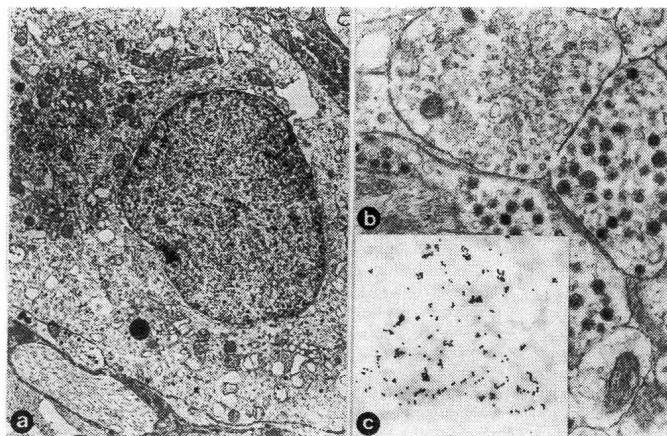


Fig. 5: Microscopie électronique. a Neurone du noyau arqué. x8360. b Neuropile dans l'éminence médiane avec des axones contenant des vésicules et des granules. x27 060. c Granules intraaxonales antiLHRH positifs, méthode à l'or colloïdal. x27 060 (de Neuroendocrinology 45: 311–317, 1987).

e) Immunohistochimie (sans postfixation, coupes semi-fines et fines) afin de démontrer la présence des neuropeptides dans le MBH (p.e. LHRH, TRH, SRIF) (Fig. 6, a–c; Fig. 5, c), de définir leur localisation, et d'avoir des préparations de base pour les investigations morphométriques, stéréologiques et densitométriques.

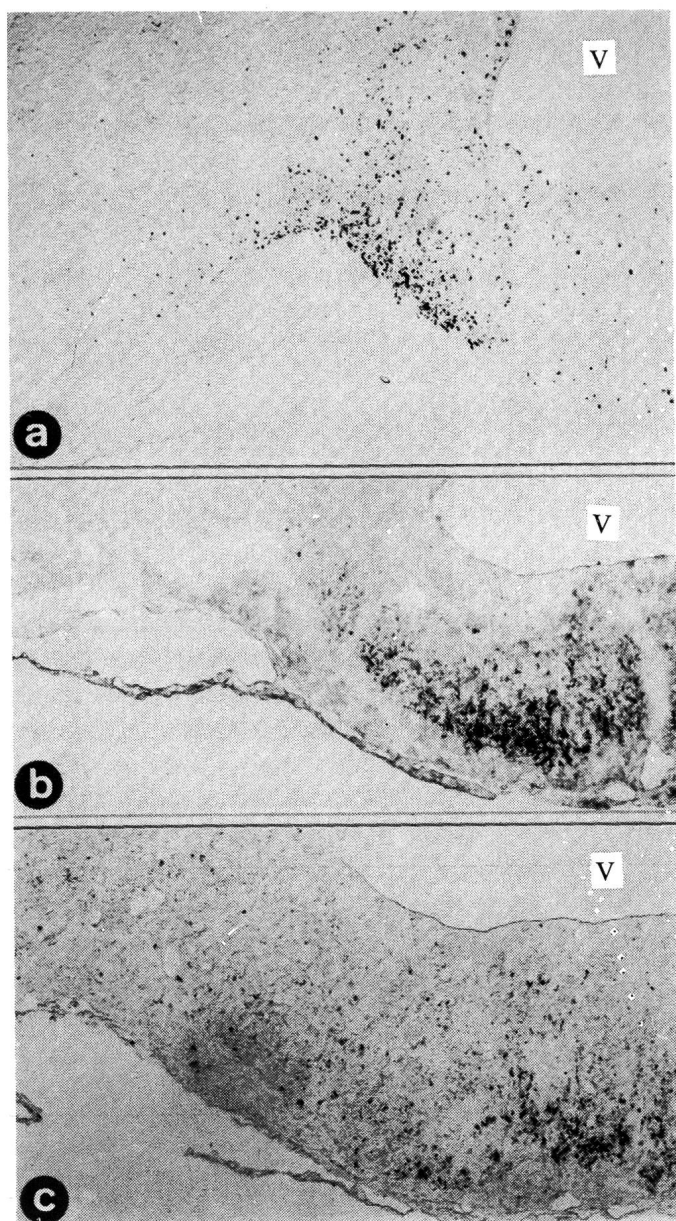


Fig. 6: Microscopie photonique. Région de l'éminence médiane. a–c Tissu non postfixé, coupes semi-fines, a AntiLHRH, méthode à la phosphatase alcaline. b AntiSRIF, méthode PAP. c AntiTRH, méthode à la phosphatase alcaline. V = ventricule III. x210 (de Neuroendocrinology 45: 311–317, 1987).

f) Densitométrie (préparations immunohistochimiques; Diasys, Datalab, Thorigen, Suisse) pour déterminer le contenu relatif en neuropeptides dans les cellules hypothalamiques et dans leurs granules sécrétoires (Bestetti et al., 1989).

Modèle pour l'étude «in vitro» de cellules hypophysaires isolées

L'adénohypophyse est séparée de la neurohypophyse, puis traitée à la trypsine, afin d'isoler les cellules hypophysaires qui sont ensuite placées dans une chambre d'incubation sur un «monolayer» d'érythrocytes. Leur activité sécrétoire (LH, FSH et TSH) est étudiée à l'aide d'un «reverse hemolytic plaque assay» (RHPA) suivant la technique de Smith et al. (1986), que nous avons personnellement modifiée (Rossi et al., 1987; Rossi et al., 1988). Ce test exploite le phénomène d'une hémolyse inverse, c'est-à-dire qu'un antigène provoque l'hémolyse d'érythrocytes couplés à des anticorps correspondants (dans l'«hemolytic plaque assay» originel, c'est l'anticorps qui provoque l'hémolyse d'érythrocytes couplés à des antigènes (Molinario et al., 1981)). A la fin du traitement «in vitro», des études morphométriques en microscopie photonique sont entreprises sur des préparations natives, ou fixées et marquées immunohistochemiquement (pour LH, FSH et TSH). Cette technique permet d'obtenir des informations sur la capacité sécrétoire et sur la morphologie des cellules gonadotropes ou thyrotropes isolées, c'est-à-dire séparées de leur contexte histologique hypophysaire, évitant ainsi une éventuelle stimulation par d'autres cellules de l'hypophyse (stimulation paracrine). Ainsi, elle permet d'établir une relation directe entre le comportement fonctionnel et l'aspect morphologique d'une même cellule hypophysaire.

1. «Reverse hemolytic plaque assay»

Le tissu de l'adénohypophyse est fragmenté, puis trypsini-sé dans une solution de trypsine 0,25:100 (trypsine, DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan, USA) à base de PBS, à 37°C et pH 7 pendant une heure sous agitation constante. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée (10 minutes à 900 g), le sédiment dilué dans une solution de NaCl 0,9%, puis centrifugé à nouveau (10 minutes à 900 g). Après l'élimination du «surnageant», le sédiment est remis en suspension dans une solution saline (80 µl NaCl 0,9%). Le nombre de cellules ainsi récoltées est de 5×10^5 à 6×10^5 et le nombre de cellules viables d'environ 95%. Un «monolayer» est confectionné en remplissant une chambre d'observation (Cunningham et al., 1968) avec des quantités égales de suspension cellulaire finale et d'érythrocytes de mouton couplés à la protéine A. Le tout est incubé pendant une heure pour permettre la formation du «monolayer». Après adjonction d'antiséras de lapin antiLH (Dako Corporation, Santa Barbara, CA, USA), antiFSH (UCB-Bioproductions,

Brussels, Belgique), et antiTSH (Dako corporation, Santa Barbara, CA, USA), la chambre est encore incubée pendant deux heures à 37 °C.

2. Microscopie photonique conventionnelle et immunohistochimique

Des préparations natives ont été effectuées lors d'une expérience pilote (technique identique à celle décrite ci-dessus). Pour l'obtention de préparations fixées et immunohistochimiques, le complexe «chambre/porte-objet» est traité spécialement, après l'incubation avec l'anticorps. Il est immergé pendant une nuit dans une solution d'un tampon S-collidine (pH 7.4) contenant 2% de glutaraldéhyde, à une température de 4 °C. Le jour suivant, le couvre-objet est enlevé et le porte-objet est rincé dans du PBS. La peroxidase endogène est inhibée par un traitement de 5 minutes dans du méthanol contenant 3% H₂O₂. Après lavage au PBS, il est effectué une coloration immunohistochimique (technique PAP) pour LH, FSH (Pitton et al., 1987) ou TSH (Bestetti et al., 1987b).

Pour chaque adénohypophyse les études suivantes peuvent être effectuées:

- Comptage et morphométrie sur des préparations natives du nombre de plaques (Fig. 7, 8), de l'aire de chaque plaque et de chaque cellule sécrétant LH et FSH, afin de pouvoir comparer ces résultats avec ceux obtenus sur des préparations fixées (Rossi et al., 1987).
- Comptage et morphométrie sur des préparations fixées et traitées à l'immunohistochimie, sur le nombre de plaques et sur les cellules immunoréactives à LH, FSH et TSH. L'aire des plaques reflète l'activité sécrétoire des gonadotropes ou des thyrotropes. Le marquage immunohistochimique des cellules permet de différencier les sous-populations de cellules à LH, FSH et TSH qui ont une activité sécrétoire, de celles qui n'en ont pas (Rossi et al., 1988).
- Densitométrie de la réaction immunohistochimique. L'intensité de la réaction permet d'établir le contenu relatif en substances immunoréactives dans les cellules et les granules sécrétoires (Bestetti et al., 1989).

Importances des méthodes décrites pour la protection des animaux

Nous avons déjà mentionné (voir l'introduction) qu'une interprétation correcte des résultats a souvent nécessité, pour une grande partie des expériences endocriniennes: a) de nombreux animaux (plusieurs groupes), b) des expériences «in vivo», chirurgie incluse, et c) une extrapolation des résultats parmi les groupes. Ces handicaps peuvent

être surmontés grâce aux modèles que nous avons développés et que nous continuons à perfectionner.

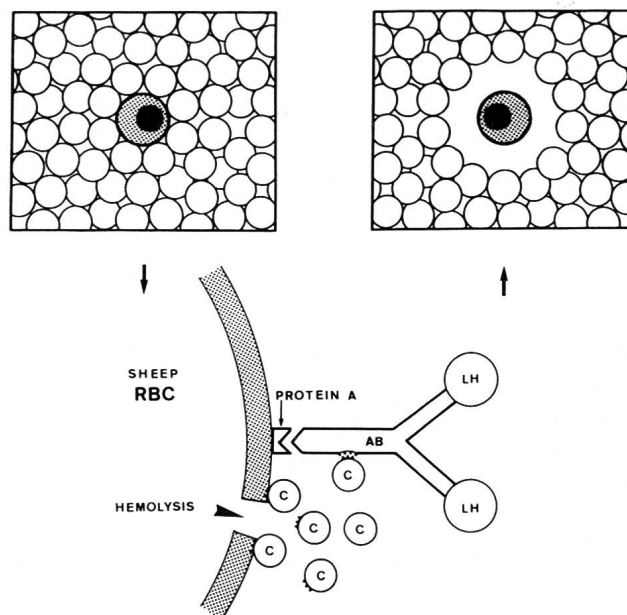


Fig. 7: Représentation schématique de la formation d'une plaque. La partie supérieure du schéma représente une cellule hypophysaire dans un «monolayer» d'érythrocytes avant (à gauche) et après (à droite) la formation d'une plaque d'hémolyse. AB = anticorps de lapin antiLH; c = complément.

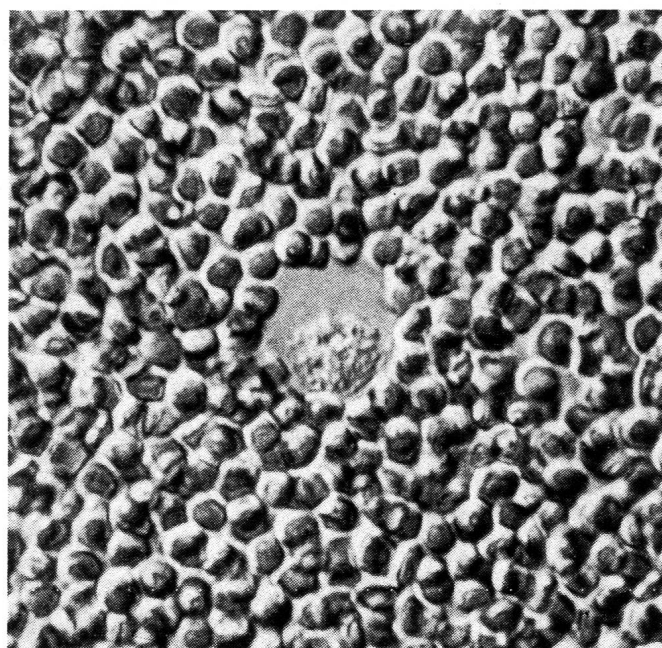


Fig. 8: Microscopie photonique, technique de Nomarski. Cellule hypophysaire dans un «monolayer» d'érythrocytes, après la formation d'une plaque d'hémolyse, x1320.

Effectivement, l'utilisation de ces modèles «in vitro» permet de *réduire* le nombre d'animaux utilisés, car 1) le comportement sécrétoire du MBH et de l'hypophyse peut être étudié, alors que ces deux tissus sont prélevés sur *un seul* animal, 2) des études morphologiques *et* fonctionnelles peuvent être entreprises sur les tissus provenant d'un même donneur. L'expérimentation «in vivo» et les approches chirurgicales sont *remplacées* par des expériences «in vitro» sur des organes ou des cellules isolées. En outre, nos modèles permettent un *raffinement* des méthodes expérimentales, car l'utilisation d'un seul groupe d'animaux permet 1) d'établir des corrélations entre les fonctionnements hypothalamique et hypophysaire, et 2) d'éviter des extrapolations de données entre un groupe utilisé pour des études morphologiques et un groupe utilisé pour des investigations biochimiques.

Il faut encore mentionner la haute sensibilité du «RHPA» et de la densitométrie en comparaison avec le dosage d'hormones plasmatiques ou tissulaires. En effet, aussi bien la mesure d'une sécrétion hormonale (par RHPA) que celle du contenu hormonal (par densitométrie) peuvent être évaluées quantitativement au niveau cellulaire. Les quantités d'hormones relâchées ou stockées par la cellule sont minimales et certainement en dessous de la sensibilité des autres systèmes de dosage actuellement connus, tels que RIA ou ELISA.

Finalement, en prenant exemple sur les méthodes décrites ci-dessus, des modèles similaires peuvent être mis au point pour d'autres organes endocriniens.

RÉFÉRENCES

- Bestetti G. E., Boujon C. E., Raymond M. J., Rossi G. L. (1987a): Un nouveau modèle in vitro permet d'employer le même hypothalamus pour des investigations morphologiques et fonctionnelles. *Annales d'Endocrinologie* 48, 438–440. — Bestetti G. E., Raymond M. J., Perrin I. V., Kniel P. C., Lemarchand-Béraud Th., Rossi G. L. (1987b): Thyroid and pituitary secretory disorders in streptozotocin-diabetic rats are associated with severe structural changes of these glands. *Virchows Arch. B (Cell path)* 53, 69–78. — Bestetti G. E., Boujon C. E., Raymond M. J., Rossi G. L. (1989): Functional and morphological changes in mediobasal hypothalamus of streptozotocin-induced diabetic male rats: An in vitro study of LHRH release. *Diabetes* (sous presse). — Boujon C. E., Bestetti G. E., Raymond M. J., Rossi G. L. (1987): A model for combined morphological and functional investigations on the isolated medio-basal rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 45, 311–317. — Cunningham A. J., Szenberg A. (1968): Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology* 14: 599–601. — Drouva S. V., Epelbaum J., Hery M., Tapia-Arancibia L., Laplante E., Kordon C. (1981): Ionic channels involved in the LHRH and SRIF release from rat mediobasal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 32, 155–162. — McKelvy J. F., Leblanc P., Laudes C., Perrie S., Grimm-Jorgensen Y., Kordon C. (1976): The use of bacitracin as an inhibitor of the degradation of thyrotropin-releasing factor and luteinizing hormone releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 73, 507–515. — Molinaro G. A., Eby W. C., Molinaro C. A. (1981): The Reverse Plaque-Forming Cell Assay. *Methods in Enzymology* 73, 326–338. — Pitton I., Bestetti G. E., Rossi G. L. (1987): The changes in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis of streptozotocin-treated male rats depend from age at diabetes onset. *Andrologia* 19, 464–473. — Rossi G. L., Bestetti G. E. (1983): Technical aspects in the study of pathologic lesions in the hypothalamus of the rat. In: *Monographs on Pathology of Laboratory Animals, Endocrine System*, Jones T. E., Hunt R. D., eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, 1983, pp 311–316. — Rossi G. L., Bestetti G. E. (1987): Vermindertes Sekretionsvermögen isolierter LH- und FSH-Gonadotropenzellen aus Ratten mit Streptozotocin-Diabetes: morphometrisch-immunocytologischer Nachweis mittels «reverse hemolytic plaque assay». *Schweiz. med. Wschr.* 117, 938. — Rossi G. L., Bestetti G. E., Tontis D. (1988): La capacité sécrétoire des cellules gonadotropes hypophysaires de rats est diminuée in vitro lors du diabète induit par la streptozotocine: démonstration morphométrique et immunocytochimique à l'aide d'un «reverse hemolytic plaque assay». *Annales d'Endocrinologie* 49, 46N 80. — Rotsztein W. H., Charli J. L., Pattou E., Epelbaum J., Kordon C. (1976): In vitro release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) from rat mediobasal hypothalamus: Effects of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology* 99, 1663–1666. — Smith P. F., Luque E. H., Neill J. D. (1986): Detection and measurements of secretion from individual neuroendocrine cells using a reverse hemolytic plaque assay. *Meth. Enzymol.* 124, 443–465. — Stoeckart R., Jansen H. G., Kreike A. J. (1972): Ultrastructural evidence for exocytosis in the median eminence of the rat. *Z. Zellforsch.* 131, 99–107. — Zamora A. J., Ramirez V. D. (1983): Structural changes in nerve endings of rat median eminence superfused with media rich in potassium ions. *Neuroscience* 10, 463–473.

Alternativmethoden: Entwicklung und Anwendung von zwei (in vitro) Modellen für endokrinologische Studien

Für die meisten endokrinologischen Studien werden mehrere Tiergruppen gebraucht: eine Gruppe für quantitative

Hormonbestimmungen in Gewebe und Plasma unter Basalbedingungen, eine zweite Gruppe für dieselben Bestimmungen nach «in vivo» Behandlung der Tiere (endokrine Stimulation oder Hemmung) und zwei Gruppen für morphologische Untersuchungen. Im Rahmen der «in vivo» Behandlungen sind chirurgische Eingriffe nicht selten. Dazu müssen Resultate aus verschiedenen Versuchsreihen extrapoliert werden.

Um diese Nachteile zu vermeiden, haben wir zwei «in vitro» Modelle entwickelt. Mittels solcher alternativen Modellen können wir an Geweben aus demselben Tier folgendes untersuchen: 1. Funktion und Struktur des Hypothalamus und 2. Funktion und Struktur von isolierten hypophysären Zellen aus demselben Tier.

Dank dieser Modelle ist es möglich, die Anzahl der für die Experimente notwendigen Tiere erheblich zu reduzieren und «in vivo» mit «in vitro» Untersuchungen zu ersetzen. Zudem können die Untersuchungsmethoden verfeinert und die Extrapolation der Resultate unter den Gruppen vermieden werden.

Metodi alternativi: sviluppo ed utilizzazione di due modelli «in vitro» per studi endocrinologici

La maggioranza degli studi endocrinologici è di norma effettuata su più gruppi di animali: un gruppo per le determinazioni quantitative di ormoni nei tessuti e nel plasma in condizioni basali, un secondo gruppo per le stesse determinazioni dopo trattamento «in vivo» degli animali (stimolazione o inibizione delle attività endocrine) e due altri gruppi nelle stesse condizioni per le indagini morfologiche. Nell'ambito dei trattamenti «in vivo» gli interventi chirurgici non sono rari. Inoltre i risultati provenienti dai vari gruppi sperimentali possono essere interpretati solo dopo estrapolazione.

Per evitare tutti questi svantaggi, abbiamo sviluppato due modelli «in vitro» che permettono di studiare su tessuti provenienti dallo stesso animale: 1. la funzione e la struttura dell'ipotalamo e 2. la funzione e la struttura di cellule ipofisarie isolate. In questo modo si può notevolmente ridurre il numero degli animali utilizzati, sostituire la sperimentazione «in vivo» con quella «in vitro» ed infine affinare i metodi d'indagine evitando, tra l'altro, l'estrapolazione dei risultati.

REMERCIEMENTS

Ce projet a été partiellement financé par le Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique, subventions 3.084-84

et 3.028-87 à G. E. B. et G. L. R., ainsi que par l'Office Vétérinaire Fédéral, subvention 014.89.4 à G. E. B. Une partie du système automatique analytique d'image «DIASYS» a été généreusement soutenu financièrement par la «Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der Universität Bern (Hochschulstiftung)» subventions 11. 6. 1985, 25. 3. 1986 and 26. 6. 1987 à G. E. B.

Adresse: Prof. Dr. G. L. Rossi
Institut für Tierpathologie
Abteilung für experimentelle Pathologie
und Elektronenmikroskopie
Postfach 2735
CH-3001 Bern

Manuskripteingang: 10. März 1989