

DÉTECTION DES PROENZYMES PROTÉOLYTIQUES DU PANCRÉAS DE LAPIN PAR IMMUNO-FLUORESCENCE (EMBRYON, NOUVEAU-NÉ, ADULTE)

D. COURTOT, T. CORRING ⁽¹⁾ et P. LAVIOLETTE

*Laboratoire de Biologie,
Institut national des Sciences appliquées, 69 - Villeurbanne*

RÉSUMÉ

La technique d'immuno-fluorescence a permis d'étudier l'apparition et la localisation de deux proenzymes spécifiques du pancréas exocrine de lapin adulte au cours du développement embryonnaire et post-natal. Une adaptation des techniques classiques permet la fixation du tissu pancréatique à l'alcool formol et l'inclusion dans la paraffine à 56°C. La méthode de coloration directe est appliquée avec les immun sérums antitrypsinogène et anti- α -chymotrypsinogène.

INTRODUCTION

Depuis sa description par COONS *et al.* (1942), le principe de la technique d'immunofluorescence fut repris par de nombreux auteurs et appliqué à la localisation de diverses substances tant dans le domaine de la biologie cellulaire que de la virologie par exemple. Cependant, chaque étape expérimentale de cette technique nécessite une mise au point particulière qui est fonction du matériel et du domaine que l'on se propose d'étudier.

Au cours d'un travail précédent (CORRING, 1966), la technique d'immunofluorescence a été utilisée pour l'étude de la localisation de l' α -chymotrypsinogène et du trypsinogène dans le pancréas de lapin adulte. La préparation du tissu pancréatique par congélation, la fixation et les coupes au cryostat ont entraîné de nombreuses manipulations souvent complexes et ont limité les possibilités de la technique.

Dans ce travail, nous avons essayé d'apporter une simplification à ce stade

⁽¹⁾ Adresse actuelle : Station de Recherches sur l'Élevage des Porcs, Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas.

expérimental. Une étude comparative des divers points des méthodes de MARSHALL (1954) et de SAINTE-MARIE (1961) a permis d'aborder cet essai notamment en effectuant une inclusion du tissu pancréatique dans la paraffine, technique de l'histologie classique.

Nous avons testé cette méthode en étudiant la localisation des deux précurseurs protéolytiques cités, dans le pancréas de lapin au cours de la vie embryonnaire et des premiers jours de l'animal nouveau-né.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Isolement et purification de l' α -chymotrypsinogène et du trypsinogène de lapin

Pour améliorer la spécificité des résultats nous avons essayé d'obtenir sous une forme aussi purifiée que possible les deux proenzymes protéolytiques de lapin.

L' α -chymotrypsinogène et le trypsinogène ont été isolés du tissu pancréatique par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium, purifiés par une série de recrystallisations successives, selon les techniques de KÜNITZ et NORTHROP (1948) et lyophilisés (CORRING, 1966).

La pureté de ces protéines a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et par leur activité enzymatique après activation.

Obtention des anticorps et analyse

Pour l'immunisation, nous avons utilisé 5 coqs *Leghorn* : 2 coqs ont été immunisés contre l' α -chymotrypsinogène, 2 autres contre le trypsinogène, 1 coq n'a reçu aucune injection d'antigènes et sert de témoin. Les immun sérums ont été obtenus à raison d'une injection quotidienne durant 3 jours, suivie de 4 jours de repos. Le tout pendant 5 semaines. Une semaine plus tard les animaux reçoivent une injection de rappel. La quantité totale de protéines administrée par animal est de 23,5 mg répartie comme indiqué dans le tableau 1.

TABLEAU I

Posologie des injections pour l'obtention des anticorps

1 ^{re} semaine	Intra-veineuse	0,5 ml NaCl 9 ‰ + 0,5 ml d'adjuvant de Freund
2 ^e semaine	—	0,5 ml d'adjuvant + 0,5 ml de sol. Antigène (1 mg/ml)
3 ^e semaine	—	1 ml de solution d'Ag. (1 mg/ml)
4 ^e semaine	—	— — — (2 mg/ml)
5 ^e semaine	—	— — — (3 mg/ml)
Rappel	—	— — — (4 mg/ml)

L'inoculation de l'adjuvant de Freund et des antigènes par voie intraveineuse, qui est une méthode généralement dangereuse pour l'animal, nous a permis de diminuer la durée de l'immunisation. Un système d'injection utilisant les voies intramusculaire et sous-cutanée nécessite 3 à 4 mois pour obtenir le même taux d'anticorps.

Afin de suivre l'apparition des anticorps, des prélèvements de sang sont effectués périodiquement dans la veine alaire. Le taux d'anticorps est estimé selon la technique du Ring test. Lorsque les immun sérums obtenus présentent un titre de 1/32 000, valeur supérieure à celle jugée convenable pour l'analyse immuno chimique (CROWLE, 1961), le sang est prélevé dans sa plus grande totalité par ponction intra-cardiaque. Le sérum est séparé, du caillot formé, par centrifugation.

La pureté des protéines et la spécificité des immun sérums ont été vérifiées par la méthode d'OUCHTERLONY (1962) de double diffusion en gélose et la microimmunoélectrophorèse. La concentration optimale d'antigène que nous avons utilisé est de 5 mg/ml.

Nous avons ainsi obtenu une seule ligne de précipitation pour le sérum anti α -chymotrypsinogène et deux lignes pour le sérum antitrypsinogène. De plus, nous avons noté une réaction croisée entre le trypsinogène et l' α -chymotrypsinogène. Par contre, les protéines d'origine bovine ne réagissent pas avec les immunosérums même à une concentration de 15 mg/ml.

Cette analyse qualitative tendrait à prouver que l' α -chymotrypsinogène a été obtenu sous une forme purifiée alors que pour les solutions de trypsinogène nous ne pouvons pas tirer de conclusions définitives. En effet, il peut exister soit une impureté dont nous n'avons pu préciser la nature, soit une forme de monomère et de dimère pour l'antigène et dans ce dernier cas le trypsinogène serait pur.

Préparation des conjugués

Les gamma-globulines, isolées des immunosérums par précipitation au sulfate d'ammonium et dialysées, sont conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) à raison de 0,05 mg/mg de protéine. La quantité de fluorochrome nécessaire pour conjuguer une solution de gamma-globulines est dissoute dans un volume de tampon à pH 9,0 égal au 1/10 du volume final. Puis la solution d'ITCF est ajoutée à la solution de globulines. L'eau saline tamponnée à pH 7,0 (Na_2HPO_4 1,38 g ; NaCl 1 g ; H_2O q.s.p. 11) permet de compléter pour obtenir une solution ayant une concentration en protéine de 1 p. 100. Toutes les solutions de conjugués sont ainsi ramenées à la même concentration en protéine.

La solution ainsi préparée est placée à + 4°C sous agitation lente et constante pendant une nuit.

Le fluorochrome non fixé est éliminé par dialyse contre de l'eau saline tamponnée à pH 7,0 à + 4°C. Cette opération est prolongée jusqu'à la disparition totale de la fluorescéine de l'eau de dialyse.

Pour éliminer le plus possible la coloration non spécifique, divers procédés sont utilisables : filtration sur DEAE-cellulose, adsorption sur poudre d'organe. Cette dernière méthode a été préférée à la première car elle est plus simple à mettre en œuvre, et d'un coût moins élevé. L'utilisation de poudre de foie commerciale (N. B. C.) n'a pas donné entière satisfaction, la coloration non spécifique étant trop intense. Par suite, nous utilisons une poudre acétonique de foie de lapin, préparée selon la méthode décrite par COONS (1950). Pour éviter la perte de volume lors de l'adsorption, avant son emploi, la poudre de foie est mise en suspension pendant une heure dans l'eau saline tamponnée puis centrifugée. Il s'est avéré que ce « mouillage » est nécessaire pour une bonne élimination de la coloration non spécifique.

Préparation des coupes de tissu pancréatique

Dans un premier temps, les essais de fluorescence ont été effectués sur des coupes de tissu frais congelé (CORRING, 1966). A ce stade de l'expérimentation deux opérations ont demandé une attention particulière : la congélation et la fixation.

1. Congélation.

Le tissu pancréatique est prélevé immédiatement après la mort de l'animal et très rapidement immergé dans de l'isopentane pur refroidi par de l'azote liquide.

2. Fixation.

Le tissu congelé est coupé à 8 μ sur un microtome Campbell incorporé dans un cryostat à - 20°C. Chaque coupe est recueillie sur une lame de microscope immergée par la suite dans le fixateur. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le mélange dioxane-formol (50 p. 100/4 p. 100) fixateur employé par MARSHALL (1954), la durée de fixation étant de 5 minutes à température ambiante. Cette technique de coupes à congélation nous a servi de point de départ pour rechercher une méthode plus simple et de routine. Nous avons modifié la technique d'inclusion dans la paraffine décrite par SAINTE-MARIE (1961) en vue de l'adapter à notre problème.

Divers fixateurs ont été utilisés : alcool 95° + formol 1,5 p. 100 ; dioxane formol (50 p. 100-4 p. 100) ; fixateur de HELLY. Ces fixateurs permettent de conserver le mieux possible la structure des tissus. Dans tous les cas la durée de fixation est de 15 à 20 heures à + 4°C. La déshydratation s'effectue à + 4°C dans 4 bains d'alcool absolu d'environ 1 heure chacun, puis 2 bains de toluène. Pour faciliter la coupe, ces derniers ne doivent pas excéder 10 minutes. Par contre, les fragments de pancréas peuvent très bien séjourner 24 à 48 heures dans l'alcool absolu à + 4°C. Après inclusion dans la paraffine à 56°C, les blocs sont conservés dans un dessiccateur à + 4°C. Les coupes sont montées avec de l'albumine glycinée et séchées 30 minutes à 37°C, puis placées

dans un dessiccateur et conservées à + 4°C pendant la nuit pour terminer le séchage. Les coupes ainsi préparées peuvent se conserver pendant trois mois à + 4°C. La meilleure conservation a été obtenue avec l'alcool formol.

Avant la coloration, les coupes sont déparaffinées à la flamme puis passées dans deux bains de toluène, 3 bains d'alcool à 95°, 3 bains d'eau saline tamponnée à pH 7,0. Ces bains sont effectués à température ambiante, leur durée est d'environ 10 secondes.

Coloration

Nous avons appliqué la méthode de coloration directe, la durée de contact des conjugués a été fixée à 45 minutes à la température ambiante. Les solutions de conjugués sont employées sans dilution. Les préparations sont montées dans la glycérine tamponnée (glycérine 9 parties, tampon phosphate pH 7,0 1 partie). Après coloration les préparations peuvent être conservées pendant 2 à 3 semaines à + 4°C.

Matériel optique

Nous utilisons un microscope Leitz avec une lampe à vapeur de mercure à haute pression CS 150 W. Les filtres utilisés étant les suivants :

- un filtre anticalorique KGI Leitz ;
- un filtre d'excitation BG 12 (5 mm) ;
- un filtre protecteur dit d'arrêt.

RÉSULTATS

Quel que soit le fixateur utilisé et la technique de préparation du tissu pancréatique (congélation ou inclusion dans la paraffine), nous obtenons une localisation identique et des images de qualité égale avec un bon contraste entre les zones sombres et les zones fluorescentes. Cependant l'inclusion dans la paraffine a permis de conserver les préparations et d'effectuer ainsi des observations beaucoup plus nombreuses, sans oublier la facilité des manipulations.

Contrôles de spécificité

Des coupes de foie et de rein de lapin colorées avec les solutions de conjugués ne donnent aucune réaction de fluorescence. Il en est de même pour des coupes de pancréas traitées avec un sérum témoin.

La réaction de fluorescence est donc bien spécifique du pancréas et des précurseurs protéolytiques.

Localisation chez l'animal adulte (pl. hors-texte, fig. 1 et 2)

La réaction de fluorescence ne se produit que dans l'apex cellulaire, où nous pouvons observer des granulations fluorescentes correspondant certainement aux grains de zymogène dont la localisation est identique. La zone périnucléaire est dépourvue de toute fluorescence.

Par contre, dans la lumière des acini, la fluorescence apparaît sous la forme d'une plage uniforme.

Les îlots de Langerhans apparaissent noirs, la réaction de fluorescence est donc bien spécifique du pancréas exocrine.

Localisation chez le Lapereau (pl. hors-texte, fig. 3)

Chez le nouveau-né, la fluorescence est plus diffuse dans toute la cellule avec un léger maximum d'intensité de l' « apex cellulaire » sous forme de granulations. Seul le noyau reste franchement non coloré. Il est à noter que la lumière des « acini » est vide de toute fluorescence. Ce n'est qu'aux environs du 14^e jour que la localisation devient identique à celle de l'animal adulte.

Localisation chez l'embryon (pl. hors-texte, fig. 5 et 6)

Les proenzymes ne sont décelables que chez des foetus âgés de 22 jours au moins. La coloration de fluorescence est localisée d'une façon identique à celle observée chez le Lapereau. Avant ce stade du développement embryonnaire nous n'observons aucune différence entre les coupes traitées avec un sérum témoin et celles colorées avec un immunosérum spécifique.

DISCUSSION

La discussion portera essentiellement sur 2 points soulevés par l'analyse des résultats :

- apparition de proenzymes au cours de la vie embryonnaire ;
- à quoi peut-on attribuer la différence observée entre les coupes de pancréas adulte et celles de l'embryon ou du nouveau-né ?

1. Apparition des proenzymes au cours de la vie embryonnaire

Chez des embryons de 16 jours nous n'avons pu observer que des canaux indifférenciés avec très peu de massifs cellulaires. Ces derniers augmentent chez des embryons de 18 jours. A 20 jours quelques acini se forment, leur nombre s'accroissant ensuite au cours du développement.

Des coupes de pancréas provenant d'embryons âgés de 16, 18, 20, 21 jours ont toujours donné une réaction de fluorescence négative, alors que pour des embryons de 22, 23, 24, 26, 28, 30 jours nous avons toujours obtenu une coloration positive. Bien que le nombre d'expériences soit encore assez réduit, nous pouvons tenter de définir un seuil à partir duquel les proenzymes caractéristiques de l'animal adulte sont décelables au cours de la vie embryonnaire. Les résultats de l'immuno-fluorescence nous permettent de fixer ce seuil à 22 ± 1 jours.

Cependant le fait que nous ne puissions observer une réaction positive de fluorescence chez des embryons âgés de moins de 22 jours, n'est pas une preuve suffisante pour affirmer avec certitude que le trypsinogène et l' α -chymotrypsinogène ne sont pas synthétisés chez des embryons plus jeunes.

En effet, les antigènes utilisés sont des protéines spécifiques de l'adulte et par suite s'il existe des proenzymes « embryonnaires » nous ne pouvons pas les détecter pour des raisons qualitatives. De plus, au point de vue quantitatif, et bien que la technique d'immunofluorescence permette de déceler de très faibles quantités de protéines, les proenzymes protéolytiques peuvent être présents mais à des concentra-

tions insuffisantes pour être décelables. Ce ne serait qu'aux environs du 22^e jour du développement embryonnaire que cette concentration atteint un niveau suffisant permettant une réaction de fluorescence positive.

Cette augmentation brutale de la concentration des enzymes pancréatiques n'est pas particulière au Lapin. En effet RUTTER (1965) étudiant la mise en place de l'activité amylasique dans le pancréas embryonnaire des Souris, montre que cette activité présente une augmentation importante à partir du 13^e jour du développement embryonnaire. Selon l'auteur, la synthèse et probablement celle des autres enzymes pancréatiques est en corrélation étroite avec la formation des structures intracellulaires. D'autres auteurs (KALIMAN et GROBSTEIN, 1964 ; WESSELS et EVANS, 1968) lors d'une étude au microscope électronique du pancréas embryonnaire de souris, vérifient que la mise en place des structures intracellulaires se fait de façon progressive. Ils aboutissent à la conclusion que dans un premier temps les cellules ne peuvent synthétiser que de très faibles quantités de protéines. Ces observations sont faites sur des embryons de 10 jours. Environ 5 jours plus tard les premiers zymogènes apparaissent quand la quantité de protéines synthétisées est suffisante. RUTTER *et al.* (1968) observent les mêmes phénomènes sur des embryons de Rat. Ils considèrent qu'au cours de la différenciation il existe 3 stades plus ou moins définis pour la mise en place des protéines spécifiques. Le stade I correspondrait à une concentration très faible de protéines, le stade II à une concentration environ 1 000 fois plus élevée, le stade III à l'animal adulte.

Le passage du stade I au stade II a lieu entre le 15^e et le 18^e jour c'est-à-dire vers la fin de la gestation. Cette période de transition correspond à la mise en place du réticulum endoplasmique granulaire et à l'apparition des premiers grains de zymogène.

Cet arrangement des structures intracellulaires permet donc une synthèse protéique plus efficace, par suite la concentration protéique se trouve augmentée dans la cellule. Ceci peut expliquer dans le cas du Lapin le seuil à partir duquel il nous est possible de détecter les proenzymes protéolytiques spécifiques de l'adulte.

2. Remarques sur la différence de localisation de la fluorescence entre le nouveau-né et l'animal adulte

Bien que la synthèse des protéines spécifiques soit en place, nous n'obtenons pas des images identiques si l'on considère d'une part, le pancréas d'embryons et de nouveau-nés, et d'autre part, le pancréas d'animaux adultes. Cette différence de localisation nous conduit à penser que dans la cellule embryonnaire la concentration des protéines enzymatiques est plus importante dans la zone périnucléaire que dans une cellule adulte. Comment peut-on expliquer cette différence qui apparaît paradoxale ?

Des études sur la cinétique de la synthèse protéique dans la cellule pancréatique à l'aide d'acides aminés marqués (PALADE et coll., 1962) montrent que l'incorporation dans les éléments intracellulaires de tels acides aminés est très rapide. Cinq minutes après l'injection de leucine ¹⁴C, la radioactivité se retrouve au niveau du réticulum endoplasmique, 45 minutes après elle se situe dans les grains de zymogène et 4 heures plus tard dans la lumière de l'acinus. Ces études sont faites sur des cellules acineuses du pancréas de cobaye adulte.

Bien que le matériel soit différent, on peut penser que chez un lapin adulte il

en est approximativement de même. Du fait de ce transit très rapide des protéines, la probabilité de les trouver en concentration suffisante dans la zone périnucléaire est très faible. Il n'est pas possible de les détecter par immunofluorescence à ce point de la cellule. Ce n'est qu'au niveau de l'apex cellulaire que leur concentration est suffisante et qu'elles séjournent le plus longtemps. Ce phénomène peut expliquer la fluorescence très intense à ce niveau et le bon contraste entre l'apex et la base de la cellule, ceci pour un animal adulte.

Nous pouvons supposer que chez l'embryon et le nouveau-né ce phénomène de transport des protéines à travers la cellule, s'il existe, est très peu efficace. Par suite, nous avons beaucoup plus de chances de trouver des protéines réparties en concentration suffisante dans toute la cellule. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'on ne retrouve jamais de fluorescence dans la lumière des acini, et que la fluorescence au niveau de l'apex n'est guère plus intense que dans tout le reste de la cellule ; ce qui semblerait prouver une absence d'exportation enzymatique.

Il semble d'après ces observations qu'en dépit de la présence des proenzymes caractéristiques de l'adulte, les cellules du pancréas exocrine ne deviennent réellement fonctionnelles qu'à partir du moment où les protéines enzymatiques peuvent être synthétisées en quantité suffisante et rassemblées sous forme de grains de zymogène puis sécrétées dans la lumière des acini.

Reçu pour publication en novembre 1969.

SUMMARY

DETECTION OF PROTEOLYTIC PRO-ENZYMES OF THE PANCREAS OF THE RABBIT BY IMMUNO-FLUORESCENCE. (EMBRYO, NEWBORN, ADULT)

α -Chymotrypsinogen and trypsinogen of the exocrine pancreas of adult rabbits were isolated and purified according to the method described by KÜNITZ and NORTHROP (1948). After checking of their purity by electrophoresis on polyacrilamide gel the pro-enzymes were injected into *Leghorn* cocks for the formation of antibodies (Posology of injections. table 1). The specificity of the immunosera obtained was verified by double diffusion and microimmunoelectrophoresis in agar gel.

The antibodies were conjugated to fluoresceine isothiocyanate (I. T. C. F.). The conjugates thus prepared were purified on powdered rabbit liver.

Pancreatic tissue of rabbits was included in paraffin after fixing (modified technique of SAINTE-MARIE: 1961). The slices could be kept for 3 months before staining at + 4°C.

Résultats. - Localization in the adult. (Legend outside text-photos 1 and 2.)

Only the cellular apex showed fluorescent coloration, thus allowing localization of the pro-enzymes studied.

Localization in the newborn. (Legend outside text, photo 3.)

All the cell was fluorescent with a small maximum at the apex.

Localization in the embryo. (Legend outside text, photos 5 and 6.)

α -Chymotrypsinogen and trypsinogen were detectable only in foetuses adeg at least 22 days.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- COONS A. H. et coll., 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.*, **45**, 159-170.
- CORRING T., 1966. *Localisation par immuno-fluorescence de deux protéines enzymatiques du pancréas exocrine de lapin (trypsinogène et α -chymotrypsinogène).* Thèse 3^e cycle Lyon.

- CROWLE A. J., 1961. *Immuno-diffusion*. Acad. Press. N. Y. et Lond.
- KALLMAN F., GROBSTEIN C., 1964. Fine structure of differentiating mouse pancreatic exocrine in transfilter culture. *J. Cell. Biol.*, **20**, 399-413.
- KÜNITZ M., NORTHROP J. H., 1948. *Crystalline enzyme*, 2^e ed. Columbia Univ. Press. N. Y.
- MARSHALL J. M., 1954. Distribution of chymotrypsinogen, procarboxypeptidase, desoxyribonuclease and ribonuclease in bovine pancreas. *Expt. Cell. Res.*, **6**, 240-242.
- OUCHTERLONY O., 1962. Diffusion in gels methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, **6**, 30-154.
- PALADE G. E., SIEKEVITZ P., CARO L. G., 1962. Structure, chemistry and function of the pancreatic exocrine cell. In *The exocrine pancreas*. Ciba Foundation 23-55. Ed. Reuck and Cameron, Churchill publishers, Lond.
- RUTTER W. J., WESSELS N. K., GROBSTEIN C., 1965. Control of specific synthesis in the developing pancreas. In *Molecular and cellular aspects of development* 381-391. Ed. Bell E., Harper and Row publishers. N. Y.
- RUTTER W. J., *et al.*, 1968. Regulation of specific protein synthesis in cytodifferentiation. *J. Cell. Physiol.*, **72**, sup. 1, 1-18.
- SAINTE-MARIE S., 1961. A paraffin embedding technique for studies employing immuno-fluorescence. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**, 250-256.
- WESSELS N. K., EVANS J., 1968. Ultrastructural studies of early morphogenesis and cytodifferentiation in the embryonic mammalian pancreas. *Dev. Biol.*, **17**, 413-446.

PLANCHE I

FIG. 1. 2

Coupe de pancréas de lapin adulte traitée avec un antisérum fluorescent spécifique. La fluorescence est localisée à l'apex cellulaire. Photo 1 × 150. Photo 2 × 800.

Fig. 3

Cellule exocrines de pancréas de lapereau âgé d'un jour. La fluorescence est diffuse dans toute la cellule × 800.

FIG. 4

Coupe de pancréas de lapin adulte traité avec le sérum fluorescent d'un coq non immunisé × 300.

FIG. 5. 6

Coupe de pancréas d'embryons de lapin âgés respectivement de 26 et 16 jours. La réaction de fluorescence n'apparaît positive que sur la photo 5 × 300.

