

# Etude des modifications quantitatives des cellules somatotropes hypophysaires de rat après thymectomie. Action opothérapique de substitution à l'aide d'un extrait thymique

## Quantitative study of the modifications observed in somatotropic cells of thymectomized rats. Opothherapeutic substitution with a thymic extract

G. Morel, P. Deschaux, B. Claustrat et R. Fontanges<sup>1</sup>

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Université Claude Bernard, 43 boulevard du 11 novembre 1918, F-69621 Villeurbanne (France), Division de Microbiologie du Service de Santé des Armées, 108 boulevard Pinel, F-69300 Lyon (France), 16 mars 1978

**Summary.** Removal of thymus is followed by a degranulation of somatotropic cells, by an increase of the surface of the granular endoplasmic reticulum, and of the plasma level of growth hormone. An opothherapeutic substitution was realized with a thymic extract.

C'est dans l'hypothèse d'un rôle du thymus par une substance circulante que nous avons étudié la relation entre cet organe et les cellules somatotropes. L'extrait thymique utilisé a été précédemment vérifié du point de vue de son activité immunologique<sup>2</sup>.

**Matériels et méthodes.** 1. Extrait thymique: A partir de thymus de veau nous avons appliqué la méthode d'extraction décrite par Comsa et coll.<sup>3,4</sup>. L'extrait obtenu ou HTH (homeostatic thymic hormone) est thermolabile, de poids moléculaire compris entre 3000-6000, riche en lysine, glycine, alanine et leucine<sup>5</sup>.

2. Animaux: Des rats mâles albinos Charles River France sont répartis en 4 lots de 10 animaux chacun. Le lot I sert de témoin. Les lots II, III et IV subissent une thymectomie néonatale. 15 jours après l'opération, les animaux du lot II reçoivent une injection i.p. bihebdomadaire de 0,5 ml de sérum physiologique. Le lot III reçoit dans les mêmes conditions l'HTH (la dose injectée est de 1 mg de protéine dans 1 ml de soluté isotonique). A 60 jours les animaux sont sacrifiés par décapitation. Le sang est prélevé sur héparine puis le plasma est séparé par centrifugation à 3000 rpm avant d'être stocké à -20 °C.

3. Dosage radioimmunologique: Le dosage de l'hormone de croissance<sup>1</sup> est effectué sur tous les prélèvements sanguins selon la technique décrite par Birge et coll.<sup>6</sup>. Le procédé de séparation du complexe antigène-anticorps et antigène libre, utilise l'absorption de l'hormone sur le talc. Les résultats sont exprimés en ng/ml de plasma.

4. Microscopie électronique: Les hypophyses sont fixées en tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4, d'abord dans le glutaraldéhyde à 2,5% pendant 1 h, puis dans l'acide osmique à 2% (1 h). Les préparations sont examinées au microscope électronique JEOL (JEM 7), après coloration à l'acétate d'uranyl associé au citrate de plomb.

a) Etude quantitative du nombre de grains de sécrétion: Sur une coupe faite au hasard, le nombre de sections de particules que nous observons par unité de surface est proportionnel au nombre réel de particules par unité de volume. Par l'application de la formule proposée par Nourtier<sup>7</sup> il est possible d'apprécier le nombre G de granules par unité de volume:

$$G = \frac{\pi L}{2 N_i} \left( \frac{n}{A_0} \right)^2 = \frac{\pi n^2}{2 N_i L d^2}$$

où  $A_0$ , représente l'aire réelle de la coupe observée (exprimée en  $\mu m^2$  de la coupe originale); n, le nombre de sections observé sur la coupe examinée; L, la longueur totale des lignes de la grille test;  $N_i$ , le nombre d'intersections des lignes avec les contours des sections des granules; d, la distance entre 2 lignes successives du réseau; nous obtenons G, le nombre de granules par  $\mu m^3$ .

b) Etude quantitative de la surface de l'ergastoplasme: Le principe appliqué à la détermination de la surface de

l'ergastoplasme sur une coupe fine est comparable à celui permettant de résoudre le problème de l'aiguille de Buffon: quelle est la probabilité pour qu'une aiguille tombée au hasard sur une grille test croise l'une de ses lignes? Nous calculons le rapport R donnant la véritable concentration en surfaces lamellaires dans un plan réel non agrandi de l'échantillon étudié:

$$R = k \frac{N_i}{L} \cdot \frac{g}{1000}$$

où:  $N_i$ , représente le nombre d'intersections des lignes avec les images de l'ergastoplasme; L, la longueur totale des lignes traversant le cytoplasme; g, l'agrandissement final; k, le coefficient numérique variant suivant la morphologie de l'ergastoplasme; il est = 4 si les saccules sont aplatis et = 2 s'ils sont dilatés, entraînant des intersections parfois différentes pour les deux membranes du saccule. Les résultats R sont exprimés en  $\mu m^2/\mu m^3$  de cytoplasme si l'unité de mesure est le mm.

c) Etude du volume relatif des mitochondries: L'étude de ces volumes relatifs est réalisée, après surimposition d'un réseau de points, par comptage différentiel. Quand on désire connaître le rapport entre le volume ( $V_i$ ) d'un constituant épars dans une cellule et le volume cytoplasmique ( $V_c$ ), il suffit de compter le nombre  $P_i$  de points tombant dans ce composé i et le nombre  $P_c$  de gros points tombant dans le cytoplasme. On a alors le rapport des volumes:

$$\frac{V_i}{V_c} = \frac{P_i}{25 P_c}$$

où:  $V_i$ , représente le volume du composé étudié;  $V_c$ , le volume du cytoplasme;  $P_i$ , le nombre de gros points tombant dans le cytoplasme. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytoplasme. La méthode statistique employée pour estimer p est le test t de Student-Fisher.

**Résultats.** 1 Action de la thymectomie sur le taux plasmatique de GH. La thymectomie néonatale entraîne (figure 1)

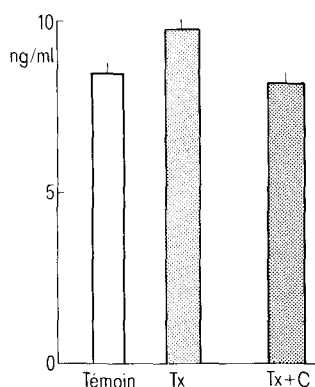


Fig. 1. Influence de la thymectomie néonatale (Tx) sur le taux plasmatique de GH; opothérapie de substitution réalisée par l'extrait de Comsa (Tx+C).

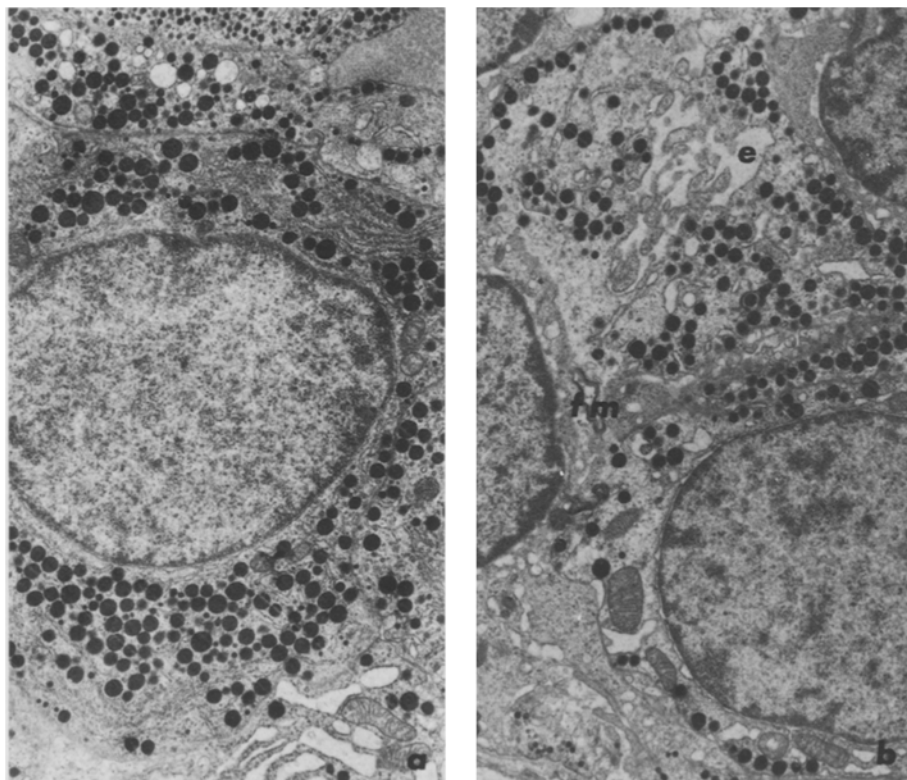


Fig. 2. *a* Cellule somatotrope témoin, *b* cellule somatotrope après thymectomie néonatale. L'ergastoplasme (*e*) est dilaté. Quelques figures myéliniques (*fm*) sont présentes.

une augmentation (+15%;  $0,05 < p < 0,01$ ) du taux de GH plasmatique corrigée par l'injection d'HTH.

**2 Modifications ultrastructurales de l'hypophyse.** *a*) Aspect qualitatif. Les cellules somatotropes sont caractérisées, pour un état fonctionnel normal (figure 2, *a*): grains homogènes en taille et en densité; appareil de Golgi bien développé, l'ergastoplasme abondant, les mitochondries sont ovalaires et de densité moyenne. Après thymectomie l'aspect des cellules somatotropes est modifié (figure 2, *b*). L'ergastoplasme est dilaté et irrégulier; l'appareil de Golgi présente de nombreuses vésicules entourant des saccules distendus. Une dégranulation apparaît dans les cellules somatotropes des animaux thymectomisés (figure 2, *b*); les mitochondries sont plus denses.

*b*) Influence de la thymectomie sur le nombre de granules des cellules somatotropes (figure 3). La thymectomie néonatale entraîne une dégranulation significative des cellules somatotropes ( $-25\%$   $0,05 < p < 0,01$ ). L'injection d'extrait thymique se traduit chez les animaux thymectomisés par une augmentation du nombre de granules moyens qui atteint 41% ( $p < 0,01$ ) du nombre observé chez l'animal témoin.

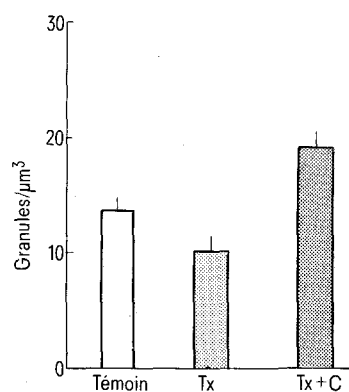


Fig. 3. Etude quantitative du nombre de granules par unité de volume ( $\mu\text{m}^3$ )  $\pm$  SE dans les cellules somatotropes. Influence de la thymectomie néonatale; opothérapie de substitution réalisée par l'extrait de Comsa (Tx + C).

*c*) Influence de la thymectomie sur la surface de l'ergastoplasme (figure 4). La thymectomie entraîne une augmentation significative de la surface de l'ergastoplasme (+25%;  $p < 0,01$ ), corrigée par l'administration d'HTH.

*d*) Influence de la thymectomie sur le volume relatif des mitochondries (figure 5). La thymectomie entraîne une diminution du volume relatif des mitochondries ( $p < 0,05$ ), l'opothérapie de substitution est obtenue avec l'administration d'HTH.

**Discussion.** L'interaction entre l'hypophyse et le thymus fut soupçonnée dès les premiers travaux sur le thymus: la thymectomie entraîne, en effet, un arrêt de la croissance chez certaines espèces animales. Ce rôle du thymus sur la croissance est passé au second plan après la découverte fondamentale de la place de cet organe en immunologie<sup>8</sup>. Durant la dernière décade on a montré que ce rôle s'exerçait par l'intermédiaire d'un ou plusieurs principes actifs. Dans différents travaux précédents nous avons pu montrer que le thymus était impliqué dans de nombreuses relations endocriniennes par l'intermédiaire de principes actifs<sup>2,8-10</sup>. A l'aide d'un de ces principes actifs nous avons pu mettre

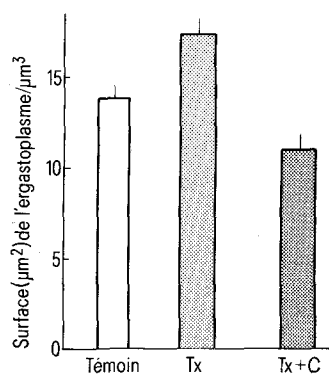


Fig. 4. Etude de la surface de l'ergastoplasme par unité de volume ( $\mu\text{m}^2 + \mu\text{m}^3$ )  $\pm$  SE dans les cellules somatotropes. Influence de la thymectomie néonatale (Tx); opothérapie de substitution réalisée par l'extrait de Comsa (Tx + C).

en évidence un rôle direct du thymus sur l'hypophyse. En effet, la thymectomie néonatale entraîne une dégranulation des cellules somatotropes, la surface de l'ergastoplasme est augmenté, le volume relatif de l'appareil de Golgi est augmenté et celui des mitochondries diminué. Ces modifications peuvent correspondre à une augmentation de la synthèse de l'hormone de croissance. Cette hypothèse est confirmée par l'élévation du taux plasmatique de GH que nous avons dosée chez les animaux thymectomisés. Nous avons d'ailleurs déjà montré que la synthèse d'ADN hypophysaire était augmentée après thymectomie<sup>2</sup>.

Ces modifications cytologiques sont corrigées par les injections d'extrait thymique. Cependant, après cette opothéra-

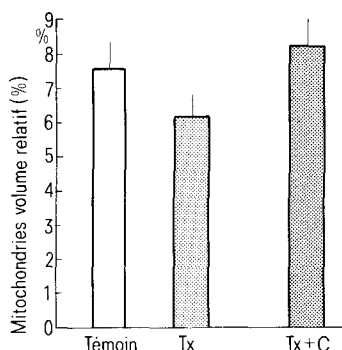


Fig. 5: Etude du volume relatif des mitochondries dans les cellules somatotropes. Influence de la thymectomie néonatale (Tx); opothérapie de substitution réalisée par l'extrait de Comsa (Tx + C).

pie de substitution, nous constatons que le nombre de granules contenus dans les cellules somatotropes est supérieur à celui du témoin, alors que le taux de GH est inférieur à la normale. On peut penser que l'extrait thymique agit de façon synergique avec la GH comme Comsa<sup>11</sup> et nous mêmes<sup>2</sup> l'avions précédemment suggéré. Dans cette hypothèse l'animal thymectomisé recevant l'extrait aurait besoin d'une quantité plus faible de GH pour obtenir le même effet. L'extrait thymique agirait ainsi en bloquant la sécrétion de GH.

- 1 Les auteurs remercient le NIAMD pour la fourniture des réactifs permettant le dosage radioimmunologique de la GH plasmatique de rat.
- 2 P. Deschaux, G. Morel, Binimbi-Massengo et R. Fontanges, *Archs int. Physiol. Biochem.* 83, 423 (1975).
- 3 N.A. Bezssonoff et J. Comsa, *Annls Endocr. (Paris)*, 19, 222 (1958).
- 4 G. Bernardi et J. Comsa, *Experientia* 21, 416 (1965).
- 5 P. Deschaux, P. Bienvenue, P. Lhoste et R. Fontanges, *C.r. Acad. Sci. Paris* 282, 505 (1976).
- 6 C.A. Birge, G.I. Peake, I.K. Mariz and W.H. Daughaday, *Endocrinology* 81, 195 (1967).
- 7 G. Nourtier, *Annls Biol.* 56, 16 (1971).
- 8 J.F.A.P. Miller, *Lancet* 2, 748 (1961).
- 9 P. Deschaux et R. Fontanges, *Annls Endocr. (Paris)* 39, 23 (1978).
- 10 P. Deschaux, R. Fontanges, T. Ulrich et A. Goldstein, *J. Physiol. (Paris)*, sous presse (1977).
- 11 J. Comsa, *Nature* 182, 728 (1958).

## Effects of thyroid state on brain stem responses to iontophoretic noradrenaline<sup>1</sup>

J.A. Gonzáles-Vegas and Dolores Fuenmayor

*Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas (Venezuela), 13 January 1978*

**Summary.** Responses to iontophoretic NA were increased in hyperthyroid rats and decreased in hypothyroid animals. No effect was observed on acetylcholine and glycine responses tested in the same way.

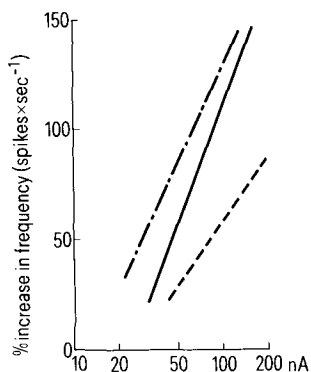
It has been suggested that thyroid hormone levels can influence the actions of catecholamines (CA) both at the peripheral target organs<sup>2,3</sup> and in the brain. Thus intraventricular administration of noradrenaline (NA) enhances motor activity in hyperthyroid rats<sup>4</sup>, and injection of apomorphine (a dopamine agonist) to guinea-pigs made hyperthyroid results in an increased production of stereotypies as compared to untreated controls<sup>5</sup>. More recently Fregly et al.<sup>6</sup> have shown decreased beta receptor responsiveness in hypothyroid rats. This and other clinical evidence has led to the suggestion that thyroid hormone could alter the sensitivity of adrenergic receptors<sup>7</sup>.

It was decided to investigate this possibility, at the single unit level in the brain, by studying changes in the responses to iontophoretically applied NA, in animals in which the thyroid state was altered. The technique of microiontophoresis was used in order to avoid the complications involved in the systemic administration of drugs.

**Materials and methods.** Male Sprague-Dawley rats of 250–350 g were divided into 3 groups. One served as a control group, 1 group received daily injections of triiodothyronine (150 µg i.p.) for 10 days, and the remaining group of rats were made hypothyroid either surgically or by administration of methimazole in drinking water. The thyroid function was assessed by measuring oxygen consumption and weight gain as compared to untreated controls.

The rats were anaesthetized with urethane (1 g/kg i.p.) and held in a stereotaxic frame, after drilling the overlying bone, the cerebellum was removed by suction in order to

expose the floor of the i.v. ventricle where all recordings were made (1–3 mm anterior to obex; 1–2 mm lateral to the midline; and 1–3 mm depth). 5 barrelled micropipettes containing the following drugs as 10% solutions were used: noradrenaline HCl pH 5.0; acetylcholine chloride pH 6.0; glycine pH 3.0, and NaCl 2 M was used in the remaining barrel to test for current artifacts. Conventional techniques were used to record from the central barrel of the assembly. Spikes were voltage-gated, counted, and the firing frequency over 1 sec epochs was displayed in a pen recorder as a frequency histogram. Special care was taken to ensure constant retention currents and a fixed interval between drug applications, to avoid introducing experimental arti-



Response to iontophoretically applied NA. Dose-response lines corresponding to: Control (—), hypothyroid (---) and hyperthyroid (- · - · -) groups; Regression lines were calculated by the least square method. Control group,  $r = 0.92$   $p < 0.01$ ; hypothyroid,  $r = 0.75$   $p < 0.05$ ; Hyperthyroid,  $r = 0.97$   $p < 0.01$ . Ordinate: percent increment above control frequency. Abscissa: current in nA.