

## STUDIORUM PROGRESSUS

### Modifications ultrastructurelles provoquées par quelques médicaments sur les terminaisons nerveuses adrénnergiques et sur la médullaire surrénale

Au cours de ces dernières années, nos connaissances sur l'ultrastructure des terminaisons nerveuses adrénnergiques ont fait de sensibles progrès: toutefois le problème du stockage du médiateur spécifique catécholaminique, à leur niveau, n'est pas encore parfaitement élucidé.

L'épiphysse<sup>1,2</sup> et le déférent<sup>3,4</sup> sont parmi les organes les plus riches en terminaisons nerveuses adrénnergiques, et peuvent très bien s'adapter à l'étude, même morphologique, des modifications survenant lors de l'entrée en action des médicaments dont l'activité semble justement s'exercer par une influence sur le sympathique et sur les dépôts du médiateur catécholaminique.

Les terminaisons sympathiques contiennent des vésicules claires et des granules à contenu dense, osmiophile et homogène.

Les granules comme les vésicules ont un diamètre d'environ 350 à 400 Å. Il semble que le contenu des granules doive s'identifier avec la noradrénaline<sup>5-10</sup>; mais la nature de la substance contenue dans les vésicules claires n'est pas encore déterminée: certains auteurs pensent qu'il s'agit d'acetylcholine<sup>11,12</sup>.

La médullaire surrénale, sur laquelle on a effectué les études les plus approfondies, même en ce qui concerne son aspect ultrastructurel, emmagasine son stock de catécholamines sous forme de gros granules entourés d'une membrane, plus volumineux que ceux trouvés dans les terminaisons périphériques: mais on n'y rencontre pas de vésicules claires<sup>13</sup>.

Comme il a été dit plus haut, les connaissances sont encore imprécises en ce qui concerne le sens physiologique de la présence de ces granules denses, soit dans les terminaisons nerveuses adrénnergiques, soit dans la médullaire surrénale.

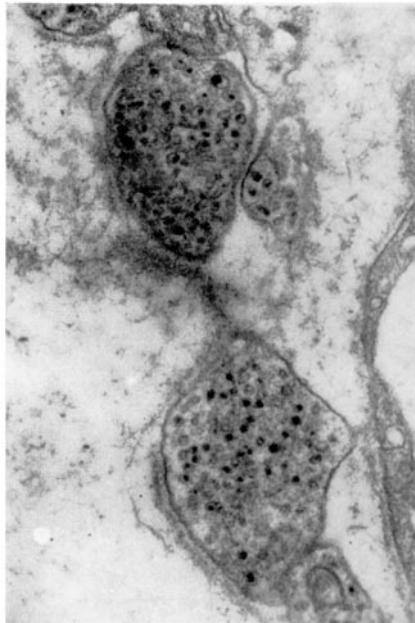


Fig. 1. Terminaisons nerveuses adrénnergiques dans l'épiphysse du Rat normal.  $\times 21000$ .

naisons nerveuses, soit dans la médullaire. On pourrait supposer qu'il existe deux genres de dépôt: un «pool» labile, qui pourrait être facilement déplacé, même sous l'influence de plusieurs médicaments, et un «pool» résistant, et que seulement d'autres médicaments et certains stimuli nerveux parviendraient à mobiliser<sup>14</sup>.

Le second «pool» pourrait trouver sa correspondance morphologique dans les granules denses de la médullaire et des terminaisons périphériques; tandis que le «pool» labile serait constitué par les molécules du médiateur non suffisamment associées, de manière à ne pas être morphologiquement reconnaissables.

Nous nous sommes proposés d'étudier les variations d'aspect des terminaisons périphériques et de la médullaire après traitement avec des médicaments agissant sur le système sympathique.

Nous aurions ainsi pu comparer le comportement de la médullaire avec celui des terminaisons périphériques, en observant aussi si les terminaisons du déférent et celles de la pineale - bien que destinées à des organes avec des fonctions tellement différentes - se comporteraient de façon analogue ou diverse, en présence d'identiques stimuli pharmacologiques.

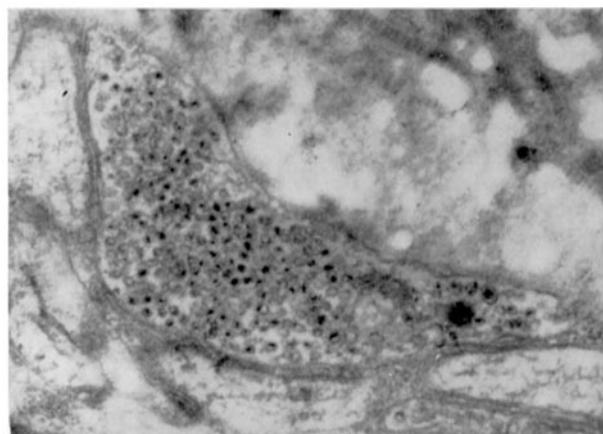


Fig. 2. Terminaisons nerveuses adrénnergiques dans le déférent du Rat normal.  $\times 18000$ .

- <sup>1</sup> A. PELLEGRINO DE IRALDI et E. DE ROBERTIS, *Exper.* 17, 122 (1961).
- <sup>2</sup> A. PELLEGRINO DE IRALDI et E. DE ROBERTIS, *Int. J. Neuropharmacol.* 2, 231 (1963).
- <sup>3</sup> N. C. R. MERRILLEES, G. BURNSTOCK et M. HOLMAN, *J. Cell Biol.* 19, 529 (1963).
- <sup>4</sup> K. C. RICHARDSON, *Biochem. Pharmacol.* 12, 11 (1963).
- <sup>5</sup> P. LUNDBORG, *Exper.* 19, 479 (1963).
- <sup>6</sup> U. S. VON EULER et F. LISHAJKO, *Acta physiol. scand.* 51, 193 (1961).
- <sup>7</sup> U. S. VON EULER et F. LISHAJKO, *Acta physiol. scand.* 57, 468 (1963).
- <sup>8</sup> G. HERTING, *Nature* 192, 172 (1961).
- <sup>9</sup> D. E. WOLFE, L. T. POTTER, K. RICHARDSON et J. AXELROD, *Science* 138, 440 (1962).
- <sup>10</sup> E. DE ROBERTIS et V. FERREIRA, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 611 (1957).
- <sup>11</sup> J. H. BURN et M. J. RAND, *Brit. Med. J.* 1, 394 (1959).
- <sup>12</sup> J. H. BURN, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 112, 167 (1963).
- <sup>13</sup> E. D. DE ROBERTIS et D. D. SABATINI, *Fed. Proc.* 19, Suppl. 90 (1960).
- <sup>14</sup> B. B. BRODIE et M. A. BEAVEN, *Med. exp.* 8, 320 (1963).

L'observation des préparations au microscope électronique pouvait déjà nous orienter vers une évaluation d'ensemble des phénomènes.

Il nous a semblé, toutefois, que l'on pouvait avoir quelques indications d'ordre quantitatif sur les modifications instaurées, en effectuant le décompte des granules et des vésicules au niveau des terminaisons périphériques à la suite des divers traitements sélectionnés.

Nous avons choisi un groupe de médicaments dont l'action est bien définie, afin de mieux lier les modifications morphologiques aux modifications fonctionnelles.

*Matériel et méthodes.* Nous avons réparti les animaux destinés à nos expériences en 7 groupes de 10 rats chacun, et nous les avons traités de la façon suivante: 1er groupe: réserpine - 2,5 mg/kg par injection intrapéritonéale, 24 h avant le sacrifice; 2ème groupe: guanéthidine - 50 mg/kg, 2 fois en 24 h; 3ème groupe: guanéthidine - 150 mg/kg, toutes les 6 h pendant 24 h; 4ème groupe: brétylium - 50 mg/kg, 2 fois en 24 h; 5ème groupe: iproniazide - 100 mg/kg, 24 h avant le traitement à la réserpine, 2,5 mg/kg. Les rats ont été sacrifiés 24 h après l'administration de la réserpine. 6ème groupe: iproniazide - 100 mg/kg, 24 h avant le traitement à la guanéthidine, 100 mg/kg, deux fois en 24 h. Les rats ont été sacrifiés 24 h après la 2ème administration de guanéthidine. 7ème groupe: iproniazide - 100 mg/kg, 48 h avant le sacrifice.

Une fois l'animal sacrifié, on a prélevé la médullaire de la surrénale, l'épiphyse, le déférent. On a préparé ces organes pour l'étude au microscope électronique. Deux modes de fixation ont été utilisés: (a) acide osmique à 1% en tampon de phosphates à pH 7,2 pendant 1 h à 4°C; (b) glutaraldéhyde à 4% en tampon de phosphates à pH 7,2 pendant 3 h à 4°C. Une autre fixation à l'acide osmique a été employée après celle-ci, pendant 1 h à la température ambiante. Les pièces déshydratées à l'acétone ont été incluses dans le «vestopal»<sup>15</sup>.

On a effectué les coupes avec un microtome «Ultratome LKB», on les a colorées à l'acétate d'uranyle pendant 2 h et examinées au microscope électronique Hitachi HU 11.

Pour avoir une évaluation quantitative de l'action des médicaments, ainsi que nous l'avons dit plus haut,

nous avons compté le nombre des vésicules et des granules dans une grande quantité de terminaisons nerveuses aussi bien de l'épiphyse que du déférent, à un grossissement standard de 42.500. Les résultats ont été reportés en nombre de granules et de vésicules par  $\mu^2$ .

*Résultats.* Les résultats du nombre des grains et des vésicules qui se trouvent dans les terminaisons de l'épiphyse et du déférent, suivant les divers traitements utilisés, sont indiqués dans le Tableau. On remarque d'abord une certaine analogie dans le chiffre total des granules et des vésicules et dans leurs proportions relatives au niveau des terminaisons de l'épiphyse et du déférent. L'effet des médicaments présente aussi, dans l'un et l'autre cas, beaucoup d'analogies. Le brétylium et l'iproniazide n'exercent presque aucune activité. La guanéthidine et la réserpine par contre dégranulent intensément les terminaisons périphériques dans les deux cas. L'iproniazide administrée au préalable a une forte action inhibitrice, mais sans toutefois les annuler, sur les effets de la guanéthidine et de la réserpine. Si l'on procède à un examen détaillé, on peut noter que la guanéthidine vide entièrement les granules des terminaisons du déférent, mais non complètement ceux des terminaisons au niveau de l'épiphyse.

De manière analogue, l'effet protecteur de l'iproniazide semble plus important dans le cas de la guanéthidine que dans celui de la réserpine.

Une comparaison des effets de ces drogues sur les terminaisons sympathiques périphériques et sur la médullaire des surrénales peut être effectuée suivant une évaluation d'ensemble des images obtenues au microscope électronique.

La réserpine fait disparaître tous les granules au niveau des terminaisons périphériques (Figures 4, 5), mais ne les vide pas tous au niveau médullaire. Ces derniers cependant sont modifiés dans leur forme: le noyau dense intérieur se rétrécit beaucoup, est moins homogène, et même parfois comme désagrégé (Figure 6).

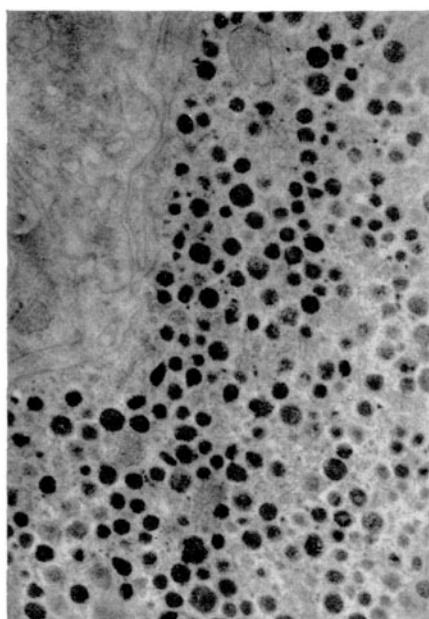


Fig. 3. Médullaire du surrénal chez le Rat normal.  $\times 11\,000$ .

Traitements	Moyenne du nombre de vésicules et granules par $\mu^2$	Moyenne du nombre de vésicules par $\mu^2$	Moyenne du nombre de granules par $\mu^2$	% de granules
<i>Epiphysse</i>				
Normal	12,1	8,5	3,5	30
Brétylium	9,4	5,9	3,5	37
Iproniazide	11,5	7,7	3,8	33
Guanéthidine	8,5	8,1	0,4	5
Réserpine	13,2	13,2	0	0
Iproniazide + Guanéthidine	6,8	5,1	1,7	25
Iproniazide + Réserpine	9,4	7,6	1,8	19
<i>Déférant</i>				
Normal	11,3	7,3	4,0	37
Brétylium	6,65	4,25	2,4	35
Iproniazide	12,0	7,2	4,8	39
Guanéthidine	7,7	7,7	0	0
Réserpine	8,9	8,9	0	0
Iproniazide + Réserpine	8,9	7,5	1,4	16

<sup>15</sup> A. RYTER et E. KELLEMBERGER, J. ultr. Res. 2, 800 (1958).

La Figure 6 est particulièrement intéressante: on peut y observer sur une seule préparation que la terminaison nerveuse adrénégique au niveau de la médullaire est entièrement vidée, alors que la cellule de la médullaire ne l'est pas. Le comportement différent des deux structures sympathiques est ici bien évident. La cellule médullaire commence en effet à ressentir de façon remarquable l'action de la réserpine après administration de fortes doses de cette dernière, répétées pendant plusieurs jours<sup>16,17</sup>.

Si, au niveau périphérique, la guanéthidine donne un tableau analogue à celui de la réserpine, même du point de vue morphologique (Figures 7, 8), au niveau de la médullaire elle n'a pas d'action déplétive sur les structures granulaires même à doses massives, voisines de la toxicité limite (Figure 9). Il s'agit ici de dosages de guanéthidine tels que celle-ci provoque des altérations mitochondrielles considérables. Même à ces doses élevées on ne remarque qu'une atteinte partielle de la structure des granules de

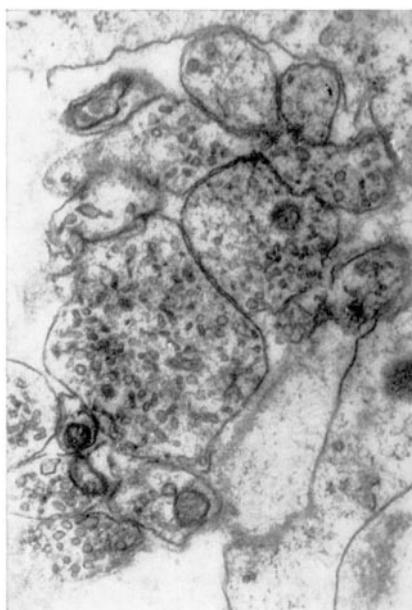


Fig. 4. Terminaisons nerveuses dans l'épiphysé du Rat traité avec 2,5 mg/kg de réserpine.  $\times 24500$ .

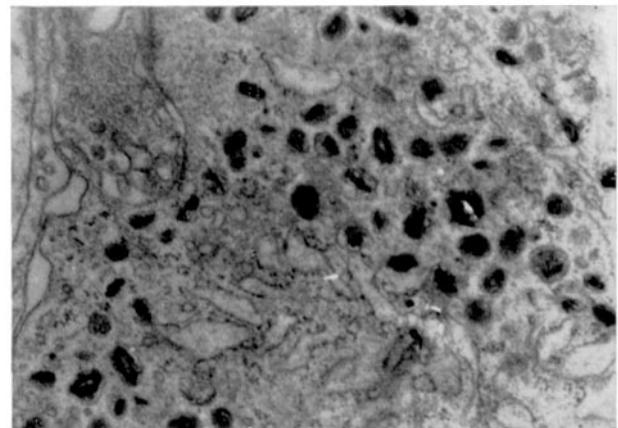


Fig. 6. Médullaire du Rat traité avec 2,5 mg/kg de réserpine. A gauche en haut: terminaisons sympathiques. On remarque les granulations au niveau de la cellule surrénales, bien que quelque peu modifiées, sont encore bien visibles, tandis que la terminaison périphérique qui l'innervé est complètement dégranulée.  $\times 15000$ .

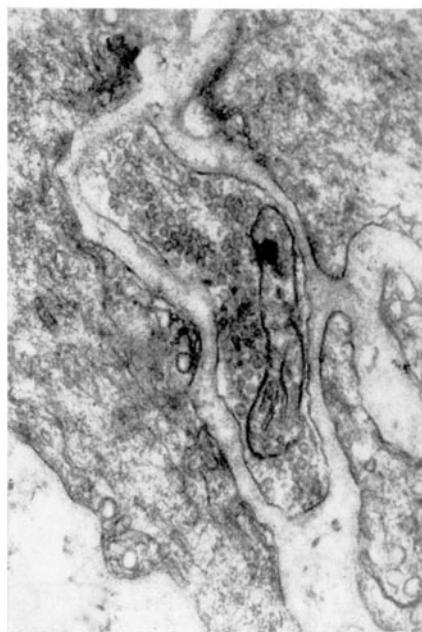


Fig. 5. Terminaisons nerveuses dans le déférent du Rat traité avec 2,5 mg/kg de réserpine.  $\times 24500$ .



Fig. 7. Terminaison nerveuse dans l'épiphysé du Rat traitée avec 100 mg/kg de guanéthidine.  $\times 29500$ .

<sup>16</sup> F. CLEMENTI et G. P. ZOCCHI, J. Cell Biol. **17**, 587 (1963).

<sup>17</sup> B. CALLINGHAM et M. MANN, Brit. J. Pharmacol. **18**, 138 (1962).

la médullaire, accompagnée d'un élargissement des vésicules qui les contiennent.

Le traitement à l'iproniazide, inhibiteur classique des monoaminoxidases qui, en soi, ne provoque aucun changement, ni dans les terminaisons périphériques, ni dans la médullaire, peut protéger bien qu'incomplètement – comme on a pu le constater au cours des déterminations quantitatives – de l'action déplétive de la réserpine et de la guanéthidine au niveau des terminaisons périphériques. Nous reportons dans les Figures 10 et 11 l'aspect des terminaisons dans le déférent et dans l'épiphyshe, après traitement à l'iproniazide et à la guanéthidine.

Dans la surrénale l'iproniazide assure une protection très nette même contre l'action de la réserpine (Figure 12).

Le traitement au *brétylium* altère peu la composition granulaire et vésiculaire des terminaisons en ce qui con-

cerne leur quantité. On remarque toutefois que les dimensions de certains granules augmentent considérablement aussi bien dans l'épiphyshe (Figure 13) que dans les déférents (Figure 14). Dans la médullaire, sous l'influence du *brétylium*, l'aspect des granules se modifie quelque peu: ils n'apparaissent plus formés d'un amas homogène, mais d'un noyau très concentré et osmiophile, entouré d'un léger voile de matériel moins dense (Figure 15).

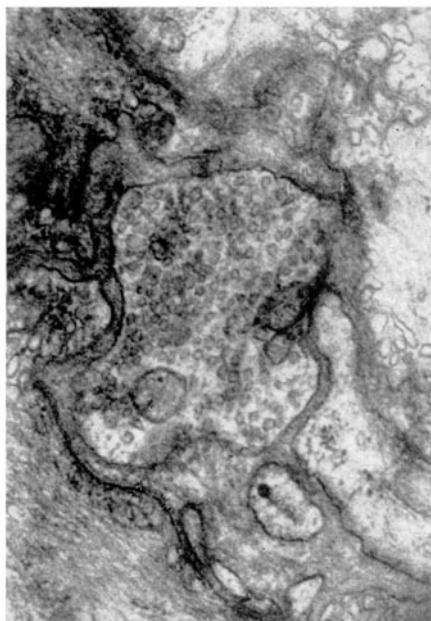


Fig. 8. Terminaison nerveuse dans le déférent du Rat traité avec 100 mg/kg de guanéthidine.  $\times 22000$ .

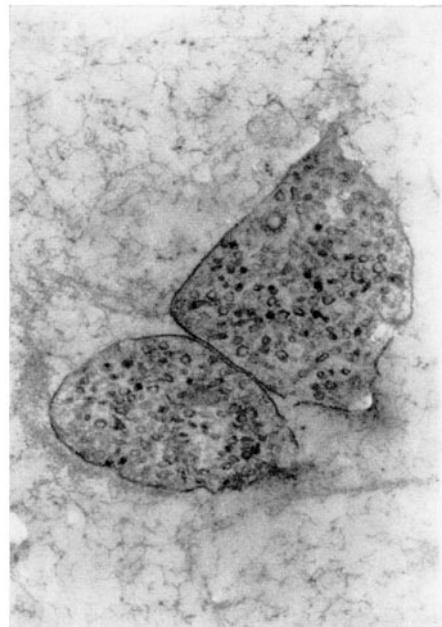


Fig. 10. Epiphyshe du Rat traitée avec iproniazide plus guanéthidine. Les granulations denses sont presque complètement conservées.  $\times 21000$ .

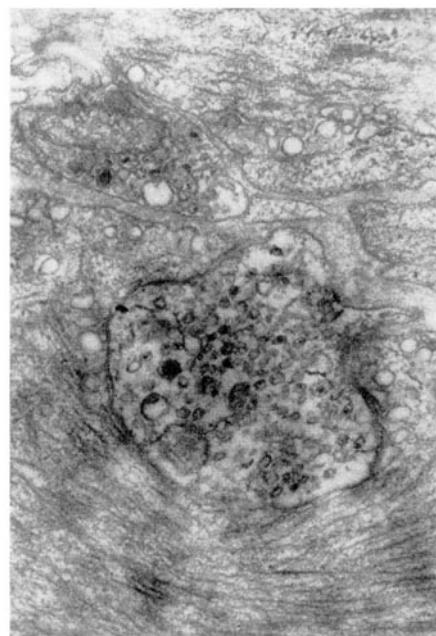
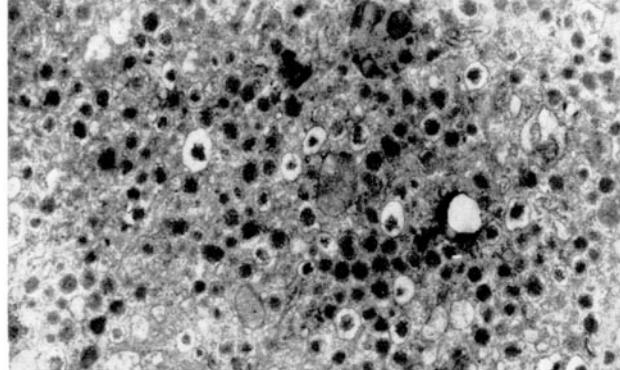


Fig. 9. Médullaire du surrénales chez le Rat traité avec 600 mg/kg de guanéthidine. Les granules sont encore très nombreux, toutefois beaucoup d'entre eux ne conservent plus leur structure normale.  $\times 10500$ .

Fig. 11. Terminaisons nerveuses dans le déférent traité avec iproniazide plus guanéthidine.  $\times 22500$ .



*Discussion et conclusions.* Il nous semble avant tout digne de remarquer que l'on parvient – tout au moins pour les terminaisons sympathiques périphériques – à exprimer de manière quantitative une observation morphologique: c'est-à-dire le comportement des granules denses observés au microscope électronique.

Le résultat le plus important de nos données semble être celui de la différence de comportement, en présence des médicaments utilisés, des terminaisons nerveuses sympathiques périphériques d'une part, et de la médullaire surrénale d'autre part.

Cette différence apparaît évidente à la suite de traitements à la réserpine ou à la guanéthidine: ces deux médicaments n'agissent sur la surrénale qu'à doses massives.

Ce fait nous semble digne de remarque puisque l'on a toujours considéré la médullaire surrénale comme un organe important pour le dépôt des catécholamines, ayant

essentiellement le même comportement que les terminaisons périphériques.

Au contraire, la médullaire pourrait être considérée comme un organe n'intervenant que dans un deuxième temps, une fois que l'organisme, après avoir mis en œuvre les réserves périphériques, doit faire face à des stimuli ultérieurs.

Les tableaux obtenus par nous paraissent fournir une base morphologique à une série de données fonctionnelles déjà sanctionnées. La réserpine, par exemple, vide entièrement de leurs granules les terminaisons sympathiques: cependant le nombre des vésicules claires après le traitement à la réserpine est égal à la somme des granules et des vésicules existant dans les terminaisons normales. La réserpine détacherait donc les liaisons catécholamines – ATP, et les catécholamines ainsi libérées pourraient sortir du granule et être détruites par les enzymes du cyto-

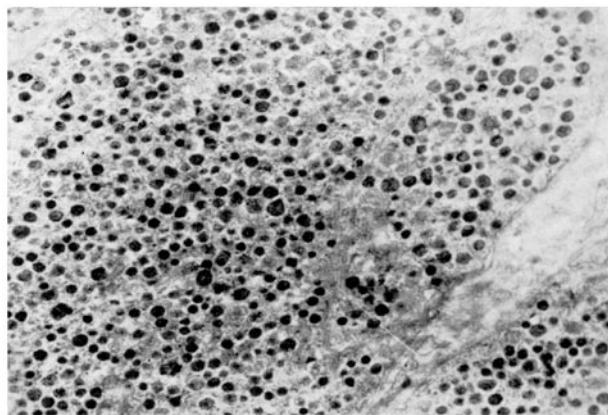


Fig. 12. Médullaire surrénale de Rat traité avec iproniazide plus réserpine. La protection est complète.  $\times 8000$ .

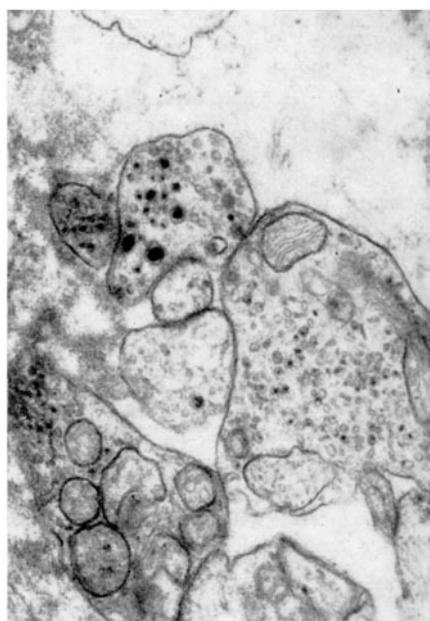
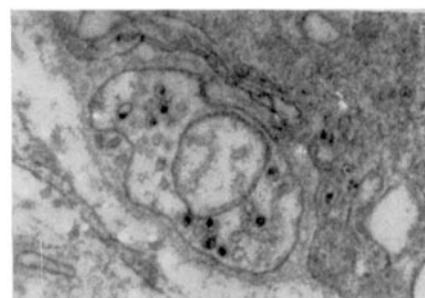
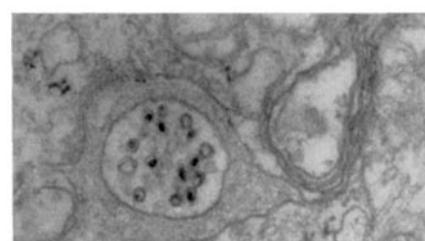


Fig. 13. Terminaisons nerveuses d'épiphyshe traitées avec brétylium. Les granules ont légèrement diminué, toutefois quelques-uns d'entre eux ont fortement augmenté de volume.  $\times 35500$ .



a



b

Fig. 14. a,  $\times 33000$ . Désérent de Rat traité avec brétylium. b,  $\times 31000$ . Les terminaisons sont presque entièrement normales.

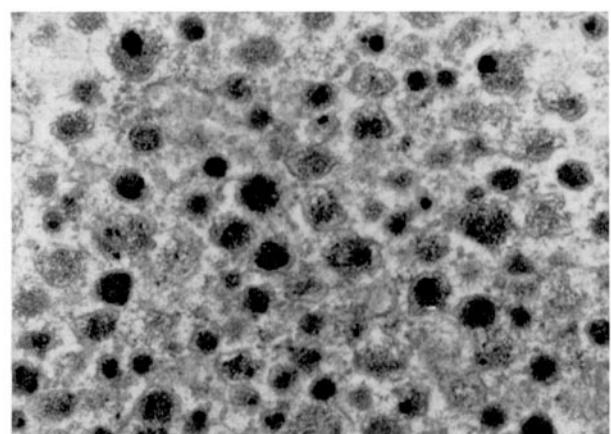


Fig. 15. Médullaire surrénale chez le Rat avec brétylium. Il semble que la substance agisse entamant la composition même des granules qui ne sont plus homogènes mais constitués souvent par un noyau fortement opaque entouré de petites granulations diffuses.  $\times 18500$ .

plasme. Les granules denses se videraient donc progressivement et ne pourraient plus être distingués des vésicules claires.

Le mécanisme d'action de la guanéthidine pourrait être analogue. C'est ainsi qu'on peut admettre que cette dernière agit directement sur le granule. On pourrait même penser que cette drogue favoriserait une libération continue des catécholamines du «pool» mobile; le médiateur passerait ainsi sans arrêt du réservoir le plus rempli à celui qui ne l'est pas complètement.

Pour le brétylum, on admet généralement qu'il empêche au stimulus nerveux de rejoindre les terminaisons. D'un point de vue morphologique, il résulterait que les granules sont modifiés par le brétylum, soit au niveau des terminaisons périphériques lorsqu'on a une augmentation des dimensions du granule, soit à celui de la surrénale, quand on observe, à l'intérieur des granules denses, des

granulations plus petites de matériel fortement amassé et condensé.

*Summary.* It has been shown that reserpine and guanéthidine deplete granules containing catecholamine in sympathetic nerve endings of both the pineal gland and the vas deferens. This effect is blocked by iproniazid. Bretylum is not able to deplete these granules but it modifies their aspect. It has also been observed that granules of the adrenal medulla are depleted less easily than those of sympathetic nerve endings.

F. CLEMENTI

*Istituto di Farmacologia e di Terapia, Università degli Studi, Milano (Italie), le 27 août 1964.*

## CONGRESSUS

### Italy

#### Second International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism

*Milano, September 13–15, 1965*

The European Society for Biochemical Pharmacology, in collaboration with the University of Milan, is to organize the *Second International Symposium on Drugs Affecting Lipid Metabolism* to be held in Milano on September 13–15, 1965. The symposium will include long and short lectures by invited speakers and a limited number of free communications.

Requests for information, and titles with summaries of 200 words in English should be sent, before March 31, 1965 to: Prof. RODOLFO PAOLETTI, Scientific Secretary, Institute of Pharmacology, University of Milano, Via Andrea del Sarto 21, Milano (Italy), Tel. 719060.

#### Second International Course on Methods for Lipid Research

*Milano, September 16–24, 1965*

A NATO Advanced Study Institute on Methods for Lipid Research will be held at the University of Milano on September 16–24, 1965. The course will consist of lectures and demonstrations given by European and American specialists. English will be the official language. Participation is limited to 50 post-graduate applicants of any nationality actively interested in lipid research, to be selected on a competitive basis. A good knowledge of English is essential. A limited number of fellowships for attendance to the course is available.

Applications for attendance and the fellowships should be sent, together with a curriculum vitae and a list of publications, before March 31, 1965 to: Prof. RODOLFO PAOLETTI, Scientific Secretary, Institute of Pharmacology, University of Milano, Via Andrea del Sarto 21, Milano (Italy), Tel. 719060.

## CORRIGENDUM

L. MUSAO, G. RODIGHIERO, G. COLOMBO, V. TORLONE, and F. DALL'ACQUA, *Photosensitizing Furocoumarins: Interaction with DNA and Photo-Inactivation of DNA Containing Viruses*. Exper. vol. XXI, fasc. 1, p. 22 (1965). The address of the authors should read as follows: *Istituti di Chimica Farmaceutica dell'Università di Padova e di Istologia ed Embriologia dell'Università di Perugia ed Istituto Zooprofilattico per l'Umbria e le Marche, Perugia (Italy)*.