L'organe pinéal du Brochet (*Esox lucius* L.)

III. Voies intrapinéales de conduction des messages photosensoriels

par J. FALCON *, J. P. MOCQUARD **

* Laboratoire de Zoologie et Biologie Cellulaire
et Laboratoire associé au CNRS n° 290

** Laboratoire de Physiologie et Génétique
des Crustacés et Equipe de Recherche
associée au CNRS n° 230
40, Avenue du Recteur Pineau 86022 Poitiers
Cédex, France.

Summary. *The pineal organ of the pike (Esox lucius, L.). III. Intrapineal pathways for conduction of photosensory messages.*

In order to elucidate the sensory function of the pineal organ of the pike, *Esox lucius*, the acetylcholinesterase (AChE) reaction of Karnovsky and Roots (1964) was used to demonstrate the pineal neurons. Thirty to 40 sensory neurons (6 to 20 μm in diameter), more numerous in the ventral than in the dorsal wall (ratio : 3/1), were evidenced in the rostral (distal) part of the pineal vesicle (distal pineal). No or very few AChE-positive neurons were observed in the middle pineal. Two hundred to 744 neurons (4 to 11 μm in diameter) were identified in the proximal pineal (pineal stalk). Multipolar elements were generally observed in the distal pineal, while those in the proximal region were mainly pseudounipolar ; bipolar neurons were seen in the distal and proximal pineal.

At the level of the subcommissural organ, the pineal tract running towards the posterior commissure was accompanied by some AChE-positive neurons whose axons also ran towards the posterior commissure or the pineal organ.

The ultrastructural features of sensory neurons were similar to those already described in other vertebrates. Typical photoreceptor cells, mainly in the proximal region, showed ribbon synaptic connections with dendritic processes of sensory neurons.

The pineal tract was composed of two types of axons differing in structure and diameter. Some of the fibers of one type were myelinated at the middle of the pineal stalk, but most were myelinated at the caudal part.

This study completed that of photoreceptor cells and sensory channels ; it was concluded that the photosensory function of the pike pineal organ was 1) mainly developed in the proximal then the distal regions, and 2) regressed (or was lost ?) in the middle pineal.

* Adresse actuelle : Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung, W. G. Kerckhoff-Institut, Parkstrasse 1, 6350 Bad-Nauheim, BRD.

Introduction.

Les résultats obtenus à la suite des études anatomiques, cytologiques et ultrastructurales, complétés, chez certaines espèces, par les données électrophysiologiques, sont en faveur d'une activité photosensorielle de l'organe pinéal de certains Téléostéens (réf. in Falcon, 1979a). Définir une telle activité uniquement à partir des données cytologiques et ultrastructurales requiert la mise en évidence de cellules de type photorécepteur (CTP), d'une part, et de neurones sensoriels (NS), d'autre part. Mais l'innervation sensorielle de l'organe pinéal des Téléostéens est, d'une façon générale, encore mal connue. Ceci est dû aux insuffisances des méthodes de coloration (et/ou d'imprégnation argentique) des neurones sensoriels.

L'étude morphologique nous a permis de distinguer 3 régions : distale, moyenne et proximale, dans l'organe pinéal du Brochet, *Esox lucius*, L. (Falcon, 1979a). Dans l'épithélium distal et proximal, les CTP montrent les différenciations structurales typiques au niveau des pôles cellulaires responsables de la transduction et de la neurotransmission (Falcon, 1979b). Il est donc permis de supposer que ces 2 régions épiphysaires possèdent une activité photosensorielle. Mais, compte tenu (1) des différenciations morphologiques de l'épithélium moyen (plissé, richement vascularisé), (2) de la présence de CTP à caractères rudimentaires (Falcon, 1979a, b), on peut penser que la région moyenne est caractérisée par une régression des cellules impliquées dans l'élaboration et le transport des messages photosensoriels, ayant pour conséquence soit la mise en place, soit la persistance d'une seule activité neurohormonale. Ici, nous nous sommes posés le problème de savoir (1) si l'innervation sensorielle est régressée dans la région moyenne et (2) quelle est son importance dans les régions proximale et distale ? En d'autres termes, existe-t-il — contrairement aux autres épiphyses étudiées jusqu'à ce jour — une répartition hétérogène des neurones sensoriels dans l'épiphyse du Brochet ? Des auteurs ont récemment introduit la méthode de Karnovsky et Roots (1964) pour leur détection dans l'organe pinéal de certains Poissons (Wake, 1973 ; Korf, 1974), Batraciens (Wake et al., 1974 ; Korf, 1976) et Oiseaux (Ueck et Kobayashi, 1972a et b).

Dans le présent travail, nous avons mis à profit l'activité acétylcholinestérasique de tels neurones pour leur étude qualitative et quantitative, puis contrôlé et précisé, en microscopie électronique, certains de nos résultats.

Matériel et méthodes.

1. *Matériel biologique* (voir Falcon, 1979a).
2. *Etude au microscope électronique* (voir Falcon, 1979a).
3. *Mise en évidence de l'activité acétylcholinestérasique.*

Contrairement aux pseudocholinestérases, l'acétylcholinestérase n'est présente que dans les cellules nerveuses (essentiellement cholinergiques : Kiernan et Berry, 1975). Une activité acétylcholinestérasique (AChE) spécifique permet donc de visualiser un neurone.

La thiocholine, libérée après hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'acétylcholinestérase, réduit les ions ferricyanure en ferrocyanure. En présence d'ions cuivreux, on obtient des précipités bruns de ferrocyanure cuivreux (Karnovsky et Roots, 1964). Afin d'intensifier la réaction, nous avons pris en compte les remarques de Hänker *et al.* (1973) : l'osmium est couplé aux précipités formés par l'intermédiaire de la thiocarbohydrazide (TCH).

Treize encéphales de Brochet ont été prélevés et fixés pendant 2 h à $+4^{\circ}\text{C}$, dans le glutaraldéhyde à 5 p. 100, tamponné selon Sørensen (tampon phosphate 0,1 M ; pH 7,4). Ils sont rincés 16 h dans le même tampon additionné de sucrose (0,44 M) puis congelés à -20°C . Les coupes sériées, transversales et parasagittales, de 16 μm d'épaisseur sont effectuées sur cryostat Harris, à -20°C , et étalées sur lames gélatinées.

a) *Incubation dans le milieu de Karnovsky et Roots.* Après 30 mn de séchage à la température ambiante, les coupes sont recouvertes du milieu de composition suivante : 5 mg d'acétylthiocholine iodide (Ach ; Koch Light Lab. Ltd), dans 6,5 ml de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6) ; 0,5 ml de citrate de sodium 0,1 M ; 1 ml de sulfate de cuivre 30 mM ; 1 ml d'eau bidistillée ou de solution d'inhibiteur (voir c) ; 1 ml de ferricyanure de potassium 5 mM. Le pH est ajusté à 6. L'incubation se déroule à $+4^{\circ}\text{C}$, pendant 1 h environ.

b) *Intensification.* Après rinçage dans l'eau bidistillée (à $+4^{\circ}\text{C}$), les coupes sont plongées dans une solution aqueuse de TCH à 0,5 p. 100 (à $+4^{\circ}\text{C}$). De nouveau rincées, elles sont exposées 1 à 3 mn aux vapeurs de tétraoxyde d'osmium (à 2 p. 100), rincées, déshydratées par les alcools, puis montées dans le DPX.

c) *Témoins ; tests de spécificité.* Les coupes témoins sont incubées dans un milieu sans substrat. Pour différencier les activités AChE et pseudocholinestérasiques (PChE), 3 tests sont réalisés :

1. L'Ach est remplacée, dans le milieu d'incubation, par la butyrylthiocholine iodide (Bch ; Koch Light Lab. Ltd), substrat hydrolysé par les pseudocholinestérasiques (PChE).
2. Avant l'incubation, les coupes sont plongées 1 h dans une solution 10^{-5} M d'IsoOMPA (tétraisopropylpyrophosphoramidate ; Koch Light Lab. Ltd) dans le tampon phosphate (0,1 M ; pH 6) à $+4^{\circ}\text{C}$. L'IsoOMPA inhibe les PChE.
3. Avant l'incubation, les coupes sont plongées dans une solution de BW 284 C 51 (1,5-bis-4-allyldiméthylammonium phényl-pentan-3-one dibromide ; Bourroughs Wellcome Co.) à $+4^{\circ}\text{C}$. Le traitement est de 30 mn dans une solution 10^{-4} M (dans le tampon phosphate 0,1 M ; pH 6), d'1 h, 1 h 30 ou 2 h, dans une solution 10^{-5} M (dans le même tampon).

Dans les 2 derniers cas, l'eau distillée du milieu d'incubation est remplacée par 1 ml de la solution d'inhibiteur préalablement utilisée ; le substrat est l'Ach.

d) *Observations et mesures.* Les coupes sont observées au microscope Leitz-Wetzlar et photographiées sur film Kodak panatomic-X. Les diamètres cellulaires sont mesurés à l'aide d'un micromètre oculaire ; les valeurs sont exprimées en unités arbitraires (1 u. a. = 1,87 μm).

PLANCHE I

Mise en évidence des neurones épiphysaires par la méthode de Karnovsky et Roots

- FIG. 1 à 3. — *Coupes témoins, réalisées dans la région proximale.* Aucune réaction positive n'est enregistrée. Fig. 1. En l'absence de substrat dans le milieu d'incubation. Fig. 2. Lorsque la Bch est utilisée comme substrat. Fig. 3. Lorsque le BW 284 C51 est utilisé comme inhibiteur (ds : sac dorsal ; pl : lumière épiphysaire) (fig. 1 et 2 : $\times 120$; fig. 3 : $\times 480$).
- FIG. 4. — *Coupe parasagittale dans les régions distale (dpi) et moyenne (mpi).* Trois neurones sont observés (têtes de flèches) dans l'épithélium ventral de la région distale (dpi). Dans la région moyenne (mpi) aucun neurone n'est mis en évidence ; la petite flèche montre le prolongement axonique d'un neurone se dirigeant vers la région caudale de l'épiphyse ($\times 74$).
- FIG. 5. — *Neurone à faible activité AChE dans la région distale.* Le marquage du cytoplasme est faible et hétérogène (ca : capillaire ; n : noyau ; pl : lumière épiphysaire) ($\times 640$).
- FIG. 6. — *Coupe transversale dans la région moyenne.* Un seul neurone est visible (tête de flèche) ($\times 55$).
- FIG. 7. — *Coupe transversale dans la région proximale antérieure (zone I).* Quelques neurones à activité AChE sont mis en évidence (têtes de flèches) (ds : sac dorsal ; pl : lumière épiphysaire) ($\times 262$).
- FIG. 8. — *Coupe parasagittale dans la région proximale médiane (zone II).* Les neurones, en nombre élevé par unité de surface, ont un cytoplasme très réactif (pl : lumière épiphysaire) ($\times 110$).

e) *Calculs statistiques.* Il s'agit d'étudier le nombre et la taille moyenne des neurones à partir de la répartition des sections observées. Nous avons utilisé le procédé de Henning (*in* Nourtier, 1971 et Briarty, 1975) qui permet d'estimer la distribution des diamètres d'une population de sphères à partir des diamètres des sections circulaires observées. La forme des neurones s'écarte, parfois sensiblement, de celle d'une sphère. Dans de tels cas, nous avons pris comme « diamètre » de la section, le diamètre d'un cercle de surface égale à cette section. Les calculs sont donc effectués sur des données transformées ; le « diamètre » des neurones représente en réalité le diamètre de sphères de volumes égaux à ceux des neurones.

Résultats.

1. *Les corps cellulaires des neurones sensoriels : répartition et étude statistique.* — Après traitement (voir matériel et méthodes), les neurones à activité AChE sont colorés en noir ou brun foncé au niveau des péricaryons et zones d'émergence des prolongements axoniques et dendritiques. Aucune détection n'est possible lorsque le substrat est absent du milieu d'incubation (fig. 1). Il en est de même lorsque le Bch est utilisée comme substrat (fig. 2). Contrairement à l'isoOMPA, le BW 284 C51 (ou anti AChE) inhibe totalement la réaction à la concentration de 10^{-4} M/l (fig. 3) ; à la concentration de 10^{-5} M/l, l'inhibition est partielle. On peut donc affirmer que toutes les cellules réactives sont des neurones à activité AChE.

L'étude anatomique (Falcon, 1979a) nous a permis de distinguer 3 régions dans l'organe pinéal du Brochet, qui seront successivement étudiées.

a) *Neurones de la région distale.* Dans la région distale, le nombre de neurones est trop faible (fig. 4) pour faire l'objet d'une étude statistique séparée. Les résultats obtenus à partir des six Brochets utilisés pour cette étude ont donc été regroupés. Parmi les 198 cellules nerveuses (30 à 40 par individu — l'un d'entre eux en était presque totalement dépourvu), 101 présentaient une forte activité AChE (cytoplasme noir ; fig. 4) alors que 97 montraient une activité beaucoup plus faible (cytoplasme peu marqué présentant parfois une accumulation de précipités noirs ; fig. 5).

PLANCHE II

Diagrammes représentant le nombre de neurones (n) en fonction de leur diamètre (d) exprimé en unité arbitraire (1 u.a. = $1,87 \mu\text{m}$) dans les différentes régions de l'organe pinéal.

FIG. 9a. — Région distale ; neurones à forte activité AChE. Le diagramme présente un profil bimodal (voir texte).

FIG. 9b. — Région distale ; neurones à faible activité AChE. Le diagramme présente un profil unimodal (voir texte).

FIG. 10. — Région proximale : a) antérieure (zone I) ; b) médio-antérieure (zone II) ; c) médio-postérieure (zone III) ; d) postérieure (zone IV). La flèche indique le diamètre moyen calculé pour chaque zone (cf. tableau 1, animal n° 54).

fig. 9

fig. 10

Le diagramme de la figure 9a laisse supposer l'existence de 2 types de neurones, en nombres équivalents et à forte activité AChE : ceux de grand diamètre (8 à 9 u. a. pour la majorité) et ceux de petit diamètre (6 à 7 u. a. pour la majorité). Il n'existerait qu'une catégorie de neurones à faible activité AChE (diamètre moyen 4 à 6 u. a. — voir fig. 9b).

L'épiphyse distale contiendrait donc 3 types principaux de périkaryons se distinguant par leur taille et leur activité AChE. Les neurones, en nombre réduit par unité de surface, sont plus nombreux (fig. 4) dans l'épithélium ventral (environ 3/1).

b) *Neurones de la région moyenne* (fig. 4, 6). Cette région est presque totalement dépourvue de neurones à activité AChE. Les rares périkaryons observés sont toujours intensément « marqués » et proches de la région proximale.

c) *Neurones de la région proximale* (fig. 7, 8, 11, 12). Le nombre de neurones, par unité de surface, est beaucoup plus élevé que dans la région distale. La répartition et les dimensions des cellules réactives sont consignées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Répartition et diamètre des neurones sensoriels dans chaque zone de la région proximale

Animal et coupes	Zone I		Zone II		Zone III		Zone IV		N = $n_1 + n_2 + n_3 + n_4$ = nombre total de cellules
	diamètre (u. a.)	n_1	diamètre	n_2	diamètre	n_3	diamètre	n_4	
50 frontales	4,6 ± 0,56 ($n_1 + n_2 + n_3 = 154$)						3,5 ± 0,04	46	200
51 frontales	3,6 ± 0,69	138	4,2 ± 0,59	124	3,8 ± 0,48	129	3,6 ± 0,34	161	552
52 frontales	4,3 ± 0,63 ($n_1 + n_2 + n_3 = 537$)						3,7 ± 0,77	207	744
53 sagittales	4,1 ± 0,69								354
54 sagittales	4,5 ± 0,42	120	3,9 ± 0,94	141	3,9 ± 0,45	145	3,7 ± 0,42	138	543
55 sagittales	4,1 ± 1,03								345

Pour des raisons uniquement pratiques (calculs statistiques) et non sur des critères morpho-fonctionnels, la tige pinéale a été divisée en 4 zones : Zone I, antérieure (fig. 7), Zone II, médio-antérieure (fig. 8, 11), Zone III, médio-postérieure (fig. 8, 11), Zone IV, postérieure (fig. 12).

A l'examen des données (tabl. 1), il est apparu que la distribution des diamètres des sections présentait un déficit vis-à-vis de la distribution théorique, vers les valeurs les plus petites (inférieures à 3 u. a.). Ce phénomène, connu, est dû en particulier à ce que les sections les plus tangentielles, plus petites et plus minces, sont moins colorées ; leur détection est ainsi plus aléatoire. Nous avons donc écarté des calculs

les mesures inférieures à 3 u. a. et estimé les données manquantes grâce au procédé de Cohen (*in* Bliss, 1967) pour les distributions tronquées.

Les nombres des péricaryons dans la région proximale varient beaucoup d'un animal à l'autre : entre la préparation la plus pauvre et la plus riche, le rapport entre ces nombres est presque de 1 à 4.

Bien qu'il soit difficile de parler d'un gradient de taille des neurones, de la zone I vers la zone IV, on note cependant des différences significatives (sauf chez 2 individus — 53 et 55 — où les coupes n'étaient pas parfaitement parasagittales). La diminution du diamètre cellulaire moyen est très nette dans la majorité des cas. Elle s'explique par une augmentation du nombre des cellules de petit diamètre (3 à 4 u. a.) et parallèlement par une diminution voir une disparition des cellules à plus grand diamètre (6 à 7 u. a.) (fig. 10).

Contrairement à la région distale, tous les diagrammes représentant le nombre de cellules en fonction du diamètre ont un profil unimodal (fig. 10) : il n'y aurait donc qu'un seul type de NS dans la tige épiphysaire au point de vue taille.

2. *Polymorphisme des neurones.* — Sauf exception, les cellules nerveuses sont localisées dans l'épithélium basal. Lorsque le départ des prolongements axoniques et dendritiques est mis en évidence, 3 types de neurones se distinguent dans l'organe pinéal du Brochet :

a) *Les neurones multipolaires* (fig. 13-15). Bien représentés dans la région distale, ils sont rares dans la région proximale. Ils se caractérisent par un prolongement axonique (dont le trajet sera précisé ultérieurement) et deux expansions dendritiques orientées vers la lumière de l'organe ou vers l'avant.

b) *Les neurones bipolaires* (fig. 16-18). Observés dans les régions distale et proximale, ils possèdent une expansion dendritique et un prolongement axonique.

c) *Les neurones pseudo-unipolaires* (fig. 19-21). Ils n'ont été décelés que dans la région proximale. Dendrite et axone ont un cône d'émergence commun.

3. *Ultrastructure des neurones* (voir aussi Falcon, 1979b : fig. 1, 15, 21, 22, 23). — Sur les coupes ultrafines, les neurones sensoriels sont fréquemment observés dans la région proximale, leur détection est plus aléatoire dans la partie distale ; ils n'ont jamais été décelés dans l'épiphyse moyenne. L'étude ultrastructurale concerne donc essentiellement les neurones de l'épiphyse proximale.

De forme sphérique ou ovoïde (fig. 24), les corps cellulaires des neurones sensoriels sont généralement localisés dans le tiers basal de l'épithélium épiphysaire. Le noyau (fig. 24) est volumineux ; il possède une chromatine fine, régulièrement répartie et un nucléole sphérique, dense et excentrique.

Dans le péricaryon (fig. 24), on observe des lysosomes, des particules de glycogène et de nombreux ribosomes libres, associés en rosettes (fig. 25) ; certains sont fixés à la membrane nucléaire externe.

Les dictyosomes sont localisés à la périphérie du noyau (fig. 24, 25). A leur voisinage, on remarque des vésicules claires de 380 à 600 Å de diamètre et plus rarement des vésicules à cœur dense de 500 à 1 000 Å de diamètre (fig. 24, 25).

PLANCHE III

Mise en évidence des neurones épiphysaires par la méthode de Karnovsky et Roots

FIG. 11. — *Coupe transversale dans la région proximale médiane (zone III)*. Le nombre de neurones est encore élevé par unité de surface (*pl* : lumière épiphysaire) ($\times 300$).

FIG. 12. — *Coupe transversale dans la région proximale postérieure (zone IV)*. Les neurones, de faible diamètre, ont un cytoplasme marqué de façon variable (*III* : 3^e ventricule ; *ptr* : emplacement du tractus pinéal) ($\times 144$).

FIG. 13 à 15. — *Neurones multipolaires*. Fig. 13. Région distale ($\times 430$). Fig. 14. Région proximale ($\times 1612$). Fig. 15. Région proximale (*n* : noyau) ($\times 932$).

FIG. 16 à 18. — *Neurones bipolaires*. Fig. 16. Région distale ($\times 756$). Fig. 17. Région proximale ($\times 544$); Fig. 18. Région proximale (*n* : noyau) ($\times 750$).

FIG. 19 à 21. — *Neurones pseudo-unipolaires dans la région proximale*. Fig. 19. ($\times 1\,764$) ; Fig. 20 ($\times 1\,084$) ; Fig. 21 ($\times 1\,764$) (*n* : noyau).

FIG. 22. — *Coupe parasagittale dans la région proximale postérieure et l'organe sous-commissural (sco)* : Les neurones envoient leurs axones (petites flèches) en direction du tractus pinéal (*ptr*) qui occupe une position médio-dorsale (Falcon, 1979a). Ce dernier se poursuit au-dessus de l'organe sous-commissural (*sco*) où l'on observe également quelques neurones réactifs (*epn*) (*pl* : lumière épiphysaire) ($\times 234$).

FIG. 23. — *Deux neurones à activité AChE au niveau de l'organe sous-commissural (sco)* : A droite, le neurone envoie son axone (tête de flèche étroite) vers l'organe pinéal ; à gauche, l'axone (têtes de flèches larges) se dirige vers la commissure postérieure ($\times 546$).

Comme dans tous les neurones sensoriels épiphysaires, l'appareil réticulaire n'est pas très développé. L'ergastoplasme (corps de Nissl) se présente sous forme de saccules ou de canaux, parfois en relation avec l'enveloppe nucléaire.

Les mitochondries sont nombreuses, leurs crêtes ne sont pas dilatées. Neurotubules et neurofilaments sont plus particulièrement observés au départ de l'axone ou des dendrites (fig. 26).

Les prolongements cellulaires sont difficiles à suivre car leur trajet est sinueux. Les terminaisons dendritiques sont observées dans la zone des neuropiles (Falcon, 1979b). Leur neuroplasma clair contient quelques mitochondries, des particules de glycogène et de rares saccules du réticulum lisse. Les neurotubules, nombreux, sont orientés suivant l'axe longitudinal (fig. 27). A côté des vésicules claires de 400 à 600 Å de diamètre, on observe — en nombre plus restreint — des vésicules à cœur dense (500 à 650 Å) (fig. 27).

Outre les structures filamenteuses, le cône d'émergence de l'axone est caractérisé par la présence de nombreux polysomes, de glycogène, de rares mitochondries et de réticulum lisse (fig. 26). Des sections d'axones sont parfois observées près de la lamelle basale.

4. Le tractus pinéal.

a) *Etude en microscopie photonique par la méthode de Karnovsky et Roots.* Comme dans d'autres épiphyses (Carassius : Wake, 1973), la méthode de Karnovsky et Roots ne permet pas d'obtenir de données sur le trajet des axones. Seule leur partie proximale est parfois colorée. Ainsi, il est possible d'observer le départ des prolongements axoniques : ceux-ci longent la lamelle basale en direction de la région caudale et du

PLANCHE IV

Ultrastructure des neurones sensoriels

FIG. 24. — Neurone de la région proximale. Ici sont visualisés une expansion dendritique (dd) et le cône d'émergence d'un axone (ax). Le hyaloplasme est relativement clair. Les dictyosomes (g) occupent une position périnucléaire. Les vésicules à cœur dense (dcv) ont très vraisemblablement une origine golgienne. Le réticulum endoplasmique granulaire (rer) n'est pas particulièrement développé. Noter la présence de lysosomes (ly) et de neurotubules (nt) (n : noyau) ($\times 15\,000$).

FIG. 25. — Sacculles golgiens très développés et dilatés. Remarquer, à proximité, la présence de nombreuses vésicules claires (cv) et de vésicules à cœur dense (dcv). Les polysomes (py) sont nombreux ; on note également la présence de glycogène dans le hyaloplasme (n : noyau ; nt : neurotubule) ($\times 42\,000$).

FIG. 26. — Départ de l'axone (ax). Caractérisé par la présence de nombreux polysomes et de neurotubules ($\times 12\,800$).

FIG. 27. — Contacts synaptiques de type ruban (sr) entre pédicules de photorécepteurs (pp) et une expansion dendritique (dd). Noter les densifications pré- et post-synaptiques (petites flèches). La dendrite est caractérisée par la présence de neurotubules (nt), de vésicules claires (cv) et de vésicules à cœur dense (dcv) ($\times 27\,000$).

tractus (Falcon, 1979a), (fig. 4, 22). Ce dernier, bien que non coloré, est visible sur certaines préparations (fig. 22) : il se dirige vers la commissure postérieure. Au-dessus de l'organe sous-commissural il est accompagné de quelques rares cellules à activité AChE (fig. 22, 23). Ces neurones sont de 2 types : ceux du 1^{er} type envoient leurs axones en direction de la commissure postérieure, ceux du 2^e en direction de l'épiphyse (fig. 23).

b) *Etude en microscopie électronique*. Bien que le nombre de fibres du tractus pinéal n'ait pu encore être rigoureusement estimé, il semble, en première approximation, être assez voisin de celui des corps cellulaires des neurones dans l'organe pinéal. Les coupes transversales, réalisées à différents niveaux de la région proximale montrent l'existence de 2 catégories d'axones, dans le faisceau médio-dorsal, comme, dans les troncs latéraux (Falcon, 1979a).

— *Axones de type 1* (fig. 28, 30) : Ils sont de faible diamètre (0,1 à 0,25 μm) ; leur hyaloplasme, clair, présente de nombreux neurotubules et de rares neurofilaments. Les vésicules claires (350 à 1 000 Å) sont peu abondantes et les grains à cœur dense (650 à 1 000 Å) rares. On observe parfois quelques particules isolées de glycogène. Les mitochondries, très peu nombreuses, sont orientées dans le sens longitudinal.

— *Axones de type 2* (fig. 28-30) : Leur diamètre est supérieur (0,35 à 2,5 μm). Le neuroplasma apparaît clair lorsque les formations fibrillaires sont absentes ; il est dense dans le cas contraire (on observe surtout des neurofilaments). Les vésicules claires (350 à 1 000 Å) forment parfois des amas dans certaines régions de l'axone ; les vésicules à cœur dense, plus nombreuses que dans le type 1, sont de taille très variable (600 à 1 100 Å) (fig. 29). Le glycogène (fig. 29) dont les particules s'associent parfois en rosettes, est abondant. Il n'est pas rare d'observer plusieurs mitochondries par section d'axone, généralement orientées longitudinalement.

Dans la région proximale médiane et surtout caudale, certaines fibres du type 2 sont myélinisées (gaine d'une épaisseur variable de 620 à 1 250 Å) (fig. 30).

PLANCHE V

Ultrastructure du tractus pinéal

FIG. 28. — *Coupe transversale dans la région proximale antérieure*. Deux types d'axones ax_1 (petit diamètre) et ax_2 (grand diamètre) composent le tractus pinéal. Entre les fibres, on observe des prolongements de cellules interstitielles (IC) (bl : lamelle basale; ps : espace périvasculaire) ($\times 12\,000$).

FIG. 29. — *A fort grossissement, les fibres du 1^{er} type (ax_1) sont essentiellement caractérisées par la présence de neurotubules*. Les fibres du 2^e type (ax_2) présentent un hyaloplasme clair ou sombre ; on observe ici quelques structures filamenteuses, des vésicules à cœur dense (dcv) ainsi que des particules de glycogène (gl) (m : mitochondrie) ($\times 36\,000$).

FIG. 30. — *Coupe transversale dans la région proximale postérieure*. Certains axones du type 2 (ax_2) sont myélinisés (me). Entre les fibres du tractus, on remarque des cellules interstitielles (IC) et ici, une cellule à inclusions indéterminées (CUI) (ax_1 : axone du type 1) ($\times 24\,000$).

A la périphérie des faisceaux d'axones, ou entre ces axones, se rencontrent (fig. 30) des cellules interstitielles et leurs prolongements et plus rarement des cellules à inclusions non identifiées (Falcon, 1979a).

Discussion.

La méthode de Karnovsky et Roots (1964) nous a permis de mettre clairement en évidence la présence de neurones à activité AChE dans l'épithélium épiphysaire du Brochet et de préciser leur nombre, dimension et distribution dans cet épithélium. Néanmoins, une étude détaillée de ce type cellulaire n'est pas possible par cette seule technique puisque les prolongements neuronaux ne peuvent être visualisés.

A côté de la mise en évidence de photorécepteurs typiques (Falcon, 1979b), celle de neurones cholinergiques dans l'organe pinéal d'*Esox* est un argument complémentaire en faveur d'une activité photosensorielle (Collin, 1969, 1971, 1977, chez d'autres Vertébrés). Comme chez *Carassius* (Wake, 1973) et *Salmo* (Korf, 1974) — les deux seuls Téléostéens ayant fait l'objet d'une étude similaire — nous observons des neurones multipolaires de grand diamètre et en nombre réduit dans l'épiphyse distale ; dans la tige, les neurones sensoriels sont nombreux et de faible diamètre. Mais contrairement aux deux Téléostéens cités, l'épithélium intermédiaire semble dépourvu ou très pauvre en cellules nerveuses chez les exemplaires de Brochet, ici étudiés. Nous sommes donc en présence d'une régression (discussion *in* Collin, 1969) quantitative (et peut-être qualitative) zonée de l'innervation sensorielle. Si d'une façon générale il y a une régression, importante dans la région distale, quasi totale dans la région moyenne, des variations individuelles ont néanmoins été notées.

Si des contacts synaptiques s'établissent effectivement entre CTP et NS (Falcon, 1979b), il est permis de supposer que dans la région distale, contrairement à la tige, chaque neurone entre en contact avec un grand nombre de CTP, ce qui pourrait justifier la présence de neurones multipolaires. Selon Wake (1973), l'épithélium distal est le plus photosensible chez *Carassius*. La situation semble être différente chez le Brochet où les neurones sont trop peu nombreux, en particulier dans l'épithélium dorsal, pour établir des contacts synaptiques avec toutes les CTP (ils ne représentent que 6 à 20 p. 100 du nombre total de neurones). Dans la région moyenne, aucune CTP ne semble établir de contacts synaptiques. Quelle est alors la signification fonctionnelle de cette catégorie de CTP ? Sont-elles encore capables de transduction et de neurotransmission ? L'étude de l'innervation sensorielle traduit sans aucun doute, parallèlement à celle des CTP, une régression dans la région distale, voire éventuellement une perte, dans la région moyenne, de la fonction photosensorielle. Les études électrophysiologiques (coll. E. Dodt) doivent permettre d'une part de vérifier et d'autre part de préciser ces données.

Dans la partie distale, il est actuellement impossible d'établir une correspondance entre neurones de types morphologiques différents et de tailles différentes. La faible réactivité de certains neurones pourrait être due à un état physiologique particulier (auquel cas il n'y aurait que 2 types de neurones se distinguant par la taille, dans l'épithélium distal).

Dans la région proximale, neurones pseudo- et bipolaires sont de même taille. Les neurones multipolaires observés dans cette région ont un diamètre supérieur à la moyenne (7,5 à 8 u. a.).

Comme chez *Carassius* (Wake, 1973), *Rana* (Wake et al., 1974) et *Ambystoma* (Korf, 1976), des neurones cholinergiques sont présents dans la partie dorsale de l'organe sous-commissural ; leur rôle est énigmatique. D'après Wake (1973), ces cellules groupées constitueraient un organe parapinéal rudimentaire chez *Carassius*. Selon Korf (1976), les neurones du premier type appartiendraient à un système pinéalofoque (afférent par rapport au système nerveux central) ; chez l'Urodèle *Diemictylus* (Flight, 1973), les neurones du deuxième type envoient leurs axones dans l'organe pinéal (où ils établissent des contacts synaptiques avec les dendrites des neurones sensoriels).

A l'échelle ultrastructurale (comme en microscopie photonique), Owman et Rådeberg (1970) n'ont pas réussi à mettre en évidence de neurones sensoriels dans l'épithélium épiphysaire d'*Esox*, peut-être parce que seules les régions distale et moyenne ont été prises en considération.

Les NS de l'organe pinéal du Brochet présentent les mêmes caractéristiques ultrastructurales que celles des Vertébrés où ils ont pu être identifiés. L'appareil réticulaire est peu développé. Les vésicules claires et les grains à cœur dense, observés dans le périaryon et les expansions nerveuses, ont très probablement une origine golgienne, mais leur nature et signification fonctionnelle sont inconnues.

L'importance du tractus pinéal ne surprend pas, étant donné le nombre de périaryons dans l'épithélium épiphysaire. Sa complexité (présence de faisceaux de fibres myélinisées ou non, d'origine inconnue, dans les espaces conjonctifs périphériques, Falcon, 1979a) implique une étude expérimentale pour différencier les fibres d'origine intrinsèque et extrinsèque. Ceci justifie actuellement l'absence d'étude quantitative. Contrairement à *Salmo* (Hafeez et Zerihun, 1974), le tractus pinéal chez *Esox* semble composé de fibres pinéalofoques et de quelques fibres pinéaloépètes (axones des neurones du 2^e type, dans l'organe sous-commissural). Toutefois, aucune structure synaptique, justifiant cette hypothèse, n'a été encore observée en microscopie électronique dans l'épithélium épiphysaire (Falcon, 1979b).

Il n'est pas possible de préciser actuellement à quels types de neurones correspondent les fibres à grand et à petit diamètre, ni pourquoi certaines fibres de grand diamètre se myélinisent.

Conclusion.

Cette étude permet de confirmer et de préciser les résultats obtenus antérieurement (Falcon, 1979a, b). La distribution zonée des NS dans l'épithélium épiphysaire se superpose à la « zonation morphologique » (Falcon, 1979a). La disparition des NS, dans l'épithélium moyen, est en bon accord avec la rudimentation partielle des CTP dans cette région. Nous sommes donc en mesure d'affirmer, pour la première fois, que l'organe pinéal d'un Téléostéen est affecté d'une rudimentation quantitative partielle et zonée qui traduit des variations fonctionnelles d'une région à l'autre (voir aussi, Falcon, 1979a, b).

Les recherches électrophysiologiques, que nous entreprenons actuellement, nous permettront de préciser l'importance de la fonction sensorielle (et de la régression) dans les différentes régions de l'organe pinéal du Brochet. La connaissance des centres où aboutissent les axones des neurones sensoriels pinéalofuges doit permettre de nous éclairer sur la signification de la photosensibilité directe.

L'organe pinéal de certains Téléostéens et du Brochet en particulier, élabore des composés de nature indolique (réf. in Falcon, 1979a). L'élaboration de messages de nature indolique est-elle en rapport avec la régression (partielle) de l'innervation sensorielle ? L'étude des sites cellulaires du métabolisme indolique devrait nous permettre de répondre à cette question.

Reçu en janvier 1979
Accepté en février 1979.

Remerciements. — Nous remercions vivement M. le Professeur J. P. Collin qui nous a confié ce sujet de recherche et nous a apporté ses conseils au cours de la réalisation de ce travail. Celui-ci a été effectué grâce à une bourse et à un contrat DGRST (n° 76.7.0043) et à l'appui financier du CNRS. Nous remercions également Mlle Decourt qui a assuré la dactylographie de ce mémoire.

Références

- BLISS C. I., 1967. *Statistics in biology*. McGraw-Hill, vol. 1, 558 pp.
- BRIARTY L. G., 1975. Stereology : methods for quantitative light and electron microscopy. *Sci. Prog. Oxf.*, **62**, 1-32.
- COLLIN J. P., 1969. Contribution à l'étude de l'organe pinéal. De l'épiphyse sensorielle à la glande pinéale : modalités de transformation et implications fonctionnelles. *Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse, Suppl. 1*, 1-359.
- COLLIN J. P., 1971. Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphysis cerebri, 79-125. In WOLSTENHOLME G. E. W., KNIGHT J., *The pineal gland*, Churchill Livingstone, Edinburg-London.
- COLLIN J. P., 1977. La rudimentation des photorécepteurs dans l'organe pinéal des Vertébrés 393-407. In RAYNAUD A., *Mécanismes de la rudimentation des organes chez les Embryons de Vertébrés*, Coll. int. CNRS n° 266, Paris.
- FALCON J., 1979a. L'organe pinéal du Brochet (*Esox lucius*, L.). I. Etude anatomique et cytologique. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **19**, 445-465.
- FALCON J., 1979b. L'organe pinéal du Brochet (*Esox lucius*, L.). II. Etude en microscopie électronique de la différenciation et de la rudimentation partielle des photorécepteurs ; conséquences possibles sur l'élaboration des messages photosensoriels. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **19**, 661-688.
- FLIGHT W. F. G., 1973. Observations on the pineal ultrastructure of the urodele, *Diemictylus viridescens viridescens*. *Koninkl. nederl. Akad. Wetensch. Amsterdam., Ser. C*, **76**, 425-448.
- HAFEEZ M. A., ZERIHUN L., 1974. Studies on central projections of the pineal nerve tract in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, using cobalt chloride iontophoresis. *Cell Tiss. Res.*, **154**, 485-510.
- HÄNKER J. S., THORNBURG L. P., YATES P. E., MOORE H. G., 1973. The demonstration of cholinesterases by the formation of osmium blacks at the sites of Hatchett's brown. *Histochemie*, **37**, 223-242.
- KARNOVSKY M. J., ROOTS L., 1964. A « direct-coloring » thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 219-221.
- KIERMAN J. A., BERRY M., 1975. Neuroanatomical methods, 1-77. In BRADLEY P. B., *Methods in brain research*, John Wiley and sons, London.

- KORF H. W., 1974. Acetylcholinesterase-positive neurons in the pineal and parapineal organs of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* (with special reference to the pineal tract). *Cell Tiss. Res.*, **155**, 475-489.
- KORF H. W., 1976. Histological, histochemical and electron microscopical studies on the nervous apparatus of the pineal organ of the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*, *Cell Tiss. Res.*, **174**, 475-497.
- NOURTIER G., 1971. Méthodes d'estimation quantitative au service de la cytologie. *Ann. Biol.*, **10**, 241-278.
- OWMAN C., RÜDEBERG C., 1970. Light, fluorescence and electron microscopic studies on the pineal organ of the pike *Esox lucius* L., with special regard to 5-hydroxytryptamine. *Z. Zellforsch.*, **107**, 522-550.
- UECK M., KOBAYASHI H., 1972a. Vergleichende Untersuchungen über acetylcholinesterase-haltige Neurone im Pinealorgan der Vögel. *Z. Zellforsch.*, **129**, 140-160.
- UECK M., KOBAYASHI H., 1972b. Secretory and neuronal elements of the avian pineal organ. *Gen. comp. Endocr.*, **18**, 627.
- WAKE K., 1973. Acetylcholinesterase-containing nerve cells and their distribution in the pineal organ of the goldfish, *Carassius auratus* Z. *Zellforsch.*, **145**, 287-298.
- WAKE K., UECK M., OKSCHE A., 1974. Acetylcholinesterase-containing nerve cells in the pineal complex and subcommissural area of the frogs, *Rana ridibunda* and *Rana esculenta*. *Cell Tiss. Res.*, **154**, 423-442.
-