



ETUDE TOPOGRAPHIQUE ET MORPHOMETRIQUE DES CELLULES DE CONTROLE DE LA REPRODUCTION CHEZ LE BLACK-BASS (MICROPTERUS SALMOÏDES, L.).

SOLY KAMWIRA

Résumé :

L'histologie est une science qui a permis une véritable révolution de la Biologie et de la Médecine tant sur le plan de la recherche fondamentale que de la pratique. Les techniques histochimiques et immunocytochimiques sont appliquées dans les recherches visant la maîtrise de l'infiniment petit dans le monde des Vivants et la mise en évidence des processus physiologique et pathologique des cellules ou des tissus.

*Le but de cet article a été de déterminer, par des techniques histochimique et immunocytochimique, la localisation hypophysaire et les transformations des cellules de contrôle du cycle de reproduction du Black-bass femelle (*Micropterus salmoides* Lacipède) : les cellules gonadotropes et les cellules lactotropes. L'étude s'intéresse ainsi à la cartographie de l'hypophyse et à la morphométrie des cellules de contrôle de la reproduction.*

Les résultats de cette recherche montre qu'en basses températures les cellules gonadotropes sont rondes alors que les cellules lactotropes sont allongées. Lorsque la température est optimale, le résultat morphométrique s'inverse : les cellules gonadotropes sont allongées et les cellules lactotropes sont rondes. La forme allongée est corrélée à l'activité sécrétoire des cellules endocrines.

*On peut conclure que chez le Black-bass femelle (*Micropterus salmoides*, L.), les hormones gonadotropes (FSH, LH) contrôlent la croissance et la ponte des ovocytes comme chez tous les Vertébrés ; la prolactine (PRL) serait une hormone de détresse chez les Vertébrés inférieurs.*

Abstract :

Histology is a science that has caused a true revolution in Biology and Medicine, as well in the fundamental research as in the practice of both disciplines. Histochemical and immunochemical techniques are applied in researches aimed at understanding the ultra microscopic aspects of living organisms and the elucidation of physiologic processes of cells and tissues.

*The present study is aimed at determining, through histochemical and immunocytochemical techniques, the hypophytic localization and the transformation of control cells for Black-bass female reproductive cycle (*Micropterus salmoides* Lacipede): gonadotrop and lactotrop cells. The study therefore involves hypophysis cartography and morphometry of reproduction control cells.*

Results show that a low temperature gonadotrop cells are rounded, whereas lactotrop cells are elongated. At optimum temperature, morphometric results are reversed: gonadotrop cells are elongated and lactotrop cells are rounded. The elongated form is correlated with the secretory activity of endocrine cells.

*It can be concluded that for female black-bass (*micropterus salmoid*, L) gonadotrop hormones (FSH, LH) control the growth and the laying of ovocytes like for all vertebrates. Prolactin (PRL) would be a hormone in difficulties for vertebrates.*

I. INTRODUCTION

Le Black-bass (*Micropterus salmoides* Lacipède) est un poisson téléostéen de la famille des Centrarchidae. C'est un poisson d'étang à fort potentiel aquacole dont le succès de l'élevage dépend de la maîtrise des processus biologiques qui entrent en jeu au cours du cycle de reproduction. Comme chez tous les autres Vertébrés, la régulation de ce dernier est sous le contrôle hormonal. Les hormones de contrôle, chez les Poissons, sont alors sécrétées par les cellules gonadotropes et les cellules lactotropes. Quelques recherches se sont déjà intéressées à la localisation de ces cellules chez certains groupes comme les Carpes et les Truites. (SAGE et BER d'autres ont étudié le contrôle hormonal en dosant les variations du taux hormonal en circulation).

Notre recherche sera focalisée sur *Micropterus salmoides*, L. Nous décrirons la structure histologique de l'hypophyse du Black-bass en précisant la distribution topographique des cellules gonadotropes et lactotropes chez ce dernier. En effet, chez les Poissons, la localisation des cellules dans l'hypophyse varie d'une famille à une autre. Nous décrirons ensuite la variation morphométrique des cellules au cours du cycle de reproduction.

Cet article est donc une étude topographique et morphométrique des cellules de contrôle de la reproduction de *Micropterus salmoides*, L. Son but est de localiser ces cellules dans l'hypophyse de cette espèce et d'évaluer leur variation morphométrique afin de mettre en évidence leur activité sécrétoire grâce à l'immunocytochimie. Il revêt un intérêt de recherche fondamentale et il a des applications en aquaculture.

II. MATERIEL ET METHODES

Notre échantillon de *Micropterus salmoides* L. est constitué de 27 femelles pêchées entre octobre 1995 et juin 1996 dans un étang situé à 250 m d'altitude (dans les Dombes à Saint Nizier, non loin de la ville de Lyon, ville française). L'étang est alimenté en eau par la pluviométrie et les étangs voisins. Les poissons élevés dans cet étang sont nourris d'un aliment artificiel type « poissons marins » et au poisson fourrage déversé en une fois dans le bassin. Le substrat de l'étang est constitué d'un sol de terre parsemé de graviers, de sable et de végétation. Toutes les conditions étaient ainsi remplies pour que les alevins sevrés vivent dans un milieu proche d'un biotope naturel. Le tableau I donne les caractéristiques de l'étang où ont été élevés les Poissons expérimentés dans cette étude.

Tableau I. Caractéristiques de l'étang où vivent les Poissons expérimentés.

Altitude en m	Aire en m ²	Profondeur en m	Substrat
250	500	± 1	terre

Les 27 hypophyses étudiées ont été conservées dans le liquide de Bouin avant leur inclusion dans la gélose, puis dans la paraffine selon le principe de la double inclusion recommandée pour les objets très petits, difficiles à transporter à la pipette et à suivre à travers les nombreux liquides intermédiaires nécessités pour les méthodes au collodion et à la paraffine (**LANGERON, M., 1949**) ; **EXBRAYAT, J.M., 2000** Leur manipulation a été facilitée grâce à l'utilisation des cassettes en matière plastique où elles ont été maintenues durant la déshydratation, la clarification et l'imprégnation par la paraffine.

Toutes les hypophyses ont été orientées dans la paraffine de façon à obtenir des coupes sagittales sériées permettant d'étudier la répartition des types cellulaires dans l'organe. Cent à deux cents coupes histologiques de 7 µm d'épaisseur par hypophyse ont alors été obtenues grâce au microtome de Minot. Ainsi environ 18 lames numérotées ont été montées pour chaque hypophyse en raison de 6 coupes histologiques sur chaque lame. Nous avons effectué les colorations histochimiques par les techniques de trichome de Cleveland et Wolfe et de l'acide périodique de Schiff- APS- orangé G. Dans cette étude, six lames ont été observées pour chacune des 27 hypophyses traitées : deux lames de chaque extrémité et deux lames du milieu. Le tableau II montre que 36 coupes sont étudiées mensuellement en raison de 720 champs microscopiques.

Tableau II : Echantillons utilisés pour l'étude des hypophyses des *Micropterus salmoides* L. femelles entre octobre 1995 et juin 1996.

Mois	nombre d'hypophyses	Nombre de coupes observées/lame	Nombre de lames observées/hypophyse	Nombre de champs observés/coupe
Octobre	3	2	6	20
Décembre	3	2	6	20
Janvier	3	2	6	20
Février	3	2	6	20
Mars	3	2	6	20
Avril	3	2	6	20
M1	3	2	6	20
M2	3	2	6	20
Juin	3	2	6	20
Totaux	27 hypophyses	324 coupes	162 lames	6480 champs

M1 : Première quinzaines de mai

M2 : deuxième quinzaine de mai

L'immunocytochimie indirecte a été utilisée pour préciser la nature gonadotrope ou lactotrope des hormones sécrétées par l'hypophyse. Ainsi, trois anticorps primaires (anti-LH, anti-FSH et anti-prolactine dako) préparés à partir d'un sérum de lapin et utilisés tous trois à la dilution de 1/300 ont été appliqués sur les coupes d'hypophyse puis révélés par le kit Autoprobe III (Biomed, distribué par Microm, France). Après avoir inhibé les peroxydases endogènes

avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 0,3 % dans du tampon PBS et soumis à l'action d'une solution de conditionnement des tissus (fournie avec le kit), l'anticorps primaire spécifique a été mis au contact de la coupe. Après rinçage, un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre le sérum de lapin a été déposé sur la préparation. Après un nouveau rinçage, nous avons déposé de l'avidine couplée à de la peroxydase. Cette dernière est révélée par une solution d'AEC (amino éthyl carbazole) en présence de peroxyde d'hydrogène, ce qui révèle les sites d'activité en rouge-ornagé. Les coupes contre-colorées par l'hémalum (également fourni dans le kit) ont été montées sans déshydratation à l'aide d'une résine hydrophile (crystal Mount de biomeda, distribué par Microm, France).

Des préparations témoins dans lesquelles ont été successivement omis l'anticorps primaire et secondaire ont permis de contrôler la spécificité. L'observation de tissus réputés dépourvus d'hormones recherchées ont servi de témoins internes, la spécificité des anticorps étant par ailleurs contrôlée par le fournisseur.

L'analyse morphométrique a permis d'approfondir l'appréciation de l'activité sécrétoire des cellules gonadotropes et lactotropes au cours du cycle sexuel et de mettre en évidence leur signification biologique. A cet effet, nous avons utilisé la morphométrie mathématique qui est une méthode mathématique permettant d'apprécier les formes en Biologie (SOUCHIER, 1996). La rondeur et l'élongation varient en sens inverse. Elles traduisent donc un fait identique. Elles expriment une relation entre le petit et le grand diamètre et sont calculées suivant les formules :

Rondeur= périmètre au carré/ surface

Elongation= grand diamètre/ petit diamètre, le périmètre étant calculé

suivant la formule : $\pi \frac{(D + d)}{2}$ et la surface : $\pi \frac{(D \times d)}{2}$.

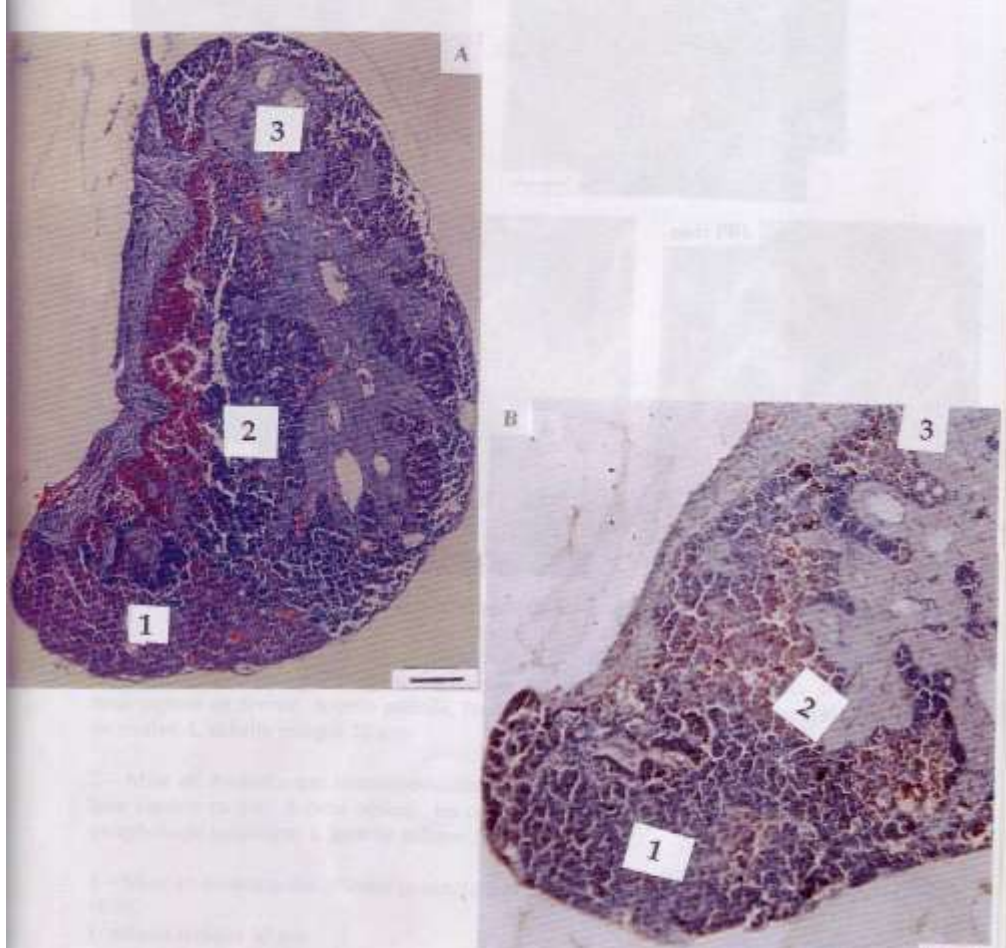
Plus le coefficient d'élongation tend vers 1 plus la cellule est ronde. Lorsque la cellule est longiligne le coefficient d'élongation est au-dessus de 1 (SOUCHER, 1996). Dans cet article, nous avons retenu le paramètre de rondeur pour apprécier la variation de la forme ronde ou longiligne des cellules au cours du cycle de reproduction de *Micropterus salmoides* L.

III. RESULTAT ET DISCUSSION

1. Histologie et cytologie de l'hypophyse de *Micropterus salmoides* L

En coupe sagittale, l'hypophyse de *Micropterus salmoides* apparaît parfaitement comparable à ce qui est observé chez les autres Téléostéens. Elle

comporte une *pars distalis rostralis (PDR)*, une *pars distalis proximalis (PDP)* et une *pars intermedia (PI)*. La neurohypophyse coiffe l'ensemble (Fig.1).



- 1 :PI
- 2 :PDP
- 3 : PDR

Fig. 1 : L'hypophyse du *Micropterus salmoides* L. : Les cellules gonadotropes révélées par la coloration de Cleveland et Wolfe (A) et par anti-FSH (B). Les traits indiquent 200 µm.

Les résultats des observations des lames colorées par la méthode de Cleveland et Wolfe ou colorées l'APS-orangé – G sont indiqués dans le tableau III. Ceux-ci font apparaître que la pars distalis proximalis renferment de grandes quantités de cellules gonadotropes. Les cellules gonadotropes et les cellules lactotropes sont aussi observées en petits nombres dispersés ou regroupés dans d'autres zones de l'adénohypophyse.

Tableau III : Répartition des cellules régulatrices du cycle sexuel dans les différentes zones de l'hypophyse

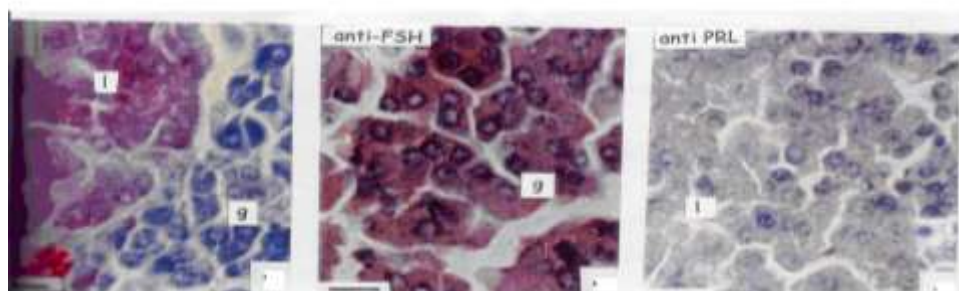
Zone de l'hypophyse	Cellules gonadotropes	Cellules lactotropes
RDP (rostral pars distalis)	+++++	+ / -
PPD (pros pars distalis)	+++++	++
PI (pars intermedia)	+	+++++

La pars distalis rostralis et la pars distalis proximalis renferment de fortes concentrations de cellules gonadotropes. La pars intermedia renferme essentiellement des cellules lactotropes et très peu de cellules gonadotropes. Les cellules gonadotropes et les cellules lactotropes sont observées en petits nombres ou regroupées dans d'autres zones de l'adénohypophyse.

Le trichrome de Cleveland et Wolfe colore en bleu d'abondantes cellules dans la pars distalis rostralis. L'APS-Orangé-G met en évidence dans la même partie hypophysaire d'abondantes cellules colorées en rose. Ces cellules, prépondérantes mises en évidence par des méthodes classiques sont des gonadotropes comme nous allons le démontrer par immunocytochimie (voir ci-dessous).

Des cellules orangéophiles à l'APS-Orangé-G et apparaissant colorées en rose par le trichrome de Cleveland et Wolfe sont localisées dans la pars intermedia. Ces cellules sont des cellules lactotropes. Au près de la neurohypophyse, des cellules de la pars distalis proximalis sont colorées en violet à l'APS : ce sont des cellules gonadotropes.

L'immunocytochimie a confirmé le caractère gonadotrope des cellules colorées en bleu par la méthode de Cleveland et Wolfe ou en rose par l'APS-Orangé-G (Fig. 2 a). Le caractère lactotrope des cellules colorées en rose par la méthode de Cleveland et Wolfe ou en orangé – brun à l'APS – Orangé – G est aussi confirmé par immunocytochimie. (Fig. 2 et 3).



a Mise en évidence des cellules gonadotropes et lactotropes. Coloration de Cleveland et Wolf. L'échelle indique 20 µm.

- b Mise en évidence des cellules gonadotropes. Mise en évidence par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre la FSH. L'échelle indique 20 μm .
- c Mise en évidence des cellules lactotropes. Mise en évidence par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps dirigé contre la prolactine. L'échelle indique 20 μm .

Fig.2. : Cellules gonadotropes et lactotropes d'une femelle de Black-bass.

Les cellules gonadotropes réagissent positivement à un anticorps anti-LH ou anti-FSH. Leur cytoplasme est coloré en bleu par le trichrome de Cleveland et Wolfe et apparaît en rose brique après l'APS-orangé G (fig. 2 a et b.). Ces cellules réunies en follicules sont localisées essentiellement dans la pars distalis rostralis mais quelques-unes d'entre elles sont observées, dispersées dans les autres zones de l'adénohypophyse. Leur noyau est souvent excentré. Les cellules lactotropes réagissent positivement à l'application d'un anticorps antiprolactine (Tableau IV). Le trichrome de Cleveland et Wolfe les révèle en rose et elles apparaissent orangé-brun après coloration à l'APS-orangé G. Ces cellules sont essentiellement localisées dans la pars intermedia. Quelques-unes d'entre elles sont dispersées dans les autres parties de l'adénohypophyse. Leur noyau est excentré.

Tableau IV : Histochimie et immuno-cytochimie des cellules gonagotropes et des cellules lactotropes. (voir Fig. 2 et 3)

colorations	Cellules gonadotropes	Cellules lactotropes
Cleveland et Wolf	Bleu	Rose-mauve
APS orangé G	Rose	Orange- brun
Anti FSH	+	
Anti LH	+	
Anti PRL		+

2. Etude morphométrique des cellules gonadotropes et lactotropes

a) Les cellules gonadotropes

Un polymorphisme est souvent observé ; conjointement à des cellules ovoïdes, quelques-unes apparaissent coniques ou polymorphes.

La variation des valeurs des coefficients de rondeur des cellules gonadotropes est exprimée par le tableau V.

Tableau V : Distribution des coefficients de rondeur des cellules gonadotropes suivant un regroupement en classes conventionnelles au cours du cycle de reproduction.

Classes	O	D	J	F	M	A	M1	M2	J	J
12,5-14,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14,5-16,5	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
16,5-18,5	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
18,5-20,5	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
20,5-22,5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

En hiver, en période de ponte et après la ponte, les cellules gonadotropes sont globalement rondes. Juste avant la ponte (avril-mai), quelques cellules gonadotropes acquièrent la taille maximale.

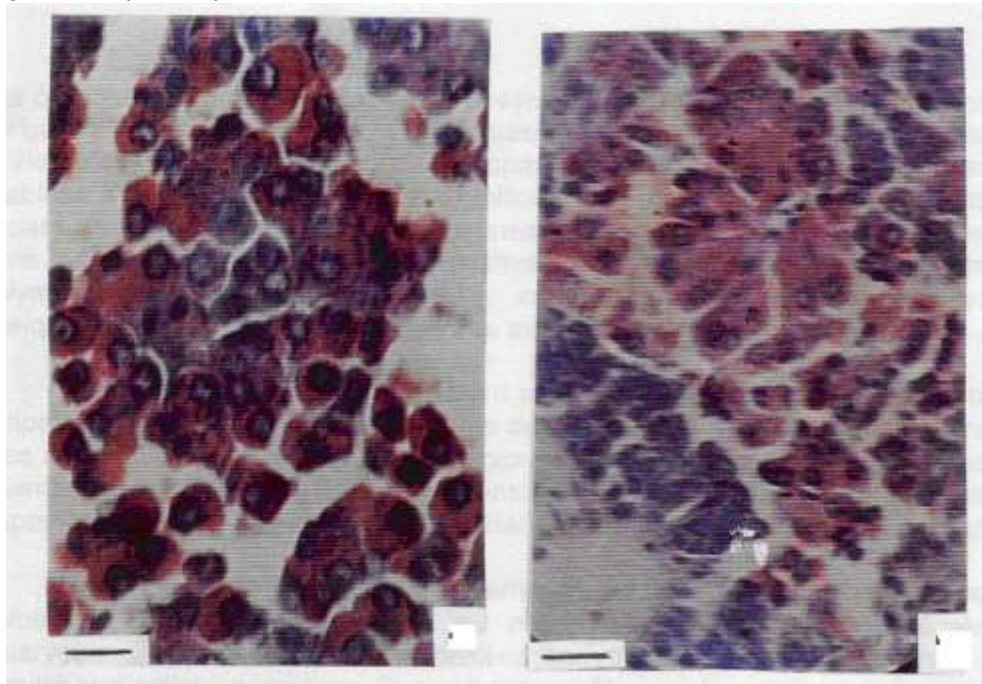


Fig.3 : Mise en évidence par immunocytochimie des cellules gonadotropes chez des black-bass femelles capturées en février (a) et en mai (b). L'échelle indique 20 µm

En février les cellules gonadotropes sont globalement rondes ou ovales. En mai elles présentent une morphologie longiligne dans l'ensemble.

La répartition en classes des valeurs de coefficients de rondeur des cellules gonadotropes au cours du cycle de reproduction donne la figure 5.

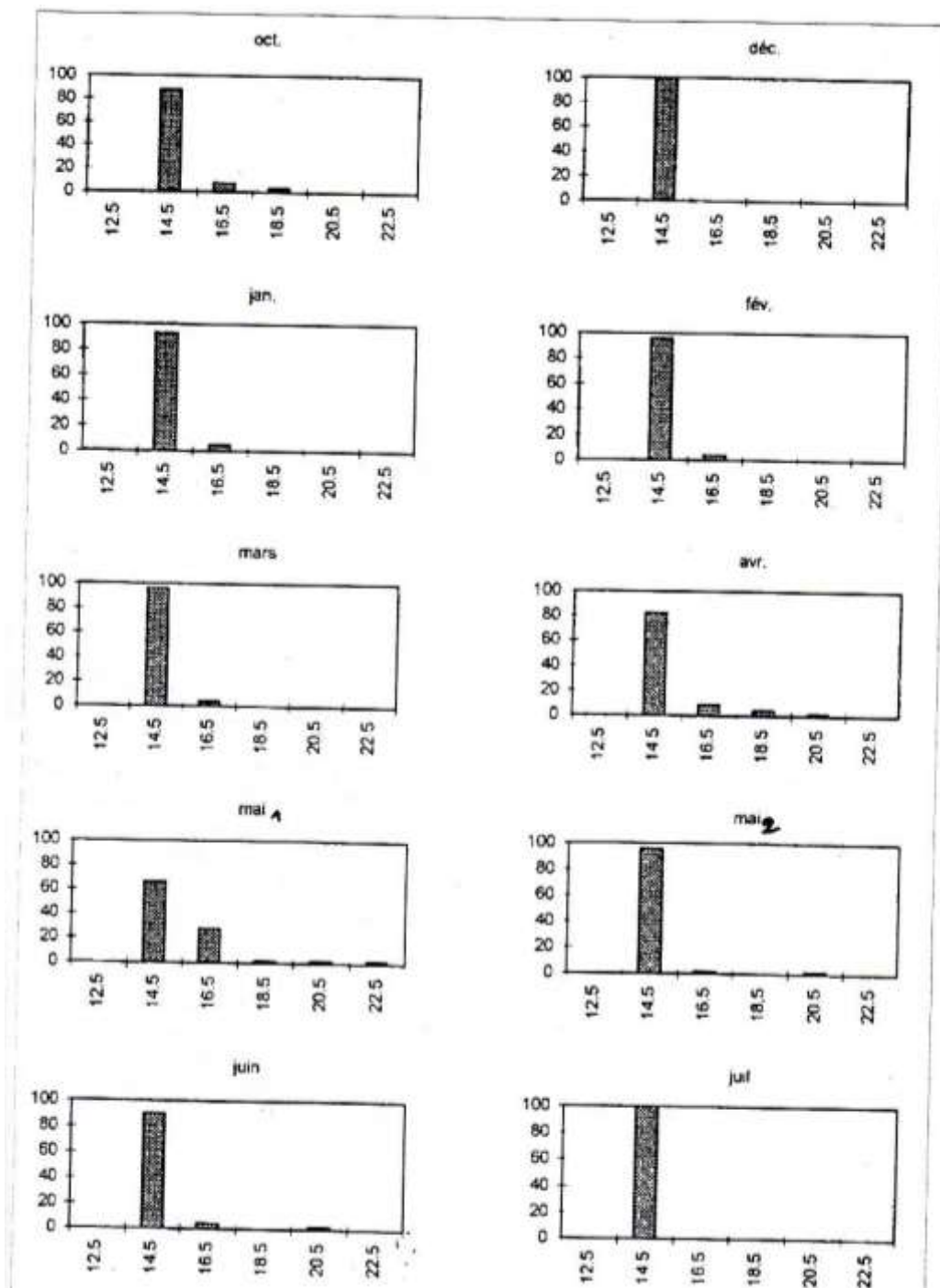


Fig.4 : Distribution de coefficients de rondeur des cellules gonadotropes au cours du cycle (en abscisse : coefficients de rondeur en valeurs absolues en ordonnée : leur pourcentage).

La figure 4 révèle que durant la période de l'hiver, les valeurs de coefficients de rondeur sont au minimum. Ainsi les tailles les plus petites des cellules gonadotropes sont très représentatives en hiver (entre décembre et mars), autrement dit, le nombre des cellules longilignes est au minimum entre décembre et mars. Dans la période post-hivernale, on observe l'augmentation de la taille d'un grand nombre des cellules gonadotropes. Les tailles maximales sont observées entre avril et juin, globalement dans la période précédant directement la ponte et tout le long de la période de ponte.

Dans les zones contenant essentiellement des cellules gonadotropes ou lactotropes, des cellules filiformes au noyau très chromophile sont également observées. Ces cellules sont interprétées comme des cellules endocrines ayant terminé leur activité sécrétrice. Ces cellules ont été appelées cellules filiformes dans cette étude.

b) Les cellules lactotropes

Les quatre classes morphologiques des cellules lactotropes sont significativement représentées en hiver (d'octobre à février). Les deux dernières classes sont quasiment absentes dans les périodes où la température est optimale, c'est-à-dire à partir de mars

Tableau VI : Distribution des coefficients de rondeur des cellules lactotropes suivant un regroupement en classes conventionnelles au cours du cycle sexuel en plaine (le signe - indique l'absence des classes).

Classes	O	D	J	F	M	A	M1	M2	J	J
12,5-14,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14,5-16,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16,5-18,5	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
18,5-20,5	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Le tableau VI donne la fig. :

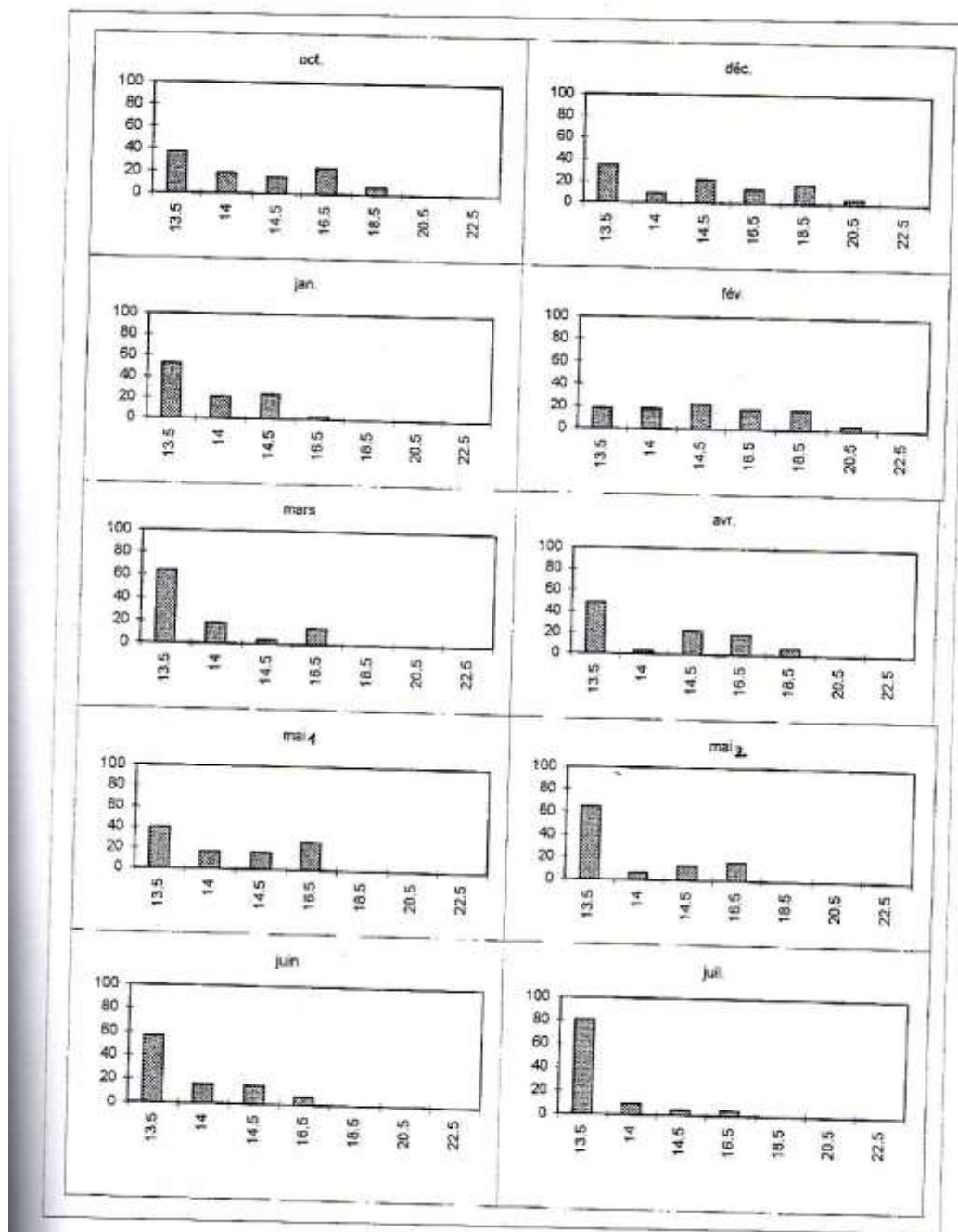
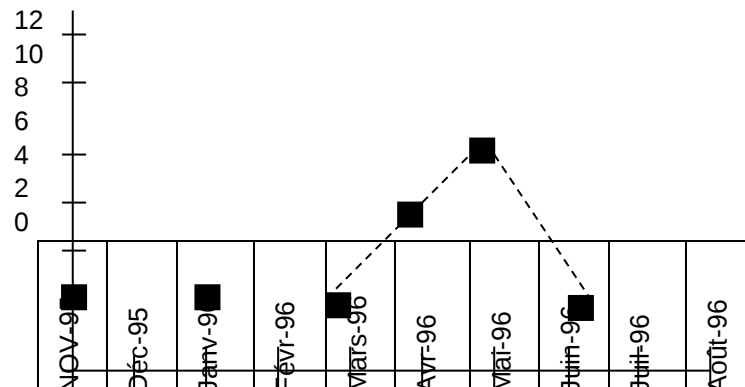


Fig.6. : Distribution des coefficients de rondeur des cellules lactotropes au cours du cycle de reproduction. En abscisses : les coefficients de rondeur en valeurs absolues. En ordonnées leur pourcentage.

Les valeurs maximales de coefficients de rondeur des cellules lactotropes sont observées en février et en décembre. Globalement, d'octobre à février, les classes supérieures sont représentées. Ces valeurs reflètent les tailles maximales des cellules lactotropes pendant l'hiver.

La fig. 8 montre que la ponte a lieu en mai-juin. La décroissance de la courbe du rapport gonadosomatique (RGS) traduit la ponte chez les poissons.



IV. CONCLUSION

Cette étude a portée sur la topographie et à la morphométrie des cellules gonadotropes et des cellules lactotropes chez le Black-bass femelle (*Micropterus salmoides*, Lacipède. Les cellules gonadotropes sont situées essentiellement dans la *pars distalis rostralis* mais elles sont aussi dispersées dans les autres régions de l'adénohypophyse. Les cellules lactotropes s'observent surtout dans la *pars intermedia* et dans d'autres régions de l'hypophyse antérieure, sans regroupement important. Chez les Poissons, ces cellules se localisent essentiellement dans une seule zone (RPD, PPD ou PI). En outre, on observe ces cellules dispersées dans d'autres parties de l'adénohypophyse. De ce point de vue, la répartition des cellules gonadotropes et lactotropes correspond à celle des autres Poissons.

En période de température basse (hiver), les cellules gonadotropes sont inactives contrairement aux cellules lactotropes ; on observe l'inverse en période de température optimale, période qui prépare la ponte. Les sécrétions des cellules gonadotropes influencent la maturation des ovocytes et les cellules lactotropes interviendraient dans le maintien du cycle de reproduction en périodes de basse température. La prolactine (PRL) interviendrait dans des moments de l'hyposécrétion de la gonadotropine et en toutes périodes de détresse du métabolisme des Poissons. Elle serait donc une hormone de détresse dans la classe des Poissons (HUANG et SPECKER, 1994). Le rôle de la PRL chez les poissons a été longtemps réduit à l'osmorégulation, à la mélanogénèse et à la sécrétion du mucus (DHARMAMBA et NISHIOKA, 1968).

Nous envisageons d'autres articles sur les mêmes échantillons de Black-bass femelles pour étudier la maturation des ovocytes ou pour mettre en évidence la fonction de la température dans le contrôle du cycle de reproduction de *Micropterus salmoides*, L .

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BARNABE, G., 1991, Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture, Paris, s.éd., 500p.
2. DHARMAMBA, M.; NISHIOKA, R.S., 1968, Response of "Prolactin secreting" cells of *Tilapia mosambica* to environmental salinity. Gen. Comp. Endocrinol., 10: 409 – 420.
3. EXBRAYAT, Y. M., 2000, Méthodes classiques de visualisation du génome en microscopie photonique, Paris, éd. Médicales, 182 p.
4. HUANG, L. et SPECKER, J.L., 1994, Growth hormone and prolactin-producing cells in the pituitary Gland of striped bass (*Morone saxatilis*): Immunocytochemical characterization at different life stages. Gen. and Comp. Endocrinol, 94, 225-236.
5. LANGERON, M., 1949, Précis de Microscopie (7e éd.), Paris, Masson, 1430 p.
6. NAGAHAMA, Y., 1973, Histo-physiological studies on the pituitary gland of some teleost fishes, with reference to the classification of hormone producing cells in the adeno-hypophysis-Mem. Fac. Fish Hokkaido univers. 21, 1-63.
7. POWER, D. M. 1992, Immunocytochemical identification receptor in goldfish brain: characteristics and seasonal changes. Endocrinology, 123: 1162- 1171.
8. REIBOTH, R., 1972, Hormonal control of the Teleost ovary, Am. Zool., 12: 324-307.
9. SAGE, M ;. BERN, H.A. , 1971, Cytophysiology of the Teleost pituitary., Int. Rev. Cytology, 339-368.
10. VAN DER KRAAK, G., CHANG, J.P.; JANZ, D.M., 1998, Reproduction in The physiology of fishes: 465-488.