



HAL
open science

LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES : UNITES FONCTIONNELLES D'UNE VOIE DE COMMUNICATION A LONGUE DISTANCE DANS L'HYPHYPHYSE ANTERIEURE.

Teddy Fauquier

► **To cite this version:**

Teddy Fauquier. LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES: UNITES FONCTIONNELLES D'UNE VOIE DE COMMUNICATION A LONGUE DISTANCE DANS L'HYPHYPHYSE ANTERIEURE.. Neurobiologie. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2001. Français. NNT: . tel-00770829

HAL Id: tel-00770829

<https://theses.hal.science/tel-00770829>

Submitted on 7 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

Année 2001

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Discipline : Neurosciences

Formation doctorale : Neurobiologie des Processus de Communication et d'Intégration

Ecole doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

Présentée et soutenue publiquement

le 17 Décembre 2001 par

Teddy FAQUIER

Titre:

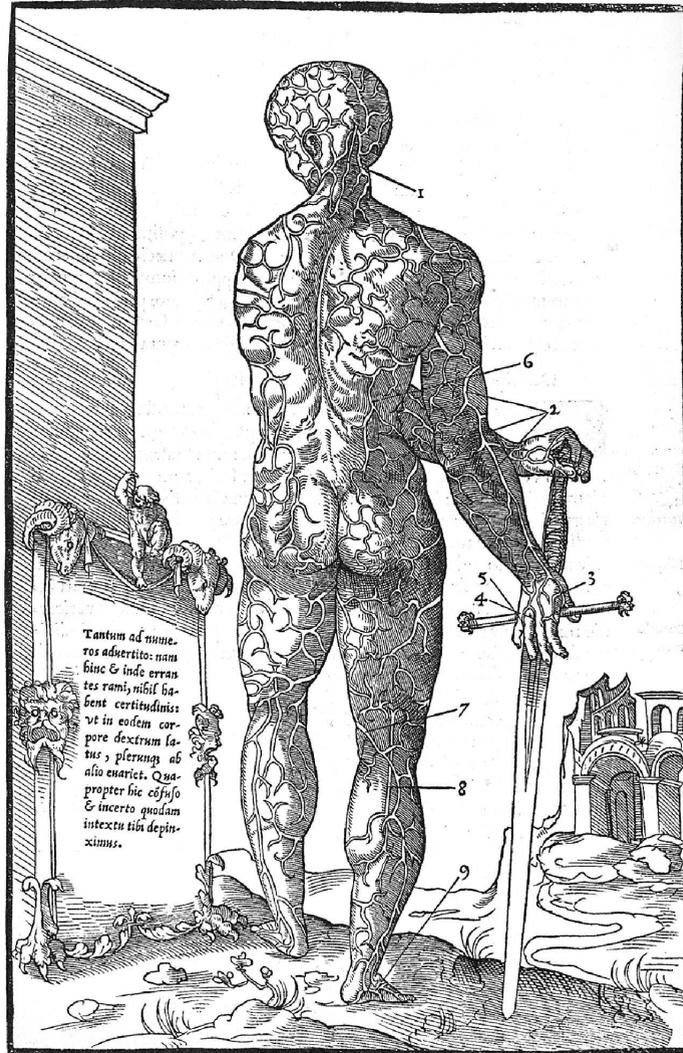
**LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES : UNITES
FONCTIONNELLES D'UNE VOIE DE COMMUNICATION A
LONGUE DISTANCE DANS L'HYPOPHYSE ANTERIEURE.**

Jury

M. Jean Valmier, Professeur (Montpellier II)	Président
M. Jean-Claude Beauvillain, Directeur de Recherches INSERM (Lille)	Rapporteur
M. Laurent Combettes, Directeur de Recherches INSERM (Orsay)	Rapporteur
Mme Yvonne Munari-Silem, Directrice de Recherches INSERM (Lyon)	Examinatrice
M. Hubert Vaudry, Directeur de Recherches INSERM (Rouen)	Examineur
M. Patrice Mollard, Directeur de Recherches CNRS (Montpellier)	Directeur de thèse

Sa tête, ses pieds, ses mains, tous ses membres, tous ses viscères, tous ses organes, son nez, ses yeux, ses oreilles, son cœur, ses poumons, ses intestins, ses muscles, ses os, ses nerfs, ses membranes, ne sont à proprement parler que les développements grossiers d'un réseau qui se forme, s'accroît, s'étend, jette une multitude de fils imperceptibles.

Diderot, *Le rêve de d'Alembert*



Charles Estienne

De dissectione partium corporis humani libri tres

Figure hypothétique des réseaux nerveux

Paris, Simon de Colines, 1545

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Claude Barberis pour m'avoir accueilli dans son unité, ainsi que pour sa disponibilité et sa constante préoccupation du bien-être de ses étudiants.

Je remercie MM. Jean-Claude Beauvillain et Laurent Combettes pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Merci également à Mme Yvonne Munari-Silem, et MM. Hubert Vaudry et Jean Valmier de participer à ce jury.

J'exprime une très grande reconnaissance à Patrice Mollard pour avoir su composer avec mon caractère et pour m'avoir accordé toute cette confiance et cette liberté dont j'ai pu bénéficier. Je me souviendrai longtemps de ses "idées du lundi matin" qui ont su m'éveiller l'esprit (dans tous les sens du terme). Il a surtout compris qu'il devait être un orienteur plutôt qu'un directeur de thèse. Enfin, il m'a fait comprendre la vraie signification des termes "sexy", "pêchu", "crispy" et "crunchy".

Je voudrais adresser un grand merci à toutes les personnes de l'équipe "communications intercellulaires dans les glandes endocrines. Merci à Nathalie pour la formation pratique qu'elle m'a donnée, ainsi que pour ses encouragements ; au "Gô" Xavier pour ces quatre années à manipuler côte à côte, à discuter de tout, de rien, à refaire le monde, pour son regard critique et juste, et surtout pour m'avoir expliqué pourquoi "L'hypophyse est le genou de la vie". Merci à Audrey pour sa bonne humeur, son amitié et la qualité de son travail ; à Laurent et Sébastien, nos "petits étudiants" pour les bons moments passés ensemble. Je tiens surtout à remercier Agnès pour tout ce qu'elle m'a apporté, aussi en tant que "collègue de travail".

J'adresse de profonds remerciements à Dom-Dom qui a toujours été capable de sortir un rat de sa manche en cas de pénurie, pour sa gestion efficace de la cafetière, et pour toutes les pauses sympathiques

que nous avons faites. Merci à Karl, sans lequel une grande partie de ce travail n'aurait pas été possible. Merci également à Mireille Passama pour son aide et ses gâteaux ; à Laurent Charvet pour sa gentillesse et sa disponibilité ; à Jean-Marie Michel et à Alain Carrette pour leur soutien technique.

J'exprime toute ma gratitude aux personnes de l'unité 469 et du CCIPE qui, de quelque manière que ce soit, m'ont aidé à avancer dans ce travail. Merci au paisible "El Ez", à Charlotte, Alice, Cyril (les Californiens), Sylvain, Myriam, Sébastien, Amandine, Vivien, Sabrina, Sonia, David et tous les autres. Un merci particulier à Pascale pour sa bonne humeur communicative lors des séances de confocal, et à Olivier pour ses conseils scientifiques et musicaux.

Je n'oublie pas mes amis "extérieurs" qui m'ont soutenu ; Franck, et toute sa famille, les deux Isa, Greg, la "Confrérie des Cénobites" et une mention affective toute particulière pour Fred.

Un petit mot de reconnaissance pour mes proches et amis dont certains ont dû se demander ce que je pouvais bien faire de mon temps, surtout le week-end. Le soutien et la confiance qu'ils m'ont accordés m'ont aidé à avancer.

A mes parents,

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>	7
I. GENERALITES SUR LA STRUCTURE ET LES FONCTIONS DE L'HYPOPHYSE.	8
II. HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES, 1^e PARTIE : 1953-1980.	11
III. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DU RESEAU DE CELLULES FS <i>IN SITU</i>.	14
1. Caractérisation morphologique des 3 éléments du réseau.	14
1.1. Les follicules	14
1.2. Les cellules folliculaires	17
<i>a. Le pôle folliculaire</i>	17
<i>b. Jonctions intercellulaires</i>	17
<i>c. Corps cellulaires</i>	17
<i>d. Les prolongements</i>	18
1.3. Les cellules stellaires	19
2. Rôles proposés des cellules FS à la suite des études morphologiques.	19
2.1. Cellules de soutien	19
2.2. Activités phagocytaire et endocytaire	20
<i>a. Phagocytose</i>	20
<i>b. Endocytose</i>	21
2.3. Eléments contractiles et mobiles	21
2.4. Echanges avec le milieu extérieur et transports de fluides dans le parenchyme.	22
2.5. Interaction avec les cellules endocrines	22
IV. HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES, 2^e PARTIE : 1981-21^e SIECLE.	23
V. IDENTIFICATION DE MARQUEURS ET ORIGINE EMBRYOLOGIQUE DES CELLULES FS.	25

1. Protéine S-100, GFAP, vimentine : les cellules FS sont-elles les cellules gliales de l'hypophyse?	25
2. Cellules FS et cellules dendritiques : vers une origine hématopoïétique des cellules FS	27
3. Origine hypophysaire : cellule souche, cellule épithéliale de la poche de Rathke ou cellules granulaires dédifférenciées ?	29
VI. ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES FS :	31
DES APPROCHES <i>IN VITRO</i>.	
1. Effet modulateur des cellules FS sur les sécrétions endocrines.	32
2. Les différents agents libérés par les cellules FS et leur rôle dans la physiologie hypophysaire	34
2.1. Interleukine-6	34
2.2. Leukemia Inhibitory Factor (LIF)	38
2.3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	39
2.4. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	40
2.5. Transforming Growth Factor-1 (TGF- β 1)	41
2.6. Activines et follistatine	41
2.7. Insulin-like growth factor (IGF-1)	43
2.8. Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant (CINC)	43
2.9. Monoxyde d'azote (NO)	44
2.10. Lipocortine-1 (LC1)	45
2.11. Autres facteurs : Leptine, PACAP, SRIF, TIMP	45
2.12. Transport actif : échange d'ions et d'acides aminés	46
3. Modulation de l'activité des cellules FS	48
3.1. Cytokines et facteurs de croissance	48
3.2. Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	49
<i>a. Récepteurs β-adrénergiques</i>	49
<i>b. Récepteurs du PACAP et du VIP</i>	49
<i>c. Effet des peptides de la famille de la calcitonine</i>	51
<i>d. Récepteurs purinergiques</i>	52
<i>e. Autres stimuli: Angiotensine II, ACh, TSH, Ps4, Cannabinoïdes.</i>	53
3.3. Effet du lipopolysaccharide bactérien (LPS)	54

3.4. Récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes	55
4. Propriétés membranaires des cellules FS : canaux ioniques et jonctions gap	56
4.1. Expression de canaux ioniques membranaires	56
4.2. Communications intercellulaires <i>via</i> des jonctions gap.	57
5. Cellules FS et pathologies hypophysaires	60
 VI. PROBLEMATIQUE	 62
 <u>MATERIEL ET METHODES</u>	 64
1. Préparation de tranches aiguës d'hypophyse antérieure	65
2. Protocoles d'utilisation des sondes calciques fluorescentes	66
3. Stimulations électriques	66
4. Enregistrements électrophysiologiques	67
5. La technique du "Vaseline-gap"	67
6. Dosages d'interleukine-6	68
 <u>RESULTATS</u>	 69
1. Le réseau de cellules FS forme une route de communication à longue distance dans l'hypophyse antérieure	70
Publication :	
Folliculostellate cell network: A route for long-distance communication in the anterior pituitary. <i>Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</i> . 2001 Jul 17 ; 98 (15) : 8891-6.	
2. Activité spontanée au sein du réseau de cellules FS.	73
3. Libération d'interleukine-6 dans des tranches d'hypophyse : effets du PACAP et rôle des jonctions gap.	79
 <u>DISCUSSION GENERALE</u>	 86
 <u>PERSPECTIVES</u>	 92
 <u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	 95
 <u>LISTE DE PUBLICATIONS</u>	 122

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

[Ca ²⁺] _i	Concentration en calcium cytosolique
AM	Acetoxymethyl ester
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
CINC	Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant
CRF	Corticotropin releasing factor ; corticolibérine
EGTA	Ethylene glycol-bis [β -aminoethylether]N, N, N', N'-tetraacetic acid
FS	Folliculostellaire
GFP	Green fluorescent protein ; protéine fluorescente verte
GH	Growth hormone ; hormone de croissance
GRF	Growth-hormone releasing factor ; somatolibérine
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL-6	Interleukine-6
LY	Lucifer yellow ; jaune de Lucifer
NO	Nitric Oxide ; monoxyde d'azote
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
SRIF	Somatotropin release inhibiting factor ; somatostatine
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRH	Thyrotropin releasing hormone ; thyrolibérine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	Vaso-intestinal peptide

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Les figures n'étant pas prises en compte dans la numérotation des pages, elles sont indexées ici par le numéro de la page de texte qui les précède.

Figure 1	Vue d'ensemble du système hypothalamo-hypophysaire	8'
Figure 2	Architecture d'un cordon hypophysaire chez le rat adulte	9'
Figure 3	Les trois niveaux de contrôle de la fonction hypophysaire	10'
Figure 4	Coloration d'une coupe histologique d'hypophyse humaine	10'
Figure 5	Des cellules chromophobes vues par microscopie électronique	12'
Figure 6	Les follicules submicroscopiques	14'
Figure 7	Coloration des "cysts" grâce à la réaction du PAS et immunomarquage de la protéine S-100 dans une hypophyse de porc	16'
Figure 8	Les cellules marginales bordant la fente hypophysaire	16'
Figure 9	Morphologie des cellules FS en microscopie électronique chez la grenouille	18'
Figure 10	Activité phagocytaire des cellules FS	20'
Figure 11	Changements morphologiques du réseau de cellules FS après castration chez le mâle	22'
Figure 12	Les différents facteurs modulant la production d'IL-6 par les cellules FS	35'
Figure 13	Activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en réponse à une endotoxémie	35'
Figure 14	Réponses calciques biphasiques à une stimulation purinergique dans une cellules Tpit/F1	52'
Figure 15	Jonctions gap entre cellules FS	59'
Figure 16	Fonctionnalité du couplage intercellulaire dans des héli-hypophyses de rat	59'
Figure 17	Schéma hypothétique du rôle des cellules FS dans la formation des adénomes	61'
Figure 18	La technique du « vaseline-gap »	67'

Figure 19	Activité calcique spontanée dans des cellules FS	73'
Figure 20	Transitoires calciques dûs à l'activité spontanée dans une cellule FS	73''
Figure 21	Vague calcique spontanée au sein du réseau de cellules FS	74'
Figure 22	Stabilisation de la libération d'IL-6	80'
Figure 23	Effet du PACAP sur la libération d'IL-6 par des tranches d'hypophyse	80''
Figure 24	Effet du blocage des jonctions gap sur la libération d'IL-6	81'
Figure 25	Dosage d'IL-6 sur des tranches d'hypophyse en "Vaseline-gap"	81''

INTRODUCTION

I. GENERALITES SUR LA STRUCTURE ET LES FONCTIONS DE L'HYPOPHYSE.

L'hypophyse forme avec l'hypothalamus un couple anatomique et fonctionnel. Cet organe est subdivisé en deux parties, l'adénohypophyse (ou hypophyse glandulaire) et la neurohypophyse. Cette dernière est une annexe topographique et physiologique de l'hypothalamus. La frontière entre les deux éléments est quelque peu arbitraire. La neurohypophyse contient les axones et les terminaisons nerveuses des neurones des noyaux supra-optiques et paraventriculaires, qui traversent successivement l'éminence médiane, la tige hypophysaire et le lobe nerveux. À cet endroit, les neurones libèrent la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT) dans les artères hypophysaires inférieures.

L'hypophyse antérieure quant à elle assure une interface endocrine entre le cerveau et les tissus périphériques (figure 1). La connexion hypothalamo-antéhypophysaire se fait grâce à la libération de facteurs hypophysiotropes par des neurones hypothalamiques au niveau de l'éminence médiane. Déversés dans les vaisseaux du plexus primaire du système porte, ces facteurs vont parvenir par cette voie vasculaire aux cellules endocrines de l'adénohypophyse, dont ils vont contrôler, entre autres, les sécrétions hormonales. Les cellules sont regroupées en colonnes plus ou moins anastomosées, les cordons, délimitées par une lame basale (lame basale péri-cordonale) (figure 2). Des segments de cette lame basale sont également présents au sein des cordons (lame basale intra-épithéliale). Ces cordons sont séparés des capillaires environnants par un tissu conjonctif assez réduit (espace péricapillaire). L'adénohypophyse libère dans la circulation générale plusieurs hormones qui interviennent dans des fonctions physiologiques aussi diverses que la croissance ou la reproduction. L'adénohypophyse est constituée de trois lobes, ayant des rôles distincts.

Le lobe intermédiaire (ou *Pars Intermedia*) est situé entre la neurohypophyse et le lobe antérieur, séparé de ce dernier par la fente hypophysaire. Il est le siège de la production d'hormone mélanotrope (α -MSH), hormone agissant chez de nombreux animaux sur la

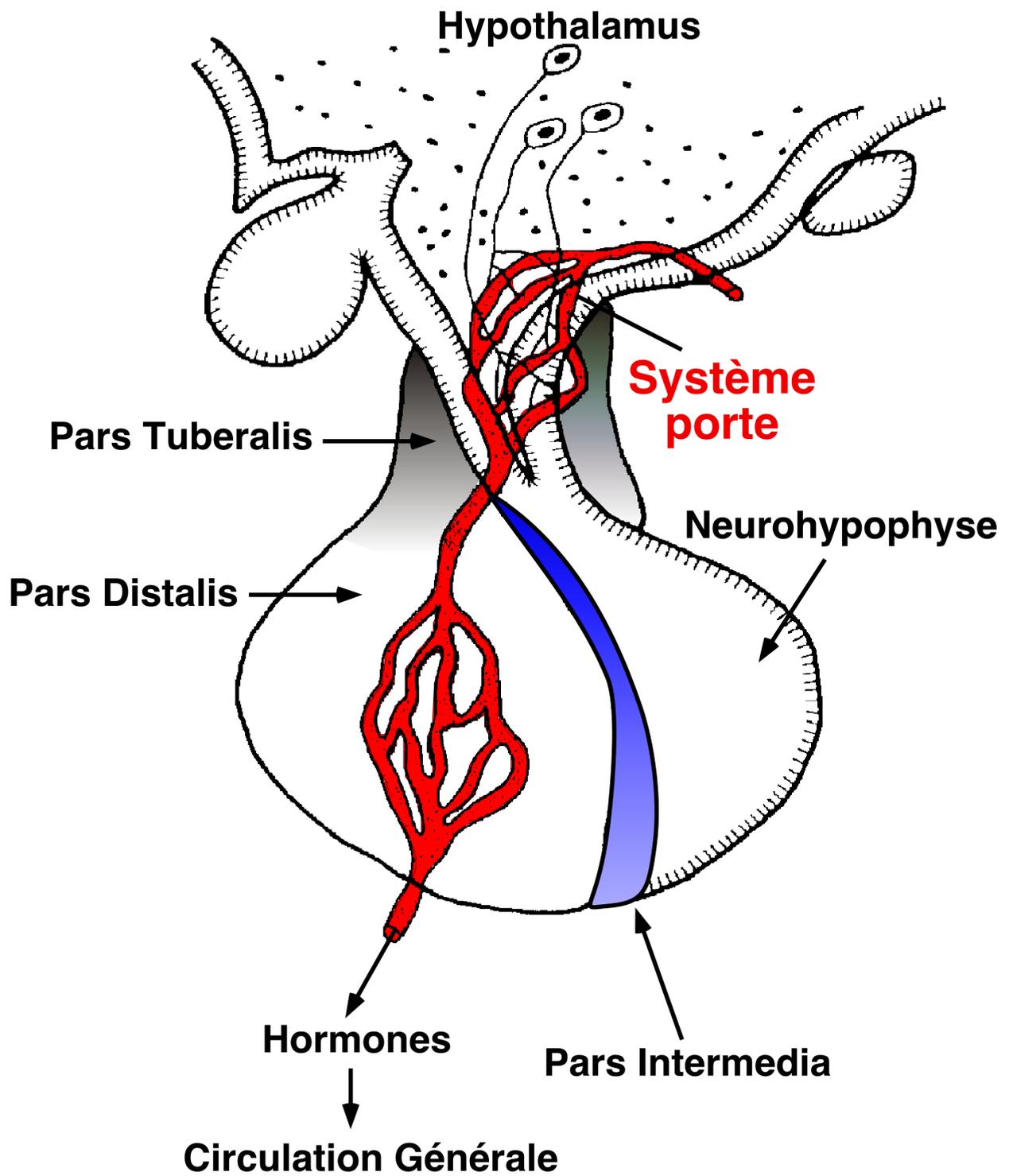


Figure 1: Vue d'ensemble du système hypothalamo-hypophysaire (modifié d'après Dufy-Barbe, 1984).

coloration de la peau. Le lobe intermédiaire est peu vascularisé, et il reçoit une innervation diffuse (Stoeckel *et al.*, 1981). Cette structure disparaît chez l'Homme entre 10 et 20 ans, alors qu'elle est présente tout au long de la vie chez les autres espèces.

Le lobe tubéral, ou Pars Tuberalis est présent chez les Vertébrés à l'exclusion des poissons, mais sa structure diffère selon les espèces (Wittkowski *et al.*, 1999). Il comporte deux couches de cellules ou plus, qui s'étendent sur la face ventrale de l'éminence médiane, et qui entourent la tige pituitaire. Dans sa partie distale, la Pars Tuberalis des Mammifères fusionne avec les lobes antérieur et intermédiaire, sans démarquage bien précis. Chez les autres vertébrés, la Pars Tuberalis constitue une entité bien définie, complètement séparée de la Pars Distalis. Les cellules de la Pars Tuberalis sont proches des capillaires du plexus primaire et des terminaisons des neurones qui s'y projettent. En plus des types cellulaires présents dans la Pars Distalis, des cellules sécrétrices spécifiques à ce lobe sont présentes, mais le rôle des produits qu'elles libèrent est inconnu. Néanmoins, la Pars Tuberalis semble synthétiser un facteur qui stimule la libération de PRL, et sa forte concentration en récepteurs de la mélatonine laisse penser qu'elle joue un rôle dans la transmission du message photopériodique au système endocrine.

Les cellules de la Pars Distalis (lobe antérieur ou antéhypophyse) produisent l'hormone de croissance (GH), la prolactine (PRL), l'hormone corticotrope (ACTH), l'hormone thyroïdienne (TSH), l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH). On distingue cinq types de cellules endocrines (somatotrope, lactotrope, corticotrope, thyroïdienne et gonadotrope), cellules hautement différenciées. Elles ont pour origine une même cellule souche, dont le développement phénotypique ultérieur met en jeu l'intervention de facteurs spécifiques à l'hypophyse comme des facteurs de transcription, des récepteurs de surface, et des signaux hypothalamiques ou périphériques (Dasen and Rosenfeld, 2000). Le contrôle de la prolifération cellulaire et de l'expression de gènes spécifiques d'un lignage se fait grâce aux facteurs hypothalamiques et à l'activation de leurs récepteurs.

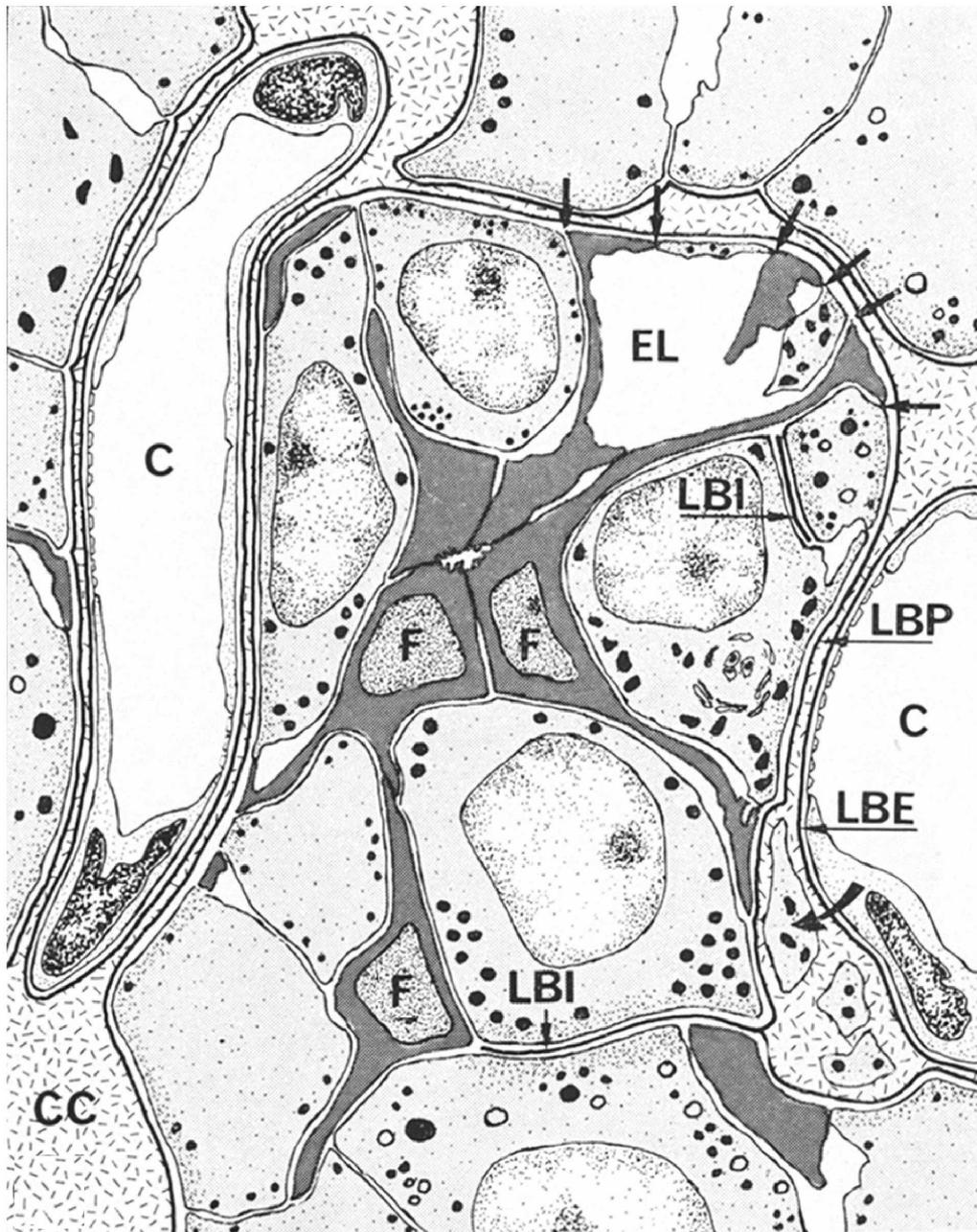


Figure 2: Architecture d'un cordon hypophysaire chez le rat adulte (modifié d'après Vila-Porcile, 1973)

Compartiment vasculaire (C) : capillaires fenestrés entourés d'une lame basale endothéliale (LBE)

Compartiment conjonctif (CC) : un espace conjonctif réunit deux espaces péri-capillaires. Des morceaux de cellules granulaires sont présents dans les espaces conjonctifs (flèche courbe).

Cordon hypophysaire : délimité par une lame basale parenchymateuse (LBP), il contient des cellules granulaires et des cellules folliculostellaires (F, colorées en gris). Ces cellules forment des espaces lacunaires (EL) séparés de la lame basale parenchymateuse par des languettes cytoplasmiques juxtaposées (flèches). Noter également la présence de lames basales intra-épithéliales (LBI) entre des cellules granulaires.

L'activité des cellules antéhypophysaires présente trois niveaux de contrôle (figure 3). Le premier, déjà évoqué précédemment, est l'étage central. Il met en jeu les facteurs libérés par le cerveau, en particulier l'hypothalamus. Le deuxième niveau de régulation est intra-hypophysaire. Cette régulation s'effectue grâce à la libération de molécules (peptides, cytokines, nucléotides...) qui vont agir par autocrinie et/ou paracrinie d'une manière propre ou synergique avec d'autres signaux (pour revue, Ray and Melmed, 1997 ; Schwartz, 2000). Enfin, les cellules hypophysaires sont sensibles aux agents libérés par les organes périphériques, qui constituent le troisième niveau de régulation. L'exemple le plus évident est celui du rétrocontrôle négatif qui a été révélé depuis longtemps en montrant que l'ablation des organes cibles induisait une hypersécrétion et une hyperplasie des cellules hypophysaires. Ce rétrocontrôle peut se faire soit par modulation des libérations hypothalamiques, soit par action directe au niveau hypophysaire. Mais les organes cibles des hormones hypophysaires ne sont pas les seuls à rétro-agir sur ce système endocrine, puisque les facteurs libérés par le système immunitaire ont également une action directe sur l'hypophyse (Ray and Melmed, 1997). C'est l'ensemble de ces facteurs qui va permettre un contrôle précis de l'activité des cellules endocrines hypophysaires.

Ces trois niveaux de régulation ne semblent pas agir uniquement de manière directe sur les cellules endocrines hypophysaires. De nombreuses publications suggèrent que les cellules folliculostellaires, une population cellulaire non-endocrine de l'hypophyse, sont les médiatrices potentielles de certains de ces mécanismes de contrôle de la fonction hypophysaire. Décrites depuis près d'un demi-siècle, elles forment un vaste réseau anatomique au sein du parenchyme. Les facteurs qu'elles libèrent sont susceptibles d'influencer l'activité des différents types endocrines, et elles semblent être la cible de messagers d'origine centrale, intra-hypophysaire et périphérique. Cependant, leur rôle au sein du tissu n'est pas connu.

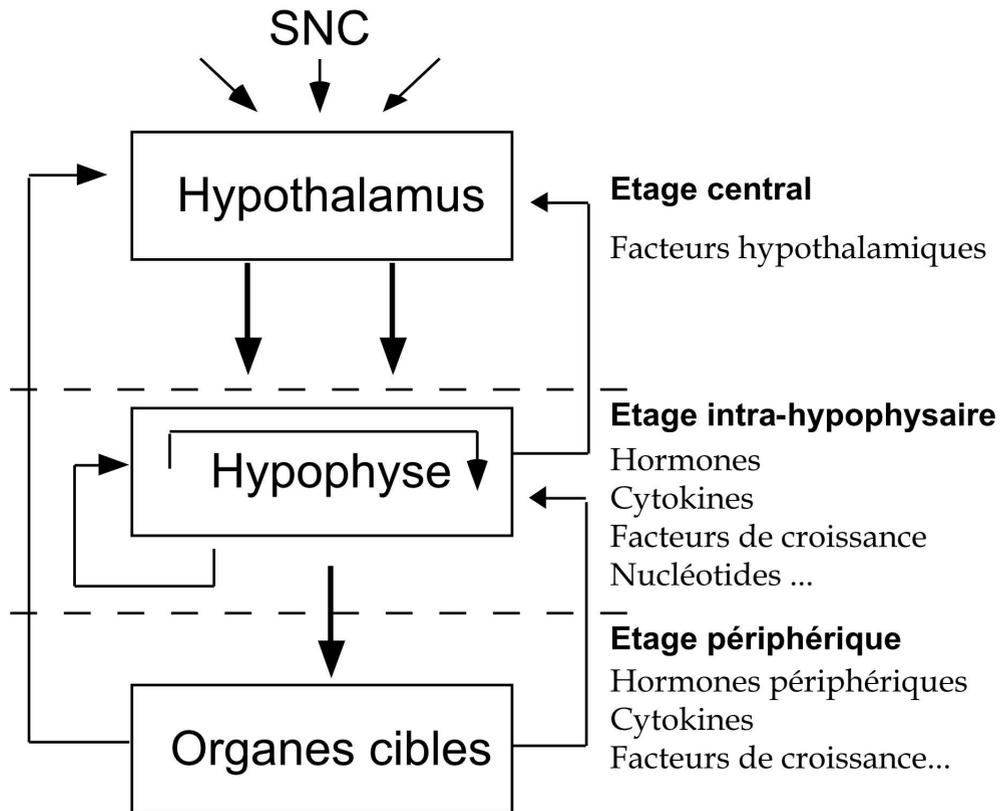


Figure 3 : Les trois niveaux de contrôle de la fonction hypophysaire (d'après Ray et Melmed, 1997).

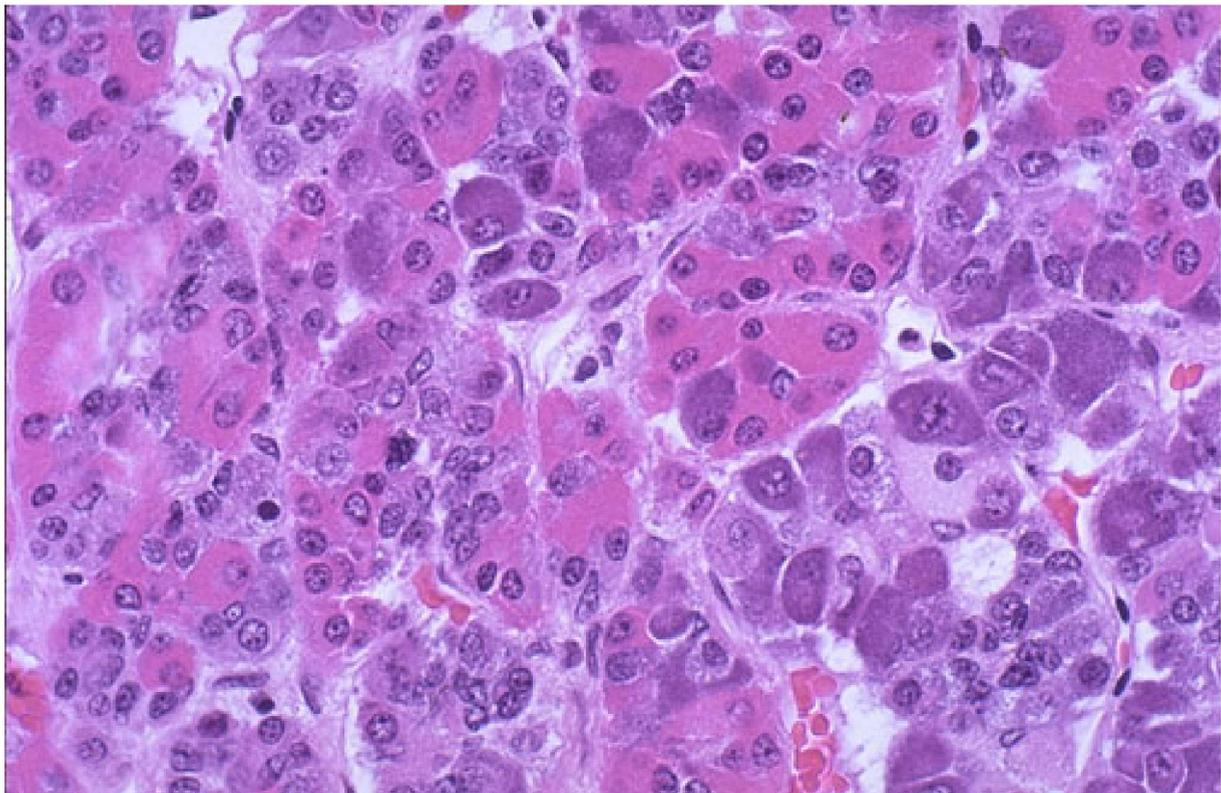


Figure 4: Coloration d'une coupe histologique d'hypophyse humaine
 Les cellules acidophiles apparaissent en rose, les cellules basophiles en violet foncé, les chromophobes en violet très pâle.

La suite de cette introduction est un résumé non exhaustif des données concernant les cellules folliculostellaires. J'ai choisi de suivre en partie la chronologie des recherches concernant ce type cellulaire. En effet, l'ensemble des travaux effectués de leur première description en 1953, jusqu'à l'identification d'un marqueur immunocytochimique en 1980, porte sur l'étude en microscopie électronique de leurs caractéristiques morphologiques *in situ*. Ces données ainsi que les fonctions putatives attribuées à ces cellules au cours de cette période, constituent un premier volet. Le deuxième volet est consacré à des études plus fonctionnelles concernant leurs marqueurs potentiels, leur origine embryologique, et leurs rôles fonctionnels au sein de l'hypophyse, rôles essentiellement étudiés *in vitro*.

II. HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES, 1^e PARTIE : 1953-1980.

Jusqu'en 1940, les connaissances sur l'hypophyse étaient limitées par le manque de techniques appropriées pour en aborder la physiologie. L'architecture de la glande avait été décrite, de même que sa vascularisation par le système porte hypothalamo-hypophysaire. L'existence de plusieurs classes de cellules était connue, ainsi que leurs modifications au cours de circonstances qui « bouleversent » la sécrétion (cellules de « grossesse » pendant la gestation et l'allaitement, cellules de castration après ablation des gonades...). Mais les techniques de coloration générale des grains de sécrétion ne permettaient que l'observation de cellules à grains « éosinophiles », de cellules à grains « basophiles », ou de cellules « chromophobes » dépourvues de granulation décelable (figure 4). En améliorant les techniques de coloration, Romeis (Romeis, 1940) montre que les termes « éosinophiles » et « basophiles » regroupent en fait plusieurs types cellulaires morphologiquement distincts, qui sont au nombre de cinq. L'établissement d'une corrélation entre les hormones connues et un type cellulaire précis reste difficile car aucune méthode ne permet à l'époque d'identifier les

hormones présentes dans les cellules. L'introduction de l'immunocytochimie (Marshall, 1951) permettra de caractériser le contenu hormonal du grain de sécrétion (Nakane, 1970 ; Baker *et al.*, 1970, 1971 ; Baker and Yu, 1971). L'avènement de la microscopie électronique (Fernandez-Moran and Luft, 1949) ouvrira de nombreuses perspectives dans le domaine de l'identification des grains et des caractéristiques cytologiques des cellules (appareil de synthèse protéique, lysosomes...). Marylin G. Farquhar sera alors à l'origine de travaux princeps d'étude du tissu hypophysaire en microscopie électronique.

En 1953, lors d'une des premières études de l'ultrastructure de l'adénohypophyse en microscopie électronique, Rinehart et Farquhar (Rinehart and Farquhar, 1953) observent la présence de cellules de petite taille et dépourvues de grains. Ces cellules font partie de la catégorie des cellules « chromophobes » (figure 5a). Dans un second article, les mêmes auteurs (Rinehart and Farquhar, 1955) décrivent « des cellules agranulaires étoilées avec des prolongements qui s'étendent entre les cellules parenchymateuses » et concluent « qu'elles peuvent représenter une unité structurale et fonctionnelle supplémentaire » (figure 5b). Deux ans plus tard, Farquhar introduit la notion de « cellules folliculaires » comme « cellules du sixième type » qui se situent « au sein du lobe antérieur et sont regroupées autour de cavités (follicules ou ductules) contenant un colloïde de faible densité » (Farquhar, 1957). Elle les considère comme étant vraisemblablement des cellules corticotropes, car les follicules changent de morphologie après injection de cortisol ou après surrénalectomie. Cette idée, sera également supportée par Rennels (Rennels, 1964). Cette hypothèse sera infirmée par un faisceau de preuves convergentes attribuant la fonction corticotrope à des cellules granuleuses bien définies (Siperstein, 1963 ; Baker *et al.*, 1970). La forme étoilée de certaines cellules corticotropes, ainsi que leur dégranulation après surrénalectomie semblent être à l'origine de cette confusion (Childs, 1992).

Les travaux sur ces cellules agranulaires vont être le point de départ de nombreuses études qui, durant les années soixante, vont permettre de déterminer leur présence chez de

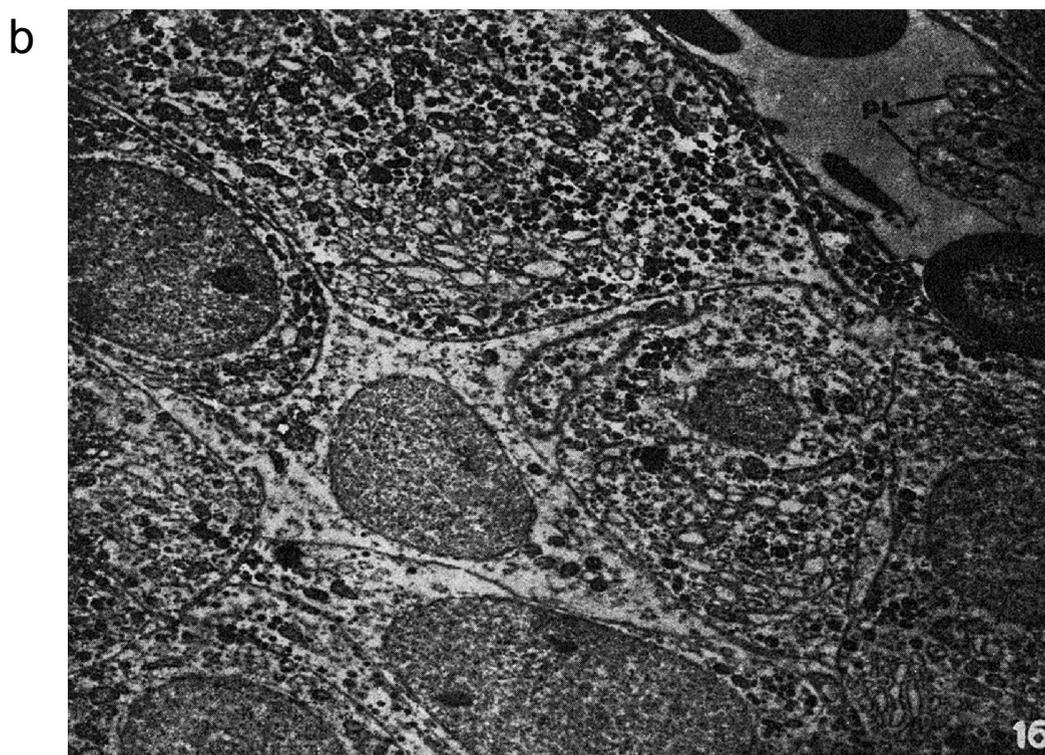
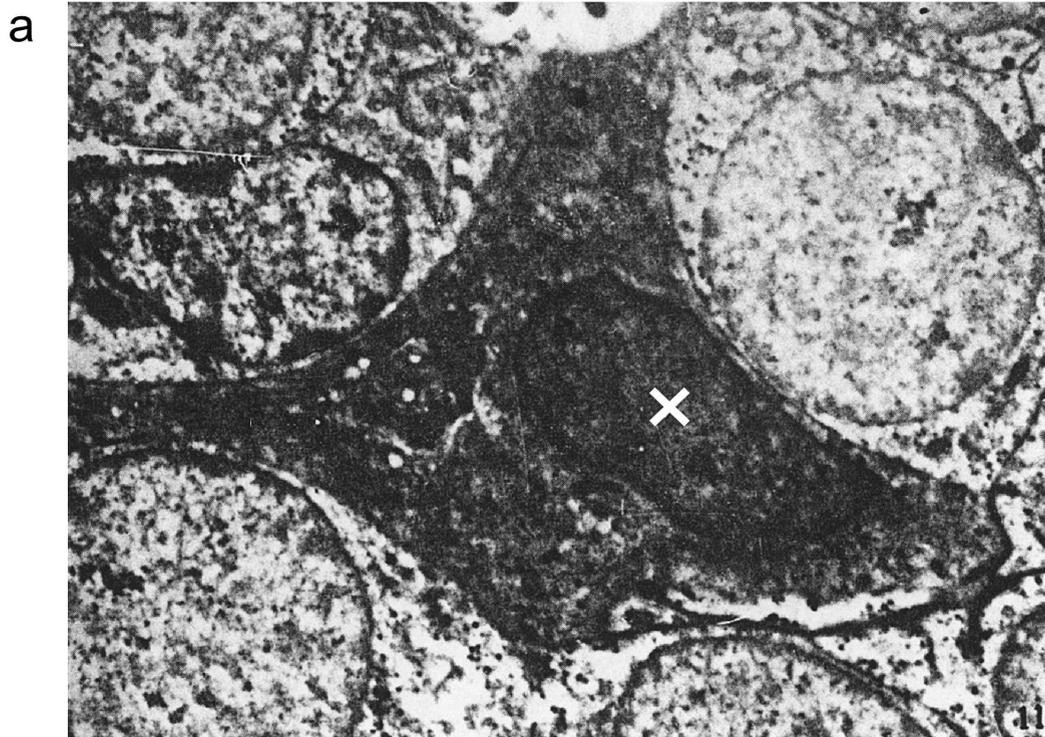


Figure 5 : Des cellules chromophobes vues par microscopie électronique.

a) première observation en microscopie électronique d'une cellule folliculostellaire indiquée par une croix blanche (x 8000) (d'après Rinehart and Farquhar, 1953).

b) cellule stellaire "chromophobe" émettant plusieurs prolongements entre des cellules granulaires (x 5900). Cette cellule au cytoplasme clair contient quelques inclusions cytoplasmiques (d'après Rinehart and Farquhar, 1955).

nombreuses espèces : différents poissons (téléostéens, cyclostomes...), grenouille, xénope, salamandre, lézard, tortue, poulet, canard, rat, souris, cobaye, hamster, vison, hérisson, opossum, chauve-souris, lapin, chien, chat, dauphin, chèvre, wallaby, porc, bœuf, singe et homme. Elles vont être identifiées au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse, mais aussi au niveau du lobe intermédiaire. Deux types de cellules vont être décrits de manière indépendante : i) les cellules « folliculaires » (Rinehart and Farquhar, 1955) qui en se regroupant forment des cavités submicroscopiques (follicules) et peuvent émettre des prolongements, et ii) des cellules « stellaires » (Smith, 1963 ; Salazar, 1963) qui émettent de longs prolongements mais ne semblent pas border de follicules. Kagayama sera le premier à proposer les cellules folliculaires et stellaires comme faisant partie d'un même type cellulaire, formant un réseau de groupes de cellules délimitant un follicule et connectés par des cellules stellaires (Kagayama, 1965). L'idée d'appartenance de ces cellules à une même famille fut relayée et argumentée quelques années plus tard par Vila-Porcile, qui proposera de les regrouper sous le nom de « cellules folliculostellaires » (cellules FS) (Vila-Porcile, 1972). Ce concept est depuis communément admis, bien que discuté par certains auteurs ces dernières années (voir III, 1.1). Pour Evelyne Vila-Porcile, les cellules FS sont organisées en un véritable système et possèdent quatre caractéristiques essentielles :

- elles sont dépourvues de grains de sécrétion.
- les cellules folliculaires seules bordent des cavités submicroscopiques, les follicules.
- les cellules folliculaires et stellaires émettent des prolongements cytoplasmiques qui sont en relation avec les autres cellules du parenchyme.
- les cellules folliculaires et stellaires, articulées les unes avec les autres, forment un réseau tri-dimensionnel étendu à tous les cordons de l'adénohypophyse.

Leur nombre varie selon l'animal considéré, son âge, et la région observée. Chez la souris, elles représentent 5 % des cellules de la *Pars Distalis*, et 50 % de la *Pars Tuberalis* (Wittkowski *et al.*, 1999).

Au cours des prochains paragraphes, je vais résumer les données bibliographiques issues des études morphologiques du réseau de cellules FS, ainsi que les différentes hypothèses émises quant à leurs rôles potentiels dans le fonctionnement de la glande.

III. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DU RESEAU DE CELLULES FS *IN SITU*.

1. Caractérisation morphologique des 3 éléments du réseau.

Ces trois éléments sont les cellules folliculaires, les cellules stellaires et les follicules. La distinction principale entre les deux types de cellules reposant sur le fait qu'elles bordent ou non un follicule, il semble adéquat de définir celui-ci en premier.

1.1. Les follicules

Il s'agit de cavités étroites, tubulaires et très ramifiées uniquement observables en microscopie électronique. Leur lumière est souvent remplie de microvillosités ou de cils émis par les cellules folliculaires (Vila-Porcile, 1972) (figure 6a et 6b). Elles contiennent un matériel de faible densité (qualifié de « floconneux »), invisible en microscopie photonique. Chez de nombreuses espèces, ces cavités sont issues d'un regroupement de cellules folliculaires. Pourtant, il a été décrit chez l'homme des follicules qui ne sont pas uniquement bordés de cellules FS (Horvath *et al.*, 1974 ; Ciocca *et al.* 1984 ; Girod *et al.*, 1985), ce qui signifie dans ce cas que toutes les cellules folliculaires (au sens propre du terme) ne sont pas forcément des cellules FS. De plus, dans la conclusion d'une étude en microscopie électronique de l'hypophyse de lapin, Shiotani décrit des cellules stellaires ayant des « microvillosités saillantes dans des canaux intercellulaires » mais que « contrairement au rat, au bœuf et à l'Homme, de prétendus follicules... ne sont jamais observés chez le lapin » (Shiotani, 1980). Certains auteurs vont donc préconiser l'emploi unique des termes « cellule

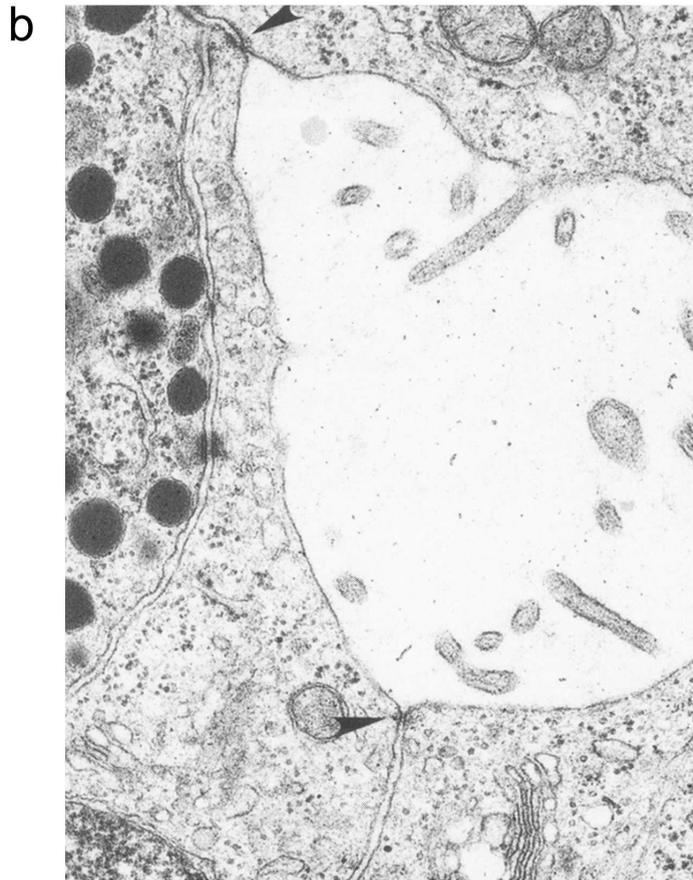
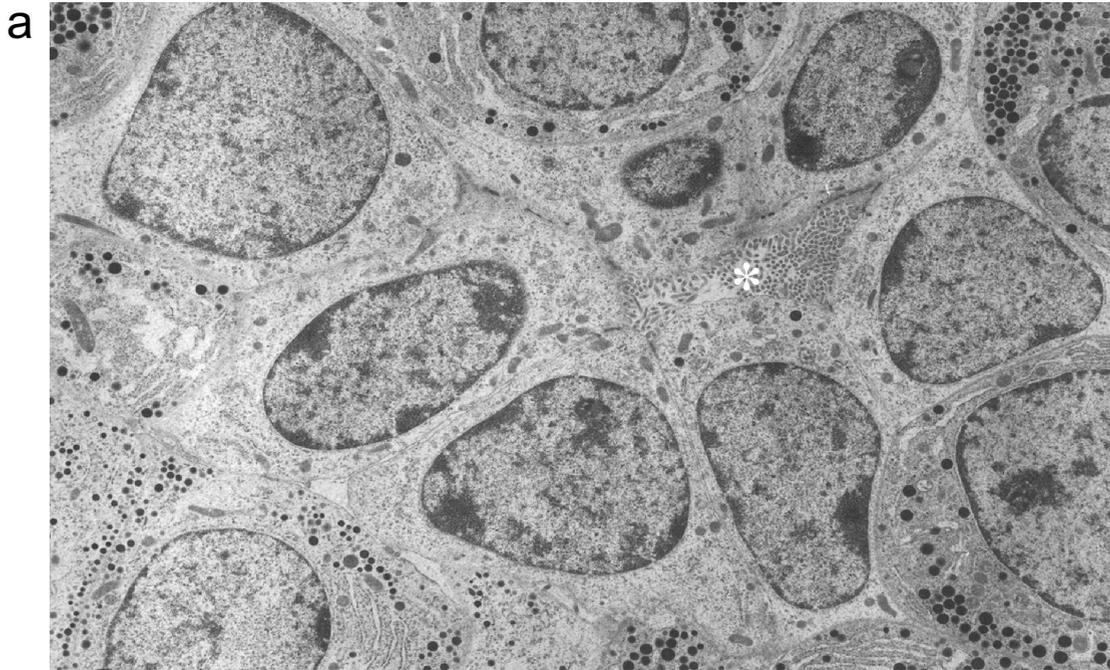


Figure 6 : Les follicules submicroscopiques.

a) plusieurs cellules FS formant un follicule (astérisque). On distingue de nombreuses microvillosités au sein de la cavité (x 10000) (d'après Soji and Herbert, 1990).

b) jonctions intercellulaires (pointes de flèches) de type "jonction intermédiaire" à proximité d'un follicule. Là aussi, des microvillosités sont présentes (d'après Soji *et al.*, 1997).

stellaire » (Girod *et al.*, 1985) ou « cellule stellaire agranulaire » (Marin *et al.*, 1991) à la place des « cellules folliculostellaires », arguant du fait que ces termes ne sous-entendaient aucune signification fonctionnelle particulière liée au fait que ces cellules bordent des follicules, bien que le rôle des follicules était alors, et reste toujours, inconnu.

Il semble qu'un problème de terminologie ait été à l'origine de ce débat et qu'une confusion ait été établie entre les follicules décrits par Farquhar ou Vila-Porcile et les pseudo-follicules des travaux de l'histologie antérieure (Romeis, 1940). En effet, les travaux concernant l'hypophyse humaine portaient sur un autre type de cavités, observées chez de nombreuses espèces (Benjamin, 1981), mais rarement chez le rat (Opper, 1940 ; Vila-Porcile, 1972), modèle le plus fréquent lors des études pionnières sur les cellules FS. Ces cavités, qui sont également appelées follicules ou « cysts » (sacs), sont présentes au sein du tissu antéhypophysaire, et au sein du lobe intermédiaire (Ogawa *et al.*, 1996), auquel on donne parfois le nom de zone cystiforme (figure 7). Elles sont sphériques ou ovoïdes et leur taille allant de la dizaine à quelques centaines de microns permet leur observation en microscopie photonique, parfois même à l'œil nu. La paroi de ces follicules peut contenir plusieurs types endocrines et des cellules FS dans des proportions qui varient d'une espèce à l'autre (Horvath *et al.*, 1974 ; Horvath and Kovacs, 1988 ; Ciocca *et al.*, 1984 ; Girod *et al.*, 1985). Ces follicules sont parfois appelés « follicules mixtes ». Ils contiennent un colloïde translucide qui peut se changer en matériel dense aux électrons après un choc osmotique (Selye, 1943a, 1943b), une surrénalectomie (Rinehart and Farquhar, 1955), une gonadectomie (Ferrer, 1956 ; Dingemans and Feltkamp, 1972), un traitement par la TRH ou la L-Dopa (Harrison *et al.*, 1982). On observe également une augmentation du nombre de ces follicules macroscopiques avec l'âge (Ciocca *et al.*, 1984 ; Kameda, 1990 ; Ogawa, 1996, 1997).

Leur contenu diffère selon le type de follicule considéré. Les follicules submicroscopiques sont remplis de matière granulaire ou fibrillaire, avec de nombreux débris cellulaires. Le matériel dense des « cysts » peut être coloré par la réaction de Periodic Acid-

Schiff (microscopie photonique) ou par la méthode de Rambourg (microscopie électronique), ce qui permet de déterminer la présence de composés glycoprotéiques.

Les follicules ne sont pas des structures isolées. Des travaux en microscopie électronique à balayage ont montré la présence de petits canaux débouchant sur des follicules macroscopiques (Betchaku and Douglas, 1981). Il s'agit donc d'un vaste système lacunaire intra-épithélial composé de plusieurs types de cavités. Ce réseau tri-dimensionnel permet une circulation liquidienne au sein du parenchyme.

Chez certains vertébrés, la fente hypophysaire, vestige de la poche de Rathke, sépare la *Pars Distalis* (PD) de la *Pars Intermedia* (PI) (figure 7). Cette fente est bordée du côté antéhypophysaire d'une couche unique de cellules agranulaires, dénommées « cellules marginales » (figure 8). Les cellules situées du côté antérieur présentent les mêmes caractéristiques que celles des cellules FS (voir chapitre suivant) et font partie intégrante des cordons hypophysaires puisque l'épithélium antérieur de la fente ne possède pas de lame basale (Vila-Porcile, 1972). Le côté postérieur possède une lame basale qui sépare les cellules marginales des cellules endocrines du lobe intermédiaire. Les cellules marginales ont été très vite considérées comme étant des cellules folliculaires (Yoshida, 1966). En 1978, Ciocca et Gonzales observent chez le rat la présence de cavités remplies de matériel dense au sein de la couche de cellules marginales. Ces résultats supportent l'idée d'une connexion du réseau des cavités folliculaires à la fente hypophysaire émise par Vila-Porcile (Vila-Porcile, 1973), qui considère la fente hypophysaire non pas comme un vestige embryonnaire, mais comme « un vaste follicule constituant, par ses dimensions et sa localisation, une région privilégiée du réseau folliculostellaire ». La présence de canalicules bordés de cellules folliculaires débouchant sur la fente hypophysaire sera confirmée un an plus tard par microscopie électronique à balayage (Correr and Motta, 1979).

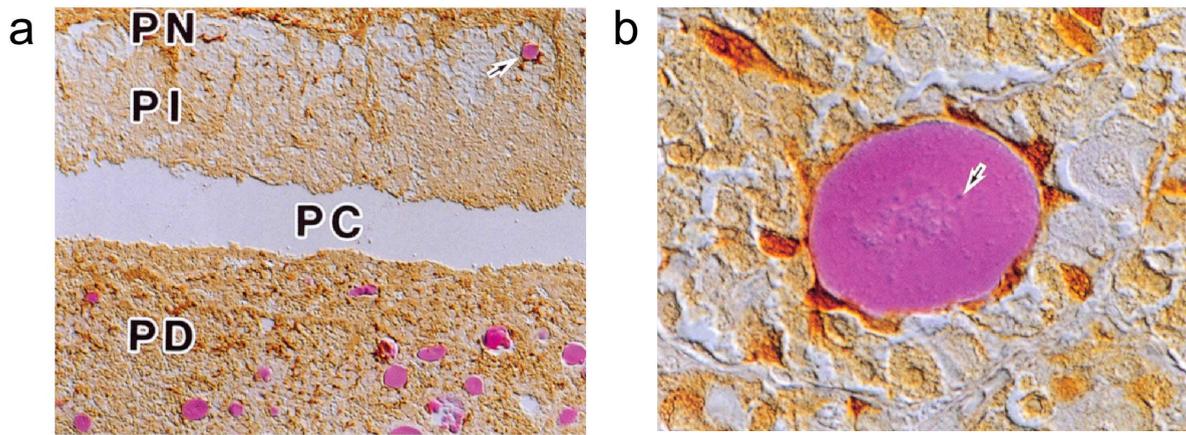


Figure 7 : Coloration des "cysts" grâce à la réaction du PAS et immunomarquage de la protéine S-100 dans une hypophyse de porc.

a) vue à faible grossissement (x 36). Les cysts (en rose) sont situés dans la Pars Intermedia (PI) et dans la Pars Distalis (PD). La fente hypophysaire (PC ou pituitary cleft) sépare les deux structures.

b) vue agrandie (x 320) d'un cyst. Le cyst est rempli d'un colloïde hétérogène (flèche). Des cellules exprimant la protéine S-100 (marron) entourent la cavité (d'après Ogawa *et al.*, 1996).

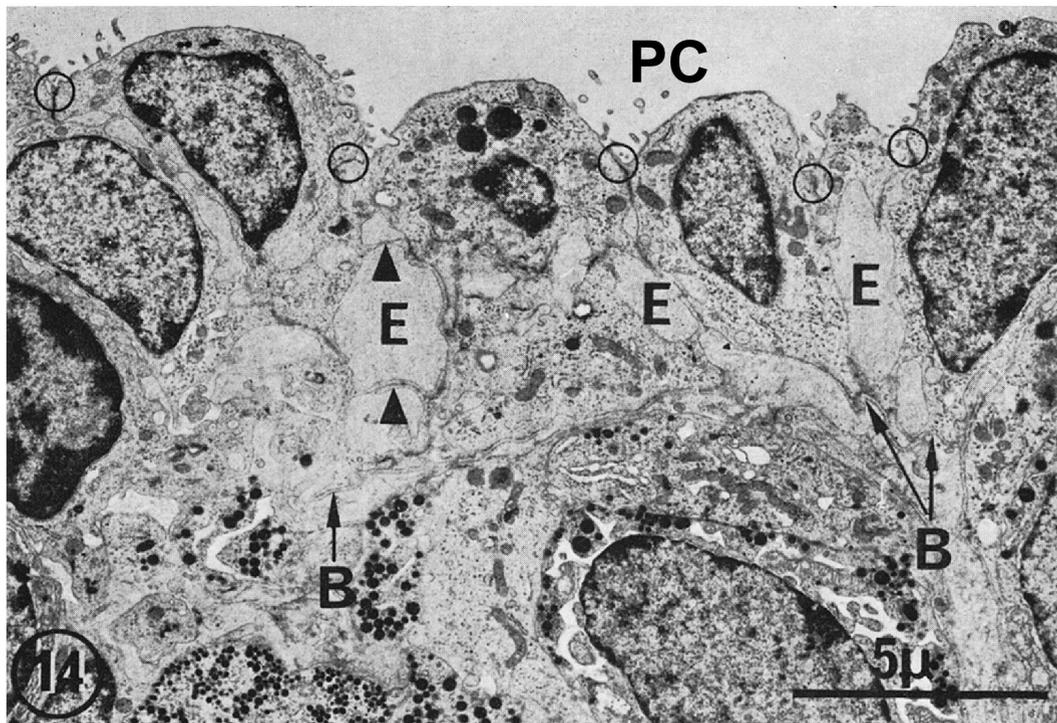


Figure 8 : Les cellules marginales bordant la fente hypophysaire.

Ces cellules émettent des villosités dans la fente hypophysaire (PC). Au pôle apical, elles sont reliées par des complexes de jonctions (cercles) et séparées par des espaces lacunaires (E) eux-mêmes cloisonnés par des languettes cytoplasmiques (triangles noirs). Certains prolongements s'appuient sur des lames basales intra-épithéliales (B) (d'après Vila-Porcile, 1973).

1.2. Les cellules folliculaires

a. Le pôle folliculaire

Le pôle folliculaire est défini comme la partie cellulaire qui borde le follicule. De nombreuses microvillosités sont émises par ce pôle dans la cavité folliculaire, ou dans la fente hypophysaire pour les cellules marginales. Leur aspect varie en fonction du type de matériel contenu dans le follicule. Quand le colloïde est dense, les microvilli sont courts ou réduits à de simples replis membranaires. Si le follicule est rempli de matériel clair, les microvillosités sont longues. En plus des microvillosités, des cils de structure variable ont été observés (Vila-Porcile, 1972 ; Dubois and Girod, 1970).

b. Jonctions intercellulaires

Les jonctions intercellulaires sont plus nombreuses entre cellules folliculaires qu'entre cellules endocrines. Elles se situent majoritairement du côté apical, proches des follicules (figure 6b), et étaient considérées à l'origine comme des jonctions serrées. Cependant, des expériences au cours desquelles de la peroxydase a été injectée par voie intraveineuse (Vila-Porcile, 1972, 1973) ont permis de montrer que le traceur pénètre rapidement dans la cavité folliculaire à partir des espaces périvasculaires. Ces jonctions ne sont donc pas étanches, et seraient du type jonctions intermédiaires (ou « zonula adherentes ») ce qui conforte l'hypothèse d'une circulation liquidienne au sein du parenchyme grâce au réseau de cellules FS.

Des jonctions communicantes (jonctions gap) ont également été observées par cryofracture (Fletcher *et al.*, 1975 ; Mira-Moser *et al.*, 1975). Un chapitre leur est consacré par la suite.

c. Corps cellulaires

Le corps cellulaire est petit (entre 3 et 10 μm de diamètre) en comparaison avec celui des cellules endocrines. Il est de forme étoilée et ne contient pas de grain de sécrétion. Le

noyau, qui occupe la majeure partie du corps cellulaire, est de section triangulaire ou quadrangulaire et possède une chromatine homogène. Il est entouré d'un fin liseré cytoplasmique (1 μm) qui ne représente que la partie mineure du cytoplasme (figure 9a). Celui-ci peut s'étendre sur de grandes surfaces une fois les prolongements rétractés, lors d'une dissociation (Farquhar, 1975 ; Hopkins and Farquhar, 1973) ou d'une mise en culture (Tixier-Vidal, 1975 ; Li, 1980).

Le réticulum endoplasmique est rare, de même que les ribosomes libres. L'appareil de Golgi, faiblement développé, se situe au pôle apical. Les mitochondries sont de petite taille, semblables à celles des cellules corticotropes (figure 9b) (Vila-Porcile, 1972). Ces caractéristiques semblent constantes d'une espèce à une autre.

Le contenu en glycogène est plus variable. En grand nombre chez l'Homme (Vila-Porcile, 1984), ou chez le chat (Olivier, 1971), les particules de glycogène sont absentes chez le rat adulte, mais sont présentes chez le jeune et le vieil animal.

Enfin, des formations lysosomales ainsi qu'une grande variété de vésicules sont toujours présentes mais leur quantité et leur contenu dépend des conditions physiologiques de l'animal (voir plus loin).

d. Les prolongements

Le pôle opposé donne souvent naissance à un ou plusieurs prolongements (figure 9a). La longueur de ces prolongements va de 10 à plus de 50 μm selon les espèces (Cardell, 1969 ; Vila-Porcile, 1972). Ils font entre 200 Å et 2 μm de largeur. Ils peuvent entrer en contact avec la lame basale qui sépare les cellules épithéliales de l'espace périvasculaire. À cet endroit, on observe la présence d'un « pied », c'est-à-dire un épaississement du prolongement, qui contient fréquemment des vésicules de pinocytose (figure 9c). La quantité et la morphologie des filaments dans les prolongements varient selon les espèces. Chez le lapin (Salazar, 1963 ; Schechter, 1969 ; Shiotani, 1980) et la tortue (Girod and Lheritier, 1981), les filaments sont

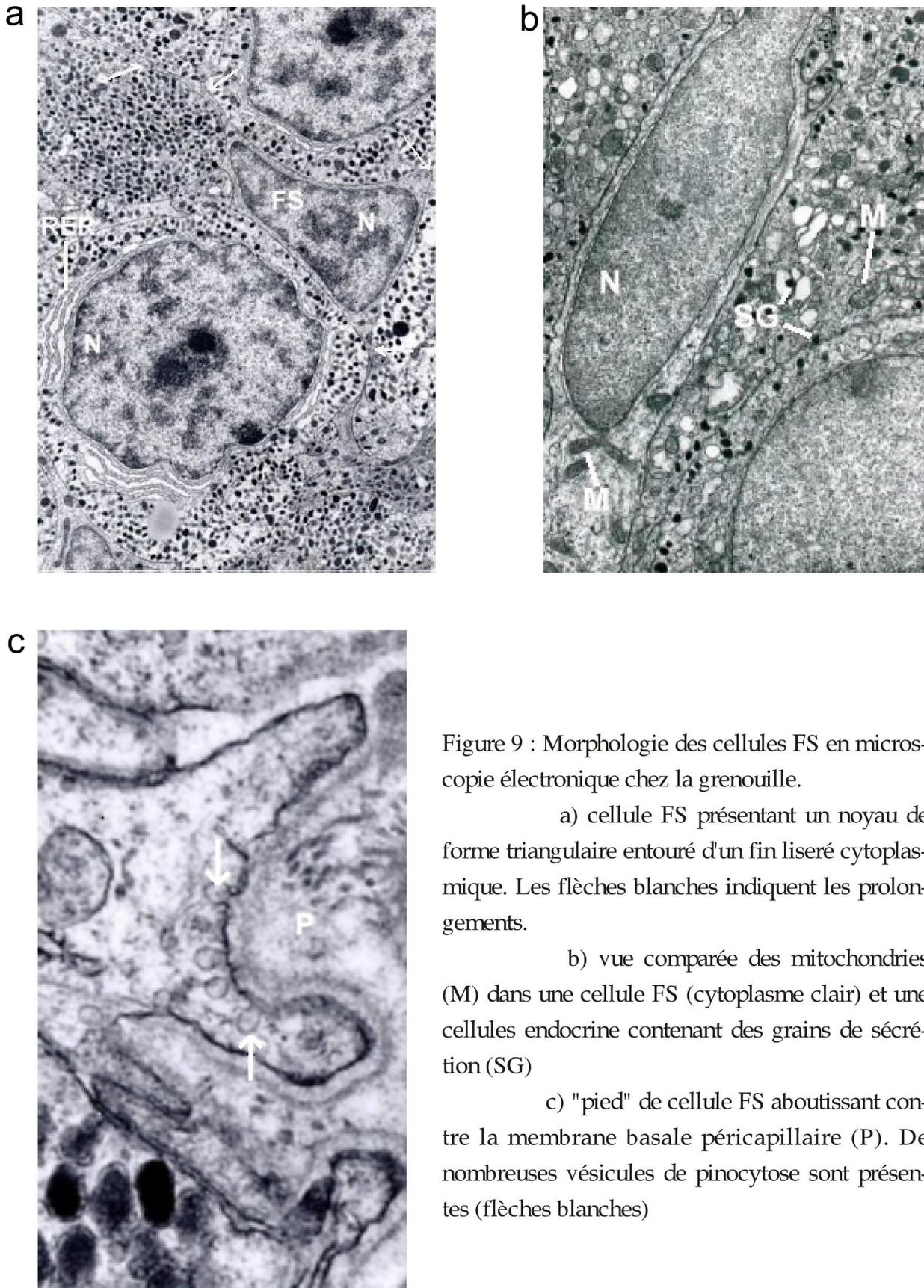


Figure 9 : Morphologie des cellules FS en microscopie électronique chez la grenouille.

a) cellule FS présentant un noyau de forme triangulaire entouré d'un fin liseré cytoplasmique. Les flèches blanches indiquent les prolongements.

b) vue comparée des mitochondries (M) dans une cellule FS (cytoplasme clair) et une cellule endocrine contenant des grains de sécrétion (SG)

c) "pied" de cellule FS aboutissant contre la membrane basale péricapillaire (P). De nombreuses vésicules de pinocytose sont présentes (flèches blanches)

Avec l'aimable autorisation d'Elisabeth K. Perryman

Ces photos sont accessibles sur internet à l'adresse suivante:

<http://bio.calpoly.edu/BioSci/Faculty/Perryman/ACellUltraStruc/pit.html>

fins et présents en très grande quantité. Ils semblent moins nombreux mais plus gros chez le cobaye (Smith, 1963 ; Nickerson, 1974 ; Young, 1977). Chez l'Homme, les filaments et les microtubules sont toujours présents, mais en faible quantité. Les prolongements peuvent parfois être courts et épais, semblables à ceux observés dans les cellules corticotropes ou thyroïdiques, donnant à la cellule un aspect trapu (cellule de type II). Elles peuvent également adopter un aspect « glial-like », avec un prolongement très long et très mince (cellule de type I) (Ciocca *et al.*, 1979).

1.3. Les cellules stellaires

Les cellules stellaires ne sont pas regroupées autour des follicules (décrits en microscopie électronique), mais viennent s'intercaler entre les groupes de cellules folliculaires. Elles sont munies de longs prolongements dendritiques qui se terminent en forme de « pied », comme ceux des cellules folliculaires. Leurs organites ont les mêmes caractéristiques, à l'exception de l'appareil de Golgi qui semble plus réduit.

2. Rôles proposés des cellules FS à la suite des études morphologiques.

2.1. Cellules de soutien

Il s'agit du premier rôle proposé pour les cellules FS, rôle qui se base sur l'anatomie générale de leur réseau. Kagayama a d'abord décrit une « charpente réticulée dans les mailles de laquelle sont empaquetées les autres cellules parenchymateuses ». La présence de complexes jonctionnels (jonctions serrées, desmosomes) entre cellules FS (Kagayama, 1965 ; Bergland and Torack, 1969), entre cellules FS et cellules endocrines (Dingemans and Feltkamp, 1972), le cytosquelette important, ou la disposition des « pieds » contre la lame basale sont autant d'arguments en faveur de ce rôle (Kagayama, 1965 ; Cardell, 1969).

2.2. Activités phagocytique et endocytique

a. Phagocytose

L'activité phagocytique des cellules FS a été décrite très tôt (Young *et al.*, 1965). Ce phénomène existe *in vivo* chez toutes les espèces, à tous les âges (Vila-Porcile, 1984, Perryman, 1989). La phagocytose peut être accentuée au cours de différentes situations physiologiques, comme le sevrage des petits chez la ratte, le moment du frai chez la lamproie, ou par stimulation endocrine due à l'ablation des organes cibles ou section de la tige pituitaire. Elle est également observable *in vitro*, dans des fragments hypophysaires perfusés (Dingemans and Feltkamp, 1972 ; Farquhar *et al.*, 1975 ; Yamashita, 1972 ; Gracia-Navarro *et al.*, 1989) ou implantés (Dingemans and Feltkamp, 1972), ou sur des cellules dissociées (Dingemans and Feltkamp, 1972 ; Farquhar *et al.*, 1975).

La phagocytose par les cellules FS semble avoir lieu grâce à l'encerclement de l'élément lésé par les prolongements cellulaires, puis à l'internalisation au sein d'une large vacuole (Figure 10). Les cellules FS phagocytiques changent également de morphologie. Elles s'hypertrophient, leur réticulum endoplasmique se développe ainsi que le nombre de lysosomes et de gouttelettes lipidiques, les cils se font plus nombreux dans la cavité folliculaire, et le colloïde devient plus dense. Ce profil d'activation est décrit quelle que soit la condition physiologique induite de manière expérimentale, mais le processus de déclenchement de la phagocytose reste encore inconnu.

Le contenu des vésicules phagocytiques va du débris cellulaire à la cellule entière. De nombreux grains de sécrétion y sont présents, et sont identifiables par immunocytochimie (Gracia-Navarro *et al.*, 1989). Pour l'instant, seules des cellules endocrines ou leurs débris semblent être phagocytés par les cellules FS. Le devenir de ces éléments est encore obscur, bien que nombreux débris cellulaires soient présents dans les follicules et semblent responsables de la densification du colloïde. Ces débris pourraient ainsi être évacués vers les espaces périvasculaires, où ils seraient éliminés par des macrophages.

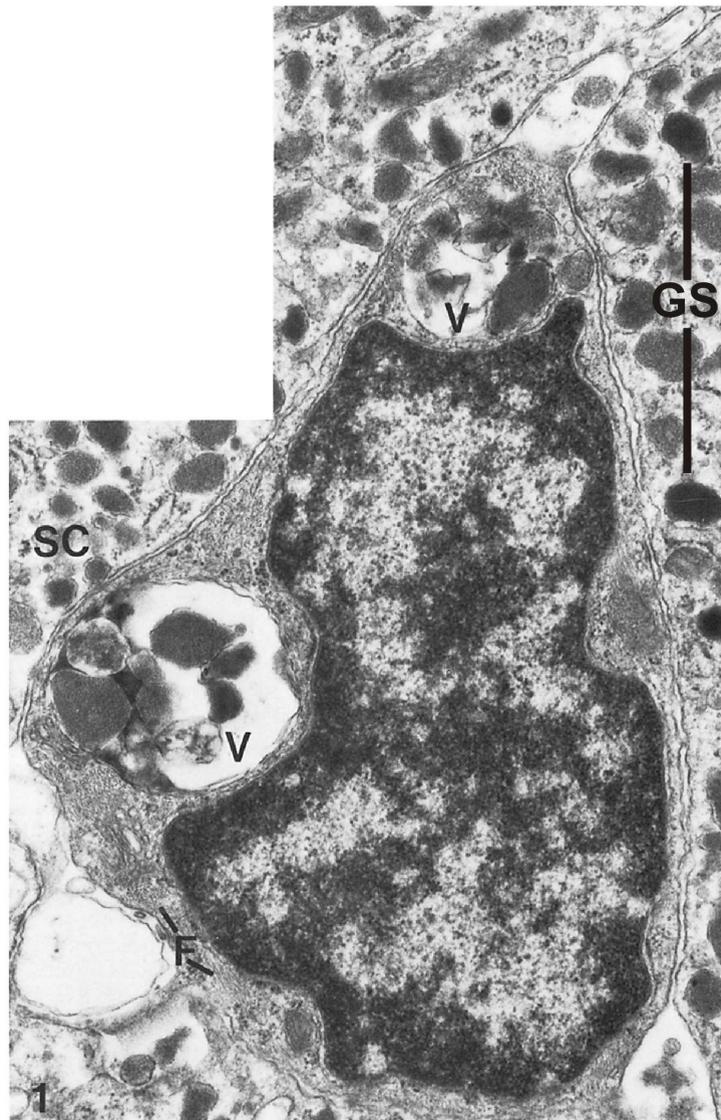


Figure 10 : Activité phagocytaire des cellules FS (d'après Perryman *et al.*, 1980).
Image d'une cellule FS présentant deux larges vacuoles de phagocytose (V). Ces vésicules résultent de l'ingestion des grains de sécrétion (GS) et de débris de cellules endocrines sécrétrices (SC) à partir des espaces intercellulaires. F, filaments cytoplasmiques.
x 25150

b. Endocytose

Un autre rôle dévolu aux cellules FS est un rôle de transport vésiculaire. Des vésicules recouvertes ou non de clathrine sont présentes à la base des microvillosités, et seraient responsables d'échanges bidirectionnels entre la cavité folliculaire et les cellules environnantes (Jover Moyano and Riviera Pomar, 1970 ; Paiz and Hennigar, 1970 ; Foster, 1971 ; Perryman *et al.*, 1980). L'endocytose n'a pas uniquement lieu au pôle apical car la formation des microvésicules a également été observée sur le reste du corps cellulaire, dans les prolongements, et au niveau du « pied » (Perryman, 1975). Lorsque de la peroxydase est injectée par voie intraveineuse chez le rat ou la grenouille, l'enzyme diffuse rapidement vers les espaces intercellulaires et la lumière des follicules. L'internalisation par les cellules FS est plus rapide que pour les cellules endocrines (moins de 2 minutes), et semble pouvoir s'effectuer dans tous les compartiments cellulaires (Vila-Porcile, 1972, 1974). Il n'y a pas d'évidence concernant un transport de molécules des espaces périvasculaires vers les follicules (ou inversement) *via* un transport vésiculaire. Des évènements de libération n'ayant jamais été observés par microscopie électronique dans les cellules FS, certains auteurs suggèrent que ces vésicules sont peu mobiles (Perryman and Bagnara, 1978).

2.3. Eléments contractiles et mobiles

L'observation des faisceaux de filaments dans les cellules FS peut en effet laisser supposer une contractilité de ces cellules. Leur mobilité est communément admise du fait qu'elles sont capables de changer de forme, notamment au niveau des prolongements, changeant également la forme du follicule (Schultz *et al.*, 1979 ; Betchaku and Douglas, 1981). Ces mouvements peuvent se produire lors du processus de phagocytose. Ils pourraient également expliquer la migration des nombreuses cellules folliculaires à la périphérie des explants en culture (Farquhar, 1975 ; Tixier-Vidal, 1975 ; Li, 1980).

L'observation d'une lame basale composée de plusieurs couches chez des patients diabétiques âgés suggère également des dépôts successifs de matériel qui pourraient être expliqués par des mouvements de rétraction des « pieds » (Vila-Porcile, 1984). Ceci impliquerait un rôle de ces « pieds » dans la synthèse de lame basale, qui n'a, pour le moment, jamais été démontré.

2.4. Echanges avec le milieu extérieur et transports de fluides dans le parenchyme.

Cette fonction a été évoquée dans de nombreux articles, notamment à cause de la grande surface membranaire des cellules due aux prolongements et aux microvillosités. Les expériences utilisant la peroxydase comme traceur ont montré la présence d'un chemin continu entre les espaces péri-cellulaires, péri-vasculaires, les follicules et la fente hypophysaire (Vila-Porcile, 1972, 1973). Une $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ a été décrite sur la membrane de ces cellules stellaires de la Pars Intermedia de grenouille (Semoff and Hadley, 1978). Ces auteurs proposèrent que les cellules FS pourraient dépolariser les cellules mélanotropes voisines et stimuler la libération d' $\alpha\text{-MSH}$, et qu'elles seraient similaires aux cellules gliales du système nerveux central. Une accumulation intravésiculaire de calcium dans les cellules FS de souris (Stoeckel *et al.*, 1975) a également été décrite. Ces mécanismes pourraient influencer la composition ionique du milieu intercellulaire, et agir ainsi directement sur le processus d'exocytose des cellules endocrines en modulant la concentration en calcium du milieu externe.

2.5. Interaction avec les cellules endocrines

Ce rôle a souvent été mentionné, et est communément associé à un apport nutritif (Rinehart et Farquhar, 1955, Shiotani, 1980) et un apport hormonal (Abraham, 1971) pour les cellules endocrines ou à un transport des produits hormonaux des cellules sécrétrices vers les

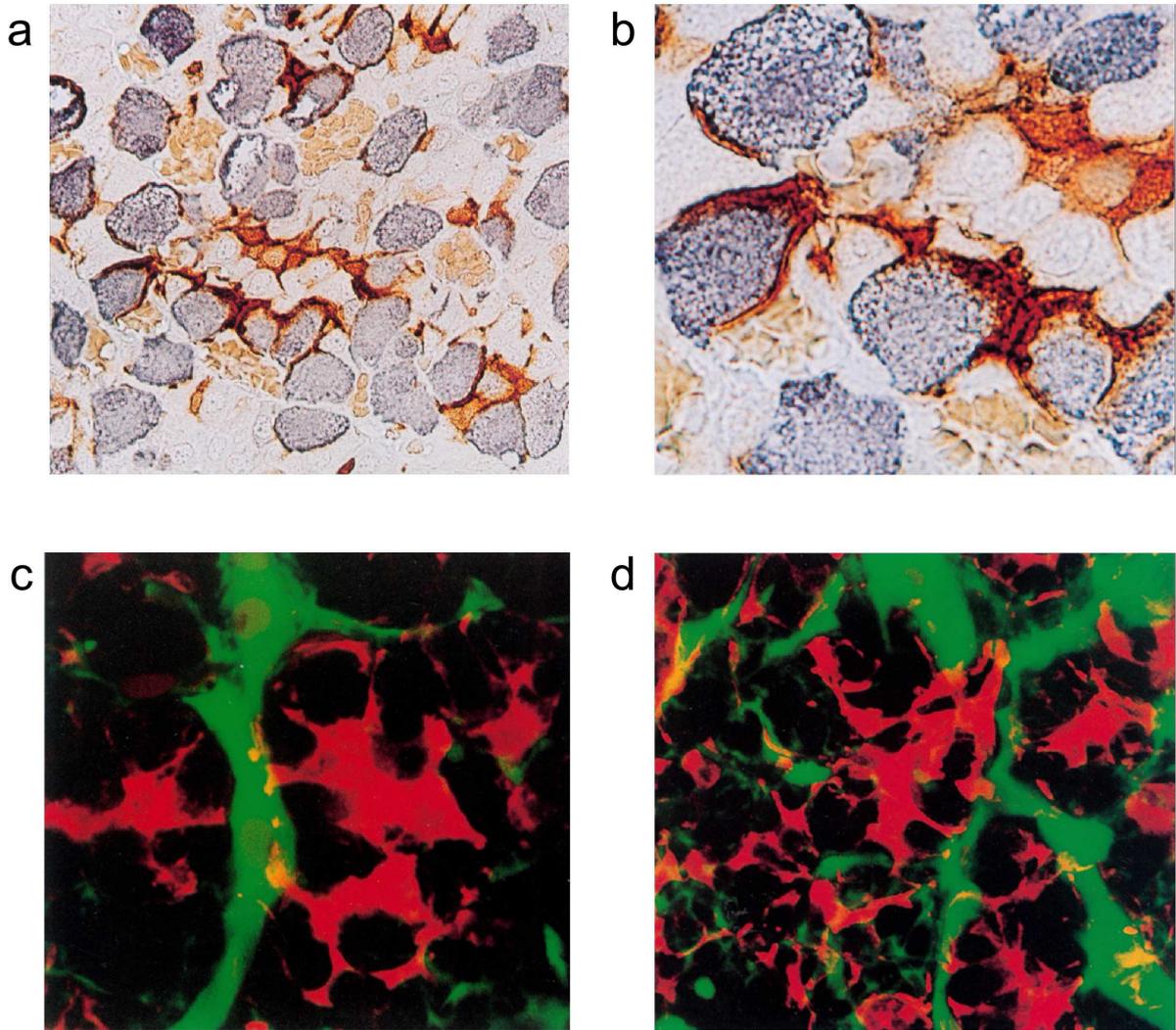


Figure 11 : Changements morphologiques du réseau de cellules FS après castration chez le mâle. (d'après Inoue *et al.*, 1999)

a) immuno-marquage de cellules FS (protéine S-100, marron) et de cellules gonadotropes (LH, bleu) montrant l'aspect général des interactions entre ces deux types cellulaires (x 390).

b) agrandissement de **a** (x 970). Des prolongements de cellules FS "engloutissent" des cellules gonadotropes.

c) image confocale de cellules FS (rouge) et de vaisseaux sanguins (vert) chez un rat contrôle (x 970). Les vaisseaux sont marqués par injection de gélatine-FITC *via* le ventricule gauche. Les zones de contact entre les prolongements des cellules FS et les vaisseaux apparaissent en jaune.

d) chez le rat castré, on note une augmentation des contacts entre les cellules FS et les vaisseaux (x 680).

vaisseaux sanguins. La proximité des prolongements des cellules FS et des sites d'exocytose des cellules endocrines peut suggérer une influence sur la capacité des granules à être libérés, ou une possible capture des produits sécrétés.

Cependant, la majorité des approches par stimulation des cellules endocrines qu'elles soient physiologiques ou expérimentales par ablation des organes cibles semblent toujours conduire au même résultat : hypertrophie des cellules FS, augmentation des formations lysosomales, des filaments et des microvillosités. Seule la castration induit des changements morphologiques du réseau. En effet, on observe une augmentation des contacts entre cellules FS et cellules gonadotropes, avec leurs prolongements entourant les cellules endocrines hypertrophiées (figure 11a et 11b) (Shirasawa *et al.*, 1983 ; Inoue *et al.*, 1999). Il y a également une augmentation des contacts entre les extrémités des prolongements des cellules FS et la paroi des vaisseaux sanguins (figure 11c et 11d) (Inoue *et al.*, 1999). Le réseau de cellules FS est donc doté d'une certaine plasticité.

IV. HISTORIQUE DES RECHERCHES SUR LES CELLULES FOLLICULOSTELLAIRES, 2^e PARTIE : 1981-21^e SIECLE

Malgré la multitude d'informations sur l'anatomie des cellules FS et d'hypothèses concernant leur rôle, et bien qu'elles soient considérées comme un type cellulaire mature et différencié, elles restent selon Nunez et Gershon « des cellules à la recherche d'une fonction » (Nunez and Gershon, 1981). L'identification de marqueurs immunocytochimiques spécifiques des cellules FS, comme la protéine S-100, va permettre de les observer en microscopie photonique. Les confusions terminologiques vont être clarifiées, mais les nouvelles pistes suivies concernant leur origine embryologique, notamment leur homologie avec des cellules gliales ou des cellules du système immunitaire, vont renforcer l'idée d'hétérogénéité de la population de cellules FS, et faire l'objet de nombreux débats.

Le travail d'Ishikawa, qui isole une lignée de cellules FS et démontre qu'elles peuvent moduler la sécrétion de prolactine (PRL) marque un véritable tournant dans les stratégies d'étude des cellules FS. Denef et ses collaborateurs vont être les premiers à réaliser des études physiologiques sur les cellules FS natives et mettront en évidence leur rôle dans les interactions paracrines au sein de l'hypophyse. Bien qu'étant considérées comme des cellules non sécrétrices à cause de leur absence de vésicules, elles vont être identifiées comme étant la source de nombreuses molécules pouvant influencer le fonctionnement de l'hypophyse antérieure (pour revue, voir Allaerts *et al.*, 1990). L'établissement d'une lignée cellulaire stable de cellules FS, la lignée TtT/GF (Inoue *et al.*, 1992), permettra d'étudier la libération de certains de ces facteurs et de nombreux travaux montreront que les cellules FS sont la cible de diverses molécules. La présence de jonctions gap entre cellules FS, mais aussi entre cellules FS et cellules endocrines sera également mise en évidence. L'ensemble de ces travaux permettra d'ajouter la notion de « communication intercellulaire » à celle de « réseau anatomique » déjà décrite auparavant.

En résumé, le rôle de cellule de soutien qui leur était le plus souvent attribué cèdera sa place au profit d'un rôle plus fonctionnel, comme le démontre la part grandissante de publications mentionnant les cellules folliculostellaires en tant qu'acteur à part entière de la physiologie hypophysaire.

V. IDENTIFICATION DE MARQUEURS ET ORIGINE EMBRYOLOGIQUE DES CELLULES FS.

1. Protéine S-100, GFAP, vimentine : les cellules FS sont-elles les cellules gliales de l'hypophyse?

Les premières études immunocytochimiques des cellules FS chez le rat (Nakajima *et al.*, 1980 ; Cocchia and Miani, 1980), montrent la présence de la protéine S-100, décrite jusqu'alors comme étant spécifique du cerveau. La protéine S-100 est une protéine liant le calcium, et dont la famille comporte actuellement 19 membres (Donato, 1999). Elle agit sous forme d'homo ou d'hétérodimère des sous-unités α ou β , et elle est impliquée dans des fonctions aussi diverses que la prolifération cellulaire, la sécrétion, l'apoptose, l'homéostasie calcique ou les mouvements du cytosquelette.

Chez le rat, la protéine est présente dans les cellules FS de la *Pars Distalis*, de la *Pars Tuberalis*, dans les cellules marginales, dans les pituicytes de la neurohypophyse, et les cellules stellaires du lobe intermédiaire (Stoeckel *et al.*, 1981). Elle est également exprimée dans les hypophyses de chèvre (Shirasawa *et al.*, 1984), de bœuf (Ferrara *et al.*, 1986), de singe (Girod *et al.*, 1986), et les hypophyses humaines normales (Girod *et al.*, 1985) et tumorales (Morris and Hitchcock, 1985 ; Ogawa *et al.*, 1990). Seul l'article de Shirasawa fait état d'une colocalisation de la protéine S-100 avec l'hormone de croissance (GH) chez la chèvre. Ce travail qui reposait sur l'utilisation de coupes sériées ultrafines et leur superposition après immunomarquage reste le seul exemple de colocalisation de la protéine S-100 avec une hormone hypophysaire. Il pourrait s'agir d'une différence liée à l'espèce, puisque les études suivantes effectuées chez d'autres animaux et utilisant un co-immunomarquage ont démontré une expression de cette molécule restreinte aux cellules folliculostellaires dans les lobes antérieur et intermédiaire.

La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) est également présente dans les cellules folliculostellaires essentiellement chez l'homme (Velasco *et al.*, 1982 ; Morris and Hitchcock, 1985 ; Redecker and Morgenroth, 1989 ; Hallyday *et al.*, 1990), mais aussi chez le rat (Van Nassauw *et al.*, 1985) ou le vison (Cardin *et al.*, 2000). Cependant, la population de cellules immunoréactives varie selon les cas, et elle est surtout inférieure en nombre à celle des cellules marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine S-100 (Hallyday *et al.*, 1990 ; Höfler *et al.*, 1984a ; Redecker and Fechner, 1989).

Chez l'Homme, trois populations se distinguent : les cellules exprimant à la fois la protéine S-100 et la GFAP, qui sont distribuées de manière homogène, les cellules exprimant seulement la protéine S-100, situées dans la région centrale de la glande, et les cellules exprimant exclusivement la GFAP, localisées préférentiellement en périphérie de glande, notamment au niveau de la couche de cellules marginales (Hallyday *et al.*, 1990 ; Höfler *et al.*, 1984a). Cette hétérogénéité de population est problématique. Par exemple, la co-expression de la protéine S-100 et de la GFAP ne concerne que 30 % des cellules FS humaines (Tachibana and Yamashima, 1988), mais les cellules de la lignée TtT/GF co-expriment toutes ces deux protéines. Cette lignée, établie par Inoue *et al.* (Inoue *et al.*, 1992) à partir d'une tumeur thyroïdienne hypophysaire de souris, est devenu le modèle le plus couramment utilisé dans l'étude physiologique des cellules FS. Il se pourrait cependant que cette lignée soit issue que d'une sous-population de cellules FS.

La vimentine, un constituant des filaments intermédiaires, est aussi exprimée dans les cellules FS. Dans des tissus hypophysaires humains fixés au formaldéhyde ou au Bouin (Höfler *et al.*, 1984a ; Tachibana and Yamashima, 1988 ; Redecker and Fechner, 1989), elle est présente dans environ 10 % des cellules exprimant la protéine S-100. En utilisant une fixation au méthanol, l'immunogénicité de la protéine est mieux préservée, et le pourcentage de cellules marquées est du même ordre que celui des cellules S-100-positives (Marin *et al.*,

1989a ; Ogawa *et al.*, 1990). La vimentine est également un marqueur immunocytochimique des cellules FS chez le rat, le lapin et le chat (Marin *et al.*, 1989b).

Les cytokératines ont également été décrites comme marqueurs des cellules FS chez l'Homme par certains auteurs (Tachibana and Yamashima, 1988 ; Hallyday *et al.*, 1990), mais la spécificité semble remise en cause, d'autres auteurs ayant vu l'expression de cytokératines par les cellules endocrines (Höfler *et al.*, 1984b, Marin *et al.*, 1989a). Cette différence de marquage peut être due à la méthode de fixation, ou aux anticorps utilisés, les cytokératines formant une famille de 19 polypeptides dont seuls ceux de haut poids moléculaire sont exprimés dans les cellules FS (Tachibana and Yamashima, 1988).

La présence dans les cellules FS de marqueurs comme la protéine S-100 ou la GFAP, observée à l'origine dans les neurones et les cellules gliales, suggère leur origine neuroectodermique, comme pour les pituicytes. Le terme « glial-like » leur reste encore associé, du fait de leur morphologie qui rappelle celle des astrocytes. De plus, Coates et Doniach (Coates and Doniach, 1988) montrent l'absence de protéine S-100 dans 3 hypophyses de fœtus anencéphales. Mais l'expression de cette famille de protéine n'est pas restreinte aux cellules dérivant du neuroectoderme ou de la crête neurale (Haimoto *et al.*, 1987). De plus, les cellules FS peuvent être présentes avant le début de l'expression de la protéine S-100, que Shirasawa situe à 10 jours après la naissance chez le rat. Enfin, Salazar décrit la présence de cellules stellaires agranulaires chez des fœtus anencéphales (Salazar *et al.*, 1969a et 1969b). Une induction par le neuroectoderme est donc peu plausible.

2. Cellules FS et cellules dendritiques : vers une origine hématopoïétique des cellules FS

La détection de marqueurs de cellules du système immunitaire dans l'hypophyse antérieure va accentuer l'idée d'hétérogénéité au sein des cellules FS. Le premier de ces

marqueurs, l'UCHL-1, un identifiant des lymphocytes-T, est exprimé par des cellules FS humaines (Gunzl and Saeger, 1988). Allaerts *et al.* (Allaerts *et al.*, 1991, 1996) vont également étudier la ressemblance morphologique et immunohistochimique entre les cellules FS et les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrices d'antigènes qui expriment à leur surface le Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I et II (MHC-class I et MHC-class II), et qui vont permettre l'activation des lymphocytes-T et B (pour revue, Banchereau and Steinman, 2000). Comme les macrophages, elles sont issues de la différenciation de monocytes sanguins. Leurs marqueurs les plus utilisés sont l'antigène OX6 (qui fait partie du MHC-class II et qui peut être présent dans les cellules dendritiques ou les macrophages), l'antigène OX62 (marqueur des cellules dendritiques et de certains lymphocytes-T) et...la protéine S-100. D'après Allaerts *et al.* (Allaerts *et al.*, 1996, 1997b), entre 10 et 20 % des cellules S-100 positives de l'hypophyse de rat expriment le OX6 ou OX62. La mise en place de l'expression du MHC-class II coïncide avec celle de la protéine S-100, et concerne des cellules du parenchyme et non des cellules présentes dans les espaces périvasculaires (Allaerts *et al.*, 1999). Une partie de cellules FS s'apparenteraient donc aux cellules dendritiques. Cependant, ces résultats sont contredits par Sato et Inoue (Sato et Inoue, 2000), qui n'ont pas observé de co-marquage S-100 / OX6. Mais, étant donnée la présence de protéine S-100 dans des cellules dendritiques de tissus non-lymphoïdes (Zeid and Muller, 1993), une origine myéloïde des cellules S-100 positives de l'hypophyse ne peut pas être exclue. Chez des souris transgéniques exprimant la Thymidine Kinase (TK) dans les cellules du lignage monocyte/macrophage/cellule dendritique, les cellules S-100 et MCH-class II positives de l'hypophyse ne sont pas affectées par un traitement au ganciclovir, drogue qui permet de tuer les cellules exprimant la TK. En revanche, une autre population de cellules interstitielles, exprimant les antigènes CD11b et MOMA1, présents sur les macrophages, disparaît après traitement (Allaerts *et al.*, 1997a). Chez le poulet, des macrophages infiltrent l'hypophyse au cours du développement, bien avant l'apparition de cellules S-100 et/ou

MCH-class II positives (Allaerts *et al.*, 1999). Ce sont sans doute ces macrophages résidents qui ont été éliminés par le traitement au ganciclovir. L'ensemble de ces travaux n'apporte pas la preuve d'une origine immunitaire des cellules FS, mais conforte la notion d'hétérogénéité de cette population (Allaerts *et al.*, 1997b).

3. Origine hypophysaire : cellule souche, cellule épithéliale de la poche de Rathke ou cellules granulaires dédifférenciées ?

L'invagination de l'ectoderme stomodéal et la formation de la poche de Rathke est un des premiers stades du développement de l'hypophyse. D'après Yoshida (Yoshida, 1966) et Svalander (Svalander, 1974), les cellules qui bordent les premiers follicules sont semblables aux cellules marginales, et apparaissent au 16^e jour embryonnaire chez le rat. Elles se différencieraient très tôt à partir des cellules primordiales de la poche de Rathke, ce qui expliquerait leur morphologie constante de la vie embryonnaire à l'âge adulte (Svalander, 1974, Vila-Porcile, 1984).

Andersen (Andersen *et al.*, 1971) et Yoshimura (Yoshimura, 1977), à partir d'observations similaires, émettent l'hypothèse que les cellules FS sont les cellules souches de l'hypophyse. Selon Yoshimura, ces cellules peuvent migrer, former occasionnellement un réseau, et se différencier en cellules granulaires sous l'effet de différents stimuli (thyroïdectomie, autotransplantation sous la capsule rénale). Ce travail s'appuyait sur l'observation d'une activité mitotique au sein de groupes de cellules folliculaires, de quelques cellules FS contenant une faible quantité de grains denses aux électrons, et sur un travail de Shioda (Shioda, 1975) décrivant des « mitoses non spécifiques » dans des cellules chromophobes après marquage à la thymidine tritiée. Mais l'étude du développement de l'hypophyse montre que les cellules endocrines commencent à se différencier bien avant le 16^e jour de la vie fœtale chez le rat. La baisse du rapport cellules FS / cellules endocrines, qui

passer de 30 % chez le nouveau-né à 17 % chez le jeune et 8 % chez l'adulte, serait dû à la prolifération des cellules granulaires. De plus, un état de transition entre cellule FS et cellule granulaire n'a été décrit qu'une seule fois (Shirasawa *et al.*, 1984). Ces données ajoutées à l'absence de prolifération des cellules FS observée par certains auteurs (Dingemans, 1970 ; Stratmann, 1972) ont fait que l'hypothèse selon laquelle les cellules FS seraient les cellules souches de l'hypophyse n'a pas été communément acceptée.

Pourtant, selon Andersen, la capacité des cellules FS à se différencier en cellules granulaires explique la présence de follicules mixtes. Mais l'existence de telles structures pourrait également résulter de la dédifférenciation de cellules endocrines, puis leur redifférenciation en cellules agranulaires, idée émise par Horvath *et al.* (Horvath *et al.*, 1974). Selon eux, chez l'Homme, ces cellules dérivent de cellules granulaires entourant des cellules hypophysaires lésées, et servent à isoler le tissu sain de la partie nécrotique. Cette idée pourrait expliquer l'augmentation avec l'âge ou lors de certaines conditions pathologiques (gonadectomie), du nombre de « cysts » où les cellules S-100 positives sont minoritaires. Mais l'observation de follicules « purs » dans des hypophyses humaines normales ou pathologiques (Ciocca *et al.*, 1979 ; Olivier *et al.*, 1975 ; Paiz and Hennigar, 1970), ainsi que la présence de cellules FS chez les espèces dépourvues de telles cavités sème le doute sur cette hypothèse.

Dans des poches de Rathke de caille prélevées au quatrième jour de la vie embryonnaire et maintenues en culture, Frémont et Ferrand (Frémont and Ferrand, 1980) observent l'apparition de cellules à la surface de l'explant, qui progressivement acquièrent une morphologie identique à celle de cellules FS. Ces cellules émettent des microvillosités vers l'extérieur de l'explant, alors que les cellules bordant la fente possèdent des grains de sécrétion. La fente est remplie d'un matériel fibreux qui normalement *in vivo* est à la périphérie de la poche. Enfin, la différenciation des cellules granulaires a lieu au centre de l'explant, alors qu'elle se fait normalement à la périphérie. L'organisation de la poche de

Rathke en culture est donc inversée. Les auteurs pensent que la transformation des cellules épithéliales non différenciées en cellules FS est en due à la destruction de la lame basale au cours de la dissection (qui est accompagnée d'une digestion enzymatique) et à l'incapacité de ces cellules à la reconstituer, les protéines étant rapidement diluées dans le milieu de culture. Ils ne donnent par contre aucune explication concernant les changements au niveau de la fente ou l'absence de cellules FS à l'intérieur de l'explant. Néanmoins, ce travail conforte l'idée de cellules FS provenant de cellules épithéliales non différenciées, même si l'hypothèse de la dédifférenciation de cellules granulaires ne peut être exclue.

La possibilité d'une telle origine a longtemps été occultée au profit des travaux sur les origines neuroectodermique et immunitaire des cellules FS. Une publication récente relance pourtant l'idée de cette piste. En effet, le facteur de transcription Ptx-1 (Pituitary Homeobox 1) est exprimé dans les cellules FS de souris ainsi que dans la lignée TtT/GF (Kurotani *et al.*, 1999) et la lignée Tpit/F1 (Chen *et al.*, 2000). Ptx-1 est présent dans l'épithélium stomodéal dès le 8^e jour embryonnaire (Lancôtôt *et al.*, 1997), avant même la formation de la poche de Rathke et reste exprimé tout au long de la vie dans les cellules endocrines hypophysaires. Les cellules FS et les cellules endocrines pourraient donc dériver d'un ancêtre commun.

VI. ETUDE PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES FS : DES APPROCHES *IN VITRO*.

L'identification de marqueurs des cellules FS a été une étape déterminante dans l'étude fonctionnelle des cellules FS. Dès 1983, Ishikawa *et al.* (Ishikawa *et al.*, 1983) immortalisent une lignée de cellules (JH-S3) produisant la protéine S-100 à partir de cellules hypophysaires dissociées. Ces cellules présentent des caractéristiques morphologiques similaires à celles des cellules FS *in situ*. Mais le fait majeur de ce travail est la démonstration que les cellules JH-S3 peuvent augmenter la libération de prolactine par une lignée de cellules lactotropes (cellules 1G4), notamment *via* la libération et l'action paracrine de la protéine S-

100. La participation des cellules FS dans les phénomènes de communication intercellulaire va être le thème central de la majorité des études effectuées jusqu'à aujourd'hui.

L'hétérogénéité de population des cellules FS a été une incitation à leur purification et à la recherche et l'établissement de lignées cellulaires stables. Différents modèles ont donc été développés, qui ont permis de démontrer l'influence de la présence des cellules FS sur les sécrétions des cellules endocrines, puis d'identifier des facteurs libérés par ces cellules agranulaires qui pourraient être les médiateurs de cette communication intercellulaire (pour revue, Allaerts *et al.*, 1990 ; Vankelecom and Denef, 1997a ; Schwartz, 2000). La communication intercellulaire directe *via* les jonctions gap a également été abordée, ainsi que le rôle des cellules FS dans les pathologies hypophysaires.

1. Effet modulateur des cellules FS sur les sécrétions endocrines.

En 1982, le groupe de Denef développe un système de culture permettant d'étudier les communications intercellulaires au sein du tissu hypophysaire (Van der Schueren *et al.*, 1982). La centrifugation des cellules dissociées sur gradient de BSA permet d'obtenir différentes fractions. En étudiant la corrélation entre la production d'AMPc et la sécrétion de GH et de PRL suite à une stimulation β -adrénergique sur ces différentes fractions, Swennen *et al.* (Swennen) montrent que la fraction la plus légère (fraction 2) développe une forte réponse à l'isoprotérénol, qui n'est pas accompagnée de sécrétions hormonales. Cette fraction est composée à 65 % de cellules exprimant la protéine S-100 (Baes *et al.*, 1987a). Le perfectionnement de ces techniques de séparation, notamment grâce à l'utilisation de gradients de Percoll, a permis d'obtenir des populations de cellules FS pures à 85 % (Vankelecom *et al.*, 1989), et des populations de cellules lactotropes et somatotropes pures à 90 % (Denef *et al.*, 1989). Les différentes fractions sont ensuite mélangées dans des proportions connues, et cultivées sous la forme d'agrégats tridimensionnels, adoptant ainsi

une configuration plus proche de celle du tissu avec, en particulier, la formation de follicules par les cellules FS.

D'une manière générale, la co-agrégation de la fraction riche en cellules FS avec les fractions riches en cellules somatotropes, lactotropes ou gonadotropes résulte en une diminution de la réponse des cellules endocrines à des facteurs hypothalamiques stimulateurs ou inhibiteurs. Dans un premier temps, Baes *et al.* (Baes *et al.*, 1987a) ont montré les effets inhibiteurs des cellules FS sur la sécrétion de GH stimulée par le GRF ou l'adrénaline, sur la sécrétion de PRL en réponse à la TRH et l'AII, et la sécrétion de LH en réponse au LHRH. L'inhibition de la réponse à l'AII est proportionnelle au pourcentage de cellules de la fraction 2 au sein de l'agrégat. Elle persiste après redispersion de l'agrégat, laissant supposer qu'elle ne nécessite pas de contacts intercellulaires. Dans un second article, Allaerts et Denef (Allaerts and Denef, 1989) mettent cette fois en évidence un effet similaire sur les effets inhibiteurs de la dopamine (DA) sur la sécrétion de PRL, et de la somatostatine (SRIF) sur la sécrétion de GH (pour une concentration de SRIF inférieure à 1 nM). Enfin, cet effet s'exerce aussi sur une stimulation de la sécrétion de PRL par l'AII lors d'une inhibition tonique par la DA. Cet effet « tampon » n'est pas dû à un problème de non-pénétration du sécrétagogue à l'intérieur de l'agrégat, puisque la diffusion de molécules au sein des espaces intercellulaires est possible, et les caractéristiques de diffusion des traceurs sont inchangées en absence ou en présence de cellules FS (Allaerts *et al.*, 1990).

L'effet inhibiteur des cellules FS ne s'exerce pas uniquement sur l'action des sécrétagogues hypothalamiques. Les cellules FS semblent être les médiatrices de l'action de l'Interferon- γ (IFN- γ). Cette cytokine produite par les lymphocytes-T et les cellules NK (Natural Killer) permet l'activation des phagocytes mononucléaires en macrophages actifs dont les caractéristiques principales sont la présentation d'antigènes, l'activité phagocytaire et la libération de cytokines. Dans les cultures et les agrégats non purifiés, l'IFN- γ diminue de 50 % la sécrétion d'ACTH induite par le CRF. La sécrétion de PRL induite par la TRH, le

VIP ou l'AII est réduite de 70 %, et celle de GH en réponse au GRF l'est de 30 % (Vankelecom *et al.*, 1990). Il n'y a en revanche pas d'effet de l'IFN- γ sur la sécrétion de ces hormones dans des lignées de cellules corticotropes (AtT-20) ou lacto-somatotropes (GH₃). L'utilisation des co-agrégats montre que seuls ceux qui contiennent des cellules FS sont sensibles à l'IFN- γ (Vankelecom *et al.*, 1992). L'IFN- γ diminue également la sécrétion basale de PRL, mais pas celle d'ACTH ni de GH.

Ces premiers travaux montrent que les cellules FS exercent un effet modulateur sur les réponses hormonales à des facteurs hypothalamiques ou immunitaires. Parallèlement à ces travaux, il a été montré que les cellules FS sont la source de nombreux facteurs pouvant agir par paracrinie sur les cellules endocrines, mais également qu'elles sont la cible de plusieurs molécules qui pourraient réguler leur fonction. L'ensemble de ces facteurs permet d'envisager leur participation au niveau des trois étages de régulation de la fonction hypophysaire, c'est-à-dire les étages central, intra-hypophysaire et périphérique (figure 3).

2. Les différents agents libérés par les cellules FS et leur rôle dans la physiologie hypophysaire

2.1. Interleukine-6

De toutes les molécules libérées par les cellules FS, l'Interleukine-6 (IL-6) est celle dont le rôle est le mieux caractérisé. Sa production est influencée par des facteurs d'origine centrale, intra-hypophysaire ou périphérique (figure 12), et elle peut agir sur différents types cellulaires endocrines (pour revue, Renner *et al.*, 1998 ; Ray and Melmed, 1997).

La première mise en évidence de la production d'IL-6 par les cellules hypophysaires a été faite par Vankelecom *et al.*, sur des agrégats de cellules hypophysaires (Vankelecom *et al.*, 1989). La quantité d'IL-6 libérée est corrélée au pourcentage de cellules FS contenues dans l'agrégat. La présence de cette cytokine dans les cellules FS a également été démontrée par immunocytochimie chez la souris (Vankelecom *et al.*, 1993) et le rat (Allaerts *et al.*,

1997b). Par contre, il semble que ce ne soient pas les cellules FS mais les cellules corticotropes qui libèrent l'IL-6 dans les adénomes hypophysaires humains (Ueta *et al.*, 1995).

La régulation par des agents pharmacologiques de la libération d'IL-6 a été d'abord étudiée sur cultures primaires de cellules FS (purifiées ou non) ou sur des fragments hypophysaires. Dans des héli-hypophyses maintenues *in vitro*, le PMA stimule la production d'IL-6 (Spangelo *et al.*, 1990a). Dans les cultures primaires de cellules hypophysaires, le PMA, la forskoline (FSK), le (Bu)₂cAMP, la prostaglandine E₂ (PGE₂) et la choléra toxine augmentent la production d'IL-6 (Spangelo *et al.*, 1990b). La FSK présente un effet similaire dans les agrégats de cellules hypophysaires (Carmeliet *et al.*, 1991).

En plus des modèles pré-cités, la lignée cellulaire TtT/GF a permis d'identifier différents facteurs modulant la libération d'IL-6. La diversité des facteurs est en accord avec la diversité des voies de messagerie intracellulaire qui régulent cette libération. Le CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide), le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) augmentent la libération d'IL-6 par les cellules FS normales et les cellules TtT/GF (Spangelo *et al.*, 1990a ; Tatsuno *et al.*, 1991 ; Matsumoto *et al.*, 1993a). Cet effet passe par l'activation de la voie AMPc/PKA, et le H89, un inhibiteur de la PKA, bloque les effets du PACAP et du CGRP.

Un contrôle intra-hypophysaire pourrait exister puisque l'adénosine augmente la libération d'IL-6 (Ritchie *et al.*, 1997). L'adénosine peut être produite par les cellules FS (Yu *et al.*, 1998), mais les mécanismes de sa libération ne sont pas connus. Il est également concevable que de l'adénosine libérée par les cellules endocrines agisse par paracrinie sur les cellules FS. Cette adénosine pourrait provenir du métabolisme de l'ATP présent dans les grains de sécrétion (Chen *et al.*, 1995 ; Nunez *et al.*, 1997).

Système neuroendocrin

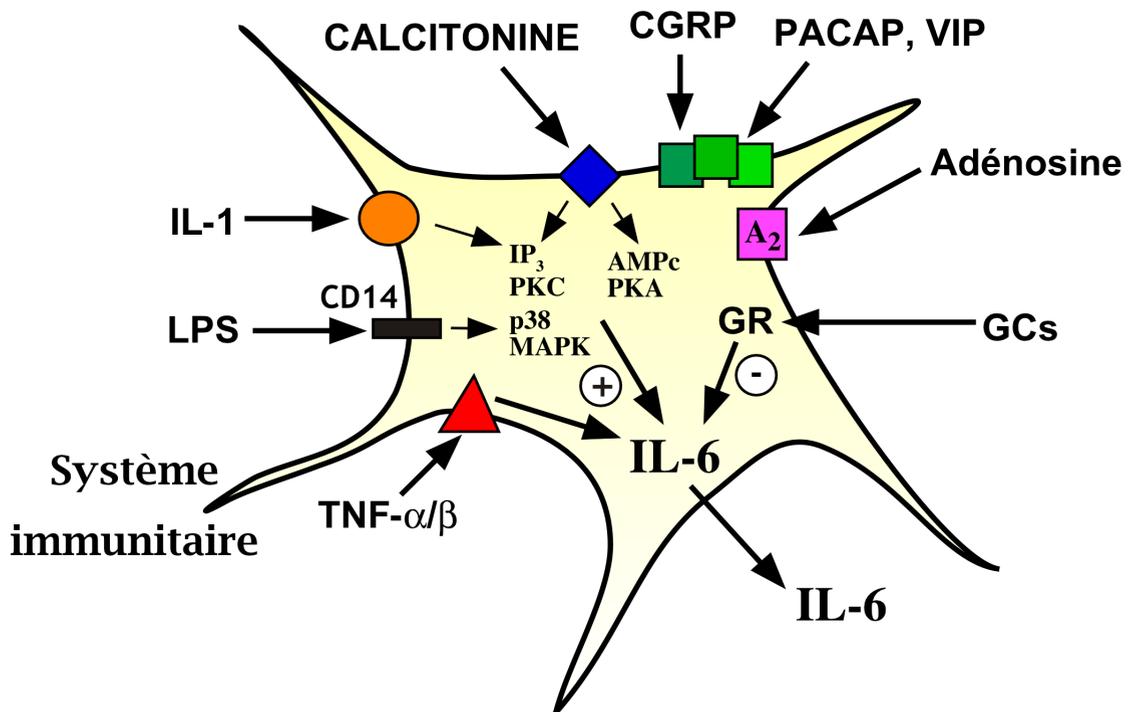


Figure 12: Les différents facteurs modulant la production d'IL-6 par les cellules FS.
(modifié d'après Renner *et al.*, 1998)

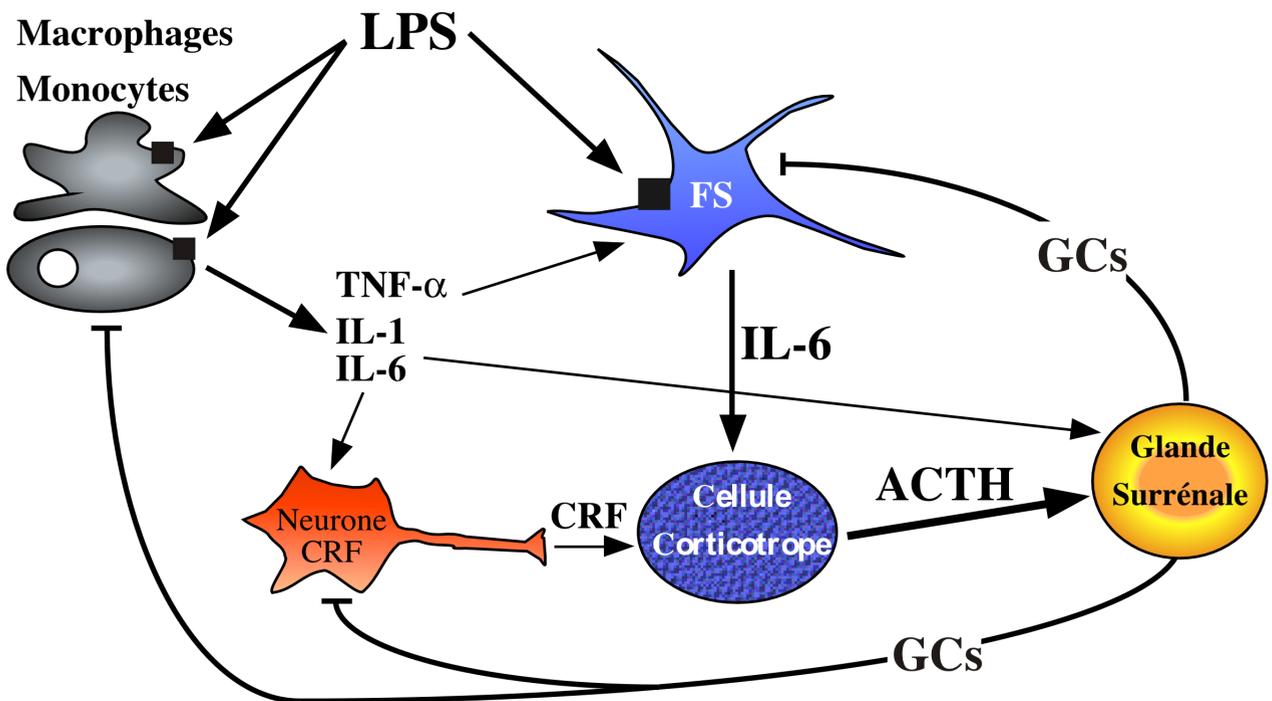


Figure 13: Activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en réponse à une endotoxémie. L'activation par le LPS de la libération d'IL-6 par des cellules FS serait un chemin plus rapide pour induire la libération d'ACTH (modifié d'après Renner *et al.*, 1998).

La calcitonine (CT), une hormone produite principalement par les cellules parafolliculaires de la thyroïde induit également la production d'IL-6 par la lignée TtT/GF, pour une concentration supérieure à 100nM (Kiryama *et al.*, 2001).

La libération d'IL-6 est également modulable par des facteurs d'origine immunitaire. L'IL-1 β , produite par les macrophages et les monocytes, stimule la libération d'IL-6 *in vitro* (Spangelo *et al.*, 1991a). L'effet de l'IL-1 β passe par l'activation de la voie IP₃/DAG (Spangelo *et al.*, 1991a ; Spangelo et Jarvis, 1996), et par la production d'acide arachidonique (Spangelo *et al.*, 1991b). Il a également été démontré que les cellules TtT/GF possèdent des sites de liaison pour le Tumor Necrosis Factor (TNF), et que le TNF- α et le TNF- β sont capables de stimuler la libération d'IL-6 (Kobayashi *et al.*, 1997), par des mécanismes encore inconnus. Les glucocorticoïdes (GCs) ont un effet inhibiteur sur la production d'IL-6, dans les cellules FS normales et les cellules de la lignée TtT/GF (Carmeliet *et al.*, 1991 ; Lohrer *et al.*, 2000).

Le mode d'action du lipopolysaccharide (LPS) bactérien sur la production d'IL-6 par les cellules hypophysaires est encore flou. Injecté chez l'animal, il augmente l'expression de l'ARNm de l'IL-6 dans l'hypophyse (Muramami *et al.*, 1993). Mais *in vivo*, cette endotoxine active également le système immunitaire en stimulant la libération de TNF- α , d'IL-1 et d'IL-6 par les macrophages et les monocytes. Une stimulation directe de la production d'IL-6 par les cellules TtT/GF vient d'être mise en évidence (Lohrer *et al.*, 2000). Comme dans les cellules du système immunitaire, les GCs inhibent la libération d'IL-6 induite par le LPS dans les cultures de cellules TtT/GF.

L'IL-6 peut jouer de multiples rôles dans l'hypophyse. Une étude a montré la présence de sites de liaison pour l'IL-6 sur tous les types cellulaires (Ohmichi *et al.*, 1991), mais la présence des récepteurs n'a pas été étudiée par hybridation *in situ* ou par immunomarquage. L'IL-6 se fixe sur un récepteur de haute affinité (IL-6R) et l'ensemble va s'oligomériser avec la protéine gp130, essentielle à la transduction du signal. La gp130 fait partie du complexe

récepteur de nombreuses cytokines (Kishimoto *et al.*, 1994). L'IL-6 stimule la croissance de la lignée TtT/GF (Renner *et al.*, 1997) et celle des cellules endocrines tumorales (Arzt *et al.*, 1993 ; Sawada *et al.*, 1995). Elle semble par contre avoir un effet anti-prolifératif sur les cellules endocrines normales (Arzt *et al.*, 1993).

Sur des cellules en culture primaire, l'IL-6 stimule la sécrétion d'ACTH, de GH, de PRL de LH et de FSH (Spangelo *et al.*, 1989 ; Yamaguchi *et al.*, 1990) à de très faibles concentrations, de l'ordre de la dizaine de picomolaires. L'IL-6 inhibe partiellement l'effet de la DA, mais potentialise l'effet de la TRH sur la sécrétion de PRL et potentialise également l'effet du GRF sur celle de GH (Spangelo *et al.*, 1989). Ces effets ne passent pas par une modification de la concentration intracellulaire en AMPc. L'IL-6 stimule également l'expression de la POMC dans les tumeurs corticotropes humaines (Páez-Pereda *et al.*, 2000). Enfin, l'IL-6 augmente la concentration basale en Ca^{2+} ainsi que l'amplitude des oscillations calciques spontanées dans des cellules gonadotropes en culture primaire (Masumoto *et al.*, 1991). En revanche, L'IL-6 étant dépourvue d'effet dans des cellules gonadotropes purifiées, cet effet semble indirect et met vraisemblablement en jeu des interactions paracrines.

La perspective la plus intéressante concerne le rôle de la production d'IL-6 par les cellules FS dans l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticotrope au cours d'une endotoxémie. L'activation de cet axe suite à une injection de LPS est décrite comme le résultat d'une action directe des cytokines libérées par les macrophages et les monocytes sur les neurones à CRF, les cellules corticotropes et les cellules de la glande surrénale (Turnbull *et al.*, 1998 ; Bethin *et al.*, 2000). Un autre mécanisme d'interaction entre système immunitaire et système endocrine peut être proposé (figure 13), dans lequel le LPS induit directement la libération d'IL-6 par les cellules FS, IL-6 qui stimule fortement la libération d'ACTH *in vivo* (Lyson and McCann, 1992). L'ACTH augmente la production de GCs qui répriment l'activité du système immunitaire. Cette voie supplémentaire d'interaction entre système immunitaire et système endocrinien permettrait donc une induction plus rapide des

mécanismes qui contrebalanceraient l'activation du système immunitaire, afin d'en éviter la suractivation et les effets nocifs associés, comme un choc septique.

2.2. Leukemia Inhibitory Factor (LIF)

La libération d'un facteur inhibant la prolifération de cellules endothéliales de l'aorte par les cellules FS de bœuf en culture a été démontrée par Ferrara *et al.* (Ferrara *et al.*, 1992). Ce facteur, identifié comme étant le LIF, est également produit par d'autres types cellulaires (TSH, LH, ACTH, GH). Le LIF présente deux variants issus d'un épissage alternatif, l'un qui reste associé à la matrice extracellulaire, l'autre qui est diffusible. L'ARNm de la forme diffusible, ainsi que celui du récepteur au LIF, absent dans les hypophyses non stimulées, est largement détecté après injection intra-péritonéale de LPS *in vivo* (Wang *et al.*, 1996). La quantité de messenger est réduite en présence de dexaméthasone (Carter, 1995). Comme pour l'IL-6, la protéine gp130 est nécessaire à l'action du LIF. Dans les cellules hypophysaires de souris en culture, le LIF augmente la sécrétion d'ACTH (Stephana *et al.*, 1996). Dans les cellules AtT20, le LIF stimule l'expression de la POMC et la libération d'ACTH basale ou induite par le CRF (Ray *et al.*, 1996). Chez les souris déficientes en LIF, les réponses hormonales au stress ou à l'IL-1 sont diminuées (Chesnokova *et al.*, 1998 ; Akita *et al.*, 1995 ; Auernhammer *et al.*, 1998), ainsi que les réponses à une infection (Chesnokova *et al.*, 2000). Le rôle du LIF dans le contrôle de la sécrétion hormonale et la croissance cellulaire est de mieux en mieux connu, mais la participation des cellules FS dans ces mécanismes n'est pas démontré.

Deux modèles d'animaux transgéniques surexprimant le LIF ont démontré le rôle du LIF dans le développement hypophysaire. Dans les hypophyses de souris surexprimant le LIF sous contrôle du promoteur de la GH, Akita *et al.* (Akita *et al.*, 1997) ont observé un phénotype hypophysaire immature, avec un doublement du nombre de cellules corticotropes, une forte réduction du nombre de cellules somatotropes (40 %) et lactotropes (26 %). Chez les

animaux surexprimant le LIF sous contrôle de la sous-unité glycoprotéique α , sous-unité commune à la LH, la FSH et la TSH, l'expression du facteur de transcription Lhx-3 est fortement réduite (Yano *et al.*, 1998). Ce facteur de transcription étant nécessaire à la différenciation des cellules gonadotropes, lactotropes, somatotropes et thyrotropes (Sheng *et al.*, 1996), la surexpression du LIF réoriente en partie la différenciation des cellules épithéliales de la poche de Rathke vers un lignage indépendant de Lhx-3, le lignage corticotrope. Or, dans ces deux modèles, de nombreuses cavités cystiques dérivées de la poche de Rathke sont présentes. Il s'agit de larges invaginations de la fente hypophysaire, bordées de cellules exprimant la protéine S-100, des cytokératines, mais aucune hormone hypophysaire. Chez l'Homme, ces cavités sont également présentes et bordées de cellules exprimant fortement le LIF (Akita *et al.*, 1997). La surexpression du LIF semble donc augmenter la prolifération de cellules FS en plus de celle des cellules corticotropes. Ces données sont un argument de plus en faveur d'une origine hypophysaire des cellules FS, origine qui serait indépendante du facteur de transcription Lhx-3, comme pour les cellules corticotropes.

2.3. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Le VEGF a été isolé simultanément par Ferrara et Henzel (Ferrara et Henzel, 1989) et Gospodarowicz *et al.* (Gospodarowicz *et al.*, 1989), à partir d'une culture « virtuellement pure » (99%) de cellules FS de bœuf. Le gène du VEGF a ensuite été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cellules FS de bœuf (Leung *et al.*, 1989). Les cellules FS sont les seules cellules produisant le VEGF dans l'hypophyse normale ovine (Jabbour *et al.*, 1997), mais il est faiblement exprimé dans les cellules thyrotropes de rat (Fan and Iseki, 1998) et dans les cellules GH3 (Vidal *et al.*, 2000). L'expression du VEGF est plus importante au niveau de la *Pars Tuberalis*. Il est également produit par les cellules corticotropes dans les adénomes hypophysaires (Yamamoto *et al.*, 1999). Le VEGF est connu comme ayant un fort pouvoir

mitogène sur les cellules endothéliales. Il modifie la perméabilité vasculaire, et il joue un rôle prédominant dans l'angiogenèse normale ou tumorale (Ferrara and Alitalo, 1999). Le rôle précis du VEGF dans l'hypophyse n'est pas connu. Le récepteur du VEGF (flt-1) est présent sur les cellules endothéliales hypophysaires, et son niveau d'expression est identique après déconnexion hypothalamo-hypophysaire (Jabbour *et al.*, 1997). Le flux sanguin et la perméabilité vasculaire hypophysaire semblent donc soumis à un contrôle local. Le PACAP et l'IL-6 stimulent la libération de VEGF par les cellules hypophysaires en culture (Gloddek *et al.*, 1999). Dans la lignée TtT/GF, le TGF- α , l'IGF-1 et l'octreotide, un analogue de la somatostatine, stimulent également cette production (Lohrer *et al.*, 2001). Dans les deux modèles, les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur (Gloddek *et al.*, 1999 ; Lohrer *et al.*, 2001). Comme pour l'IL-6, il semble ne pas y avoir de stockage de VEGF dans les cellules TtT/GF, mais une synthèse *de novo* après stimulation.

2.4. Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)

La libération de bFGF (également appelé FGF-2) par les cellules FS a été démontré sur cellules en culture (Ferrara *et al.*, 1987a). La présence de la protéine au sein du tissu a été confirmée par immunocytochimie, avec une expression majoritaire dans les cellules FS (Amano *et al.*, 1993). Les cellules lactotropes et thyrotropes sont les principales cibles du bFGF. Le bFGF potentialise la sécrétion de TSH et de PRL induite par la TRH (Baird *et al.*, 1985). Il augmente également la sécrétion de PRL par les cellules GH₃, sécrétion accompagnée d'une accumulation de l'ARNm de la PRL, mais pas de la GH (Mormede and Baird, 1988). Les cellules FS semblent également être les médiatrices de l'effet potentiateur du TGF- β 3 sur la prolifération des cellules lactotropes induite par les oestrogènes chez les rats Fischer-344. Dans ce modèle, le TGF- β 3 est dépourvu d'effet en absence de cellules FS, mais induit la libération de bFGF par celles-ci, bFGF qui stimule la prolifération des cellules lactotropes *in vitro* (Hentges *et al.*, 2000a). Le bFGF, par son effet angiogénique, pourrait

également influencer le développement de la vascularisation hypophysaire (Schechter *et al.*, 1993).

2.5. Transforming Growth Factor-1 (TGF- β 1)

La présence des messagers du TGF- β 1, ainsi que de son récepteur de type II (TGF- β RII) a été montrée sur la lignée TtT/GF et sur des cellules FS isolées par « Laser Capture Microdissection » (LCM) (Jin *et al.*, 2001). Il est également exprimé dans les cellules endocrines (Qian, 1996). Le TGF- β 1 stimule la prolifération des cellules FS en culture primaire et de la lignée TtT/GF. Il régule positivement l'expression de la leptine dans les cellules FS natives, mais négativement dans la lignée (Jin *et al.*, 2001). Les origines de cette différence de régulation ne sont pas connues.

Le TGF- β 1 inhibe la prolifération des cellules lactotropes *in vitro* induite par l'oestradiol. Il a donc une action opposée à celle du TGF- β 3, mais son effet sur les cellules lactotropes semble direct (Hentges *et al.*, 2000b). Il a également un effet inhibiteur à long terme sur la synthèse de PRL, et, à court terme, un effet inhibiteur direct sur le processus sécrétoire (Coya *et al.*, 1999).

2.6. Activines et follistatine

La fonction gonadotrope est en partie régulée par les activines, les inhibines et la follistatine, des membres de la superfamille des TGF- β . Découvertes dans le fluide folliculaire ovarien (Ling *et al.*, 1986 ; Vale *et al.*, 1986), elles sont également synthétisées dans l'hypophyse (Meunier *et al.*, 1988 ; Roberts *et al.*, 1989). L'activine joue le rôle de régulateur positif de la synthèse et de la libération de FSH, ainsi que du nombre de cellules produisant cette hormone. La follistatine possède l'effet inverse (Ueno *et al.*, 1987) grâce à sa capacité de liaison à l'activine avec une haute affinité et une faible réversibilité (Nakamura *et al.*, 1990). La majorité de la follistatine circulante est liée à l'activine, ce qui implique un rôle

prédominant de la follistatine produite au niveau hypophysaire dans la régulation directe de la prolifération des cellules gonadotropes et de la sécrétion de FSH induite par l'activine (McConnell *et al.*, 1998). Besecke *et al.* ont d'ailleurs montré qu'au cours du cycle reproducteur chez la ratte, la follistatine produite au niveau hypophysaire régule la libération de FSH induite par l'activine (Besecke *et al.*, 1997).

La libération de follistatine par les cellules FS de bœuf en culture a été démontrée par Gospodarowicz et Lau (Gospodarowicz and Lau, 1989). Les ARNm sont présents essentiellement dans les cellules gonadotropes et FS (Kaiser *et al.*, 1992). Le rôle de la follistatine dans les interactions paracrines entre cellules FS et cellules gonadotropes a été étudié par Katayama *et al.* sur des cultures primaires enrichies (Katayama *et al.*, 1992). Un milieu conditionné de cultures primaires enrichies en cellules FS réduit la prolifération des cellules gonadotropes induite par l'activine A. Cet effet est neutralisé par un anticorps anti-follistatine. La libération de follistatine par les cellules FS intervient également dans la régulation de la libération de FSH par le PACAP (Katayama *et al.*, 2000). Sur les cellules en culture primaire statique, le PACAP n'a que peu ou pas d'effet sur la sécrétion de FSH (Hart *et al.*, 1992 ; Perrin *et al.*, 1993). Cet effet stimulateur est largement accru quand les cultures sont périfusées (Tsuji *et al.*, 1994), ainsi que dans les cultures à faible densité, suggérant qu'un facteur inhibant la sécrétion de FSH est libéré en réponse au PACAP. Les expériences de co-cultures décrites précédemment ont été reprises avec cette fois des milieux conditionnés de cellules TtT/GF pré-traitées au PACAP. Des résultats identiques à ceux de la première étude ont été obtenus, y compris l'immuno-neutralisation de la follistatine. Le PACAP stimulerait donc la libération de follistatine par les cellules TtT/GF. Les cellules FS ne seraient pas la cible hypophysaire unique du PACAP dans la régulation de la fonction gonadotrope, puisque ce neuropeptide stimule également l'expression du gène de la follistatine dans la lignée de cellules gonadotropes α T3-1 (Winters *et al.*, 1997).

Les travaux de Bilezikjian *et al.* (Bilezikjian *et al.*, 1998) montrent que l'action inhibitrice de l'IL-1 β sur la sécrétion de FSH induite par l'activine-A passe également par une augmentation de la libération de follistatine par les cellules FS.

Enfin, les cellules de la lignée PDFS, des cellules dérivant d'une tumeur gonadotrope humaine présentant des caractéristiques communes avec les cellules FS (expression de la protéine S-100...), expriment le gène de la follistatine et de l'activine A (Danila *et al.*, 2000).

2.7. Insulin-like growth factor (IGF-1)

Une seule publication relate la présence d'IGF-1 dans les cellules FS chez le rat (Bach et Bondy, 1992), ainsi que dans les cellules endocrines. La GH exerce en grande partie son effet trophique en stimulant la libération d'IGF-1 au niveau du foie. L'IGF-1 exerce un rétrocontrôle inhibiteur sur la synthèse et la sécrétion de GH. Une partie de l'action hypophysaire de l'IGF-1 pourrait passer par une action *via* les cellules FS. La seule action connue de l'IGF-1 sur les cellules FS est la stimulation de la libération de VEGF par les cellules TtT/GF (Lohrer *et al.*, 2001), mais le rôle du VEGF dans l'hypophyse demeure obscur.

2.8. Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant (CINC)

Il s'agit d'une cytokine de la famille de l'IL-8, qui joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire (Watanabe *et al.*, 1989a, 1989b). Il est présent dans moins de 5% des cellules hypophysaires de rat (Koike *et al.*, 1994), et il est également libéré par les cellules de la lignée TtT/GF, libération accrue en présence de LPS ou de TNF- α (Zhang *et al.*, 1997). *In vitro*, il stimule les sécrétions basales de GH et de PRL, et inhibe celles de FSH et de LH (Sawada *et al.*, 1994). Son action en tant qu'agent paracrine a été mise en évidence dans des co-cultures de cellules GH₃ et de cellules TtT/GF, au sein desquelles il stimule la libération basale de PRL mais pas celle induite par la TRH (Koike *et al.*, 1997).

La libération de CINC est également stimulée dans les cellules TtT/GF par le Unkei-to, un traitement de la médecine japonaise Kampo (phytothérapie) (Koike *et al.*, 1998a). Ce traitement est utilisé chez la femme dans le traitement de l'insuffisance ovarienne (Koyama *et al.*, 1988), et son effet modulateur sur l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien a été observé chez le rat (Koyama *et al.*, 1991). Le Unkei-to stimule la sécrétion de GH par les cellules GH₃, mais inhibe cette sécrétion quand elles sont cultivées en présence de 1% de cellules TtT/GF. Cette inhibition est bloquée par un anticorps anti-CINC (Koike *et al.*, 1998b). La ou les molécules contenues dans le Unkei-to ne sont pas connues, mais semblent provenir de deux des douze plantes qui entrent dans la composition du Unkei-to, *Evodiae fructus* et *Pinelliae tuber*.

2.9. Monoxyde d'azote (NO)

Les cellules FS expriment deux types de NO synthase, l'une constitutive identique à la forme neuronale (nNOS) (Ceccatelli *et al.*, 1993), l'autre inducible (iNOS) (Vankelecom *et al.*, 1997b). L'activité de la nNOS est hautement régulée par la concentration cytosolique en calcium ($[Ca^{2+}]_i$) (Nathan and Xie, 1994). Dans la lignée Tpit/F1, l'ATP augmente la production de NO, *via* un récepteur de type P2Y couplé à la voie IP₃/PLC (Chen *et al.*, 2000). L'iNOS est exprimée dans une sous-population de cellules FS *in vitro* (20 %), après induction par l'IFN- γ (Vankelecom *et al.*, 1997b) et le TNF- α (Theas *et al.*, 2001). Le NO, vraisemblablement libéré par les cellules FS, est responsable de l'effet de ces cytokines sur l'inhibition de la sécrétion de GH et de PRL (Vankelecom *et al.*, 1997c ; Theas *et al.*, 2001). Le NO, également libéré par les cellules gonadotropes, diminue la libération de LH induite par le GnRH, mais n'a pas d'effet sur la libération basale (Ceccatelli *et al.*, 1993). Il pourrait ainsi agir comme signal de terminaison du pic de sécrétion de LH pré-ovulatoire. De la même manière, le NO inhibe seulement la sécrétion de GH induite par le GRF (Kato *et al.*, 1992). L'effet du NO sur la sécrétion de PRL est plus controversé. Dans des héli-hypophyses

maintenues *in vitro*, il inhibe la sécrétion basale de PRL (Duvilanski *et al.*, 1995), alors qu'il joue un rôle stimulateur sur les cellules lactotropes en culture (Brunetti *et al.*, 1995).

2.10. Lipocortine-1 (LC1)

La lipocortine-1 (LC1), ou annexine-1 est une protéine cytoplasmique liant le calcium et les phospholipides, impliquée dans de nombreux processus cellulaires (Mollenhauer *et al.*, 1997). Les travaux effectués par le groupe de Julia Buckingham ont permis d'identifier la LC1 comme une composante essentielle du rétrocontrôle inhibiteur des glucocorticoïdes sur les sécrétions hormonales hypophysaires. Tous les types cellulaires endocrines de l'hypophyse possèdent des sites de liaison à la LC1 (Christian *et al.*, 1997). De plus, des expériences d'immuno-neutralisation, d'utilisation d'antisens ou de LC1 purifiée ont montré que cette protéine contribue à l'effet inhibiteur des GCs sur la sécrétion d'ACTH (Taylor *et al.*, 1997), de PRL (Taylor *et al.*, 1995a, 2000a), de TSH (Taylor *et al.*, 1995b) et de GH (Taylor *et al.*, 2000b). Les GCs induisent la synthèse *de novo* de LC1 (Taylor *et al.*, 1995b). Au sein de l'hypophyse, la LC1 est essentiellement exprimée par les cellules FS (Traverso *et al.*, 1999). Le mécanisme d'action de la LC1 n'est pas connu. Dépourvue de peptide signal, elle est essentiellement cytoplasmique ou sous-membranaire, mais peut être transloquée vers la face externe de la membrane après stimulation, notamment par les GCs (Taylor *et al.*, 1993, 1995b, 1997 ; Philip *et al.*, 1997).

2.11. Autres facteurs: Leptine, PACAP, SRIF, TIMP.

La présence d'autres facteurs a également été montrée dans les cellules FS natives ou dans les lignées. La leptine et son récepteur sont exprimés dans les cellules FS de rat, dans la lignée TtT/GF (Jin *et al.*, 2001), ainsi que dans les hypophyses humaines (Jin *et al.*, 2000). L'expression de la leptine dans les cellules FS est régulée par le TGF- β 1 (voir plus haut). La leptine régule la libération de gonadotropines dans des héli-hypophyses *in vitro* (Yu *et al.*,

1997a). Le NO semble être un élément-clé dans cet effet (Yu *et al.*, 1997b). Même si le tissu adipeux est la principale source de leptine, la synthèse locale hypophysaire semble importante puisque l'immuno-neutralisation de la leptine circulante n'a pas d'effet *in vivo* sur la sécrétion de gonadotropines (Gonzalez *et al.*, 2000).

Les ARNm du PACAP ont également été observés dans des cellules FS de rat isolées par LCM (Jin *et al.*, 2001). La présence du peptide n'a pas été étudiée, mais il pourrait s'ajouter à la liste des facteurs autocrines/paracrines agissant sur différents types cellulaires hypophysaires. Récemment, la présence d'un autre facteur hypophysiotrope, le SRIF, a été révélée par immunocytochimie dans des cellules antéhypophysaires exprimant la vimentine, qui peuvent correspondre à une sous-population de cellules FS (Chronwall *et al.*, 2000).

Les cellules TtT/GF libèrent aussi le TIMP-II (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-II), facteur qui augmente la survie des cellules de la lignée somatotrope MtT/S (Matsumoto *et al.*, 1993b). Les metalloprotéinases sont des enzymes qui digèrent la matrice extracellulaire, et Paez-Pereda et ses collaborateurs ont montré que la Metalloproteinase-II (MMP-2) pouvait libérer des facteurs de croissance contenus dans cette matrice, influençant ainsi les sécrétions hormonales et la prolifération cellulaire (Paez-Pereda *et al.*, 2000). La MMP-2 est également impliquée dans le remodelage vasculaire. La libération de TIMP-II par les cellules FS laisse donc présager un rôle dans le maintien de l'intégrité tissulaire et un contrôle sur les communications paracrines par modification de l'accessibilité aux facteurs contenus dans la matrice extracellulaire.

2.12. Transport actif : échange d'ions et d'acides aminés

L'influence des cellules FS sur la composition ionique du milieu intercellulaire a été proposée dès la fin des années 70 (voir III 2.4). Dans des cultures mono-couches de cellules FS de bœuf, Ferrara et ses collaborateurs décrivent la formation de dômes résultant d'une pression hydrostatique suite à un transport d'eau et de sels au travers de cet épithélium vers le

côté basal (Ferrara *et al.*, 1986, 1987b). Le côté apical de l'épithélium émet des microvillosités, et semble s'apparenter à la face de la cellule bordant le follicule. La formation de ces dômes dépend en premier lieu du transport de sodium, puisqu'elle est bloquée par l'amiloride du côté apical. Elle l'est également lors de l'application de ouabaine (inhibiteur de la Na⁺-K⁺-ATPase) du côté basal. Le transport actif d'ions est augmenté par stimulation directe de la voie AMPc (Shimada and Nakamura, 1988) ou par des agonistes β -adrénergiques, et semble passer par une excrétion de chlore (Ferrara *et al.*, 1997b). Les cellules stellaires de la PI possèdent les mêmes caractéristiques de transport épithélial, qui peut être stimulé par l'isoproterenol, la prostaglandine E2, la bradykinine et la lysine-vasopressine (Ferrara and Gospodarowicz, 1988).

La question de la modification de la concentration en calcium dans les espaces intercellulaires par les cellules FS est encore en suspens, la présence d'une Ca²⁺-ATPase sur la face externe de la membrane ayant été observée par certains auteurs (Bambauer *et al.*, 1985 ; El-sherif and Bacsy, 1989), mais pas par d'autres (Soji *et al.*, 1991a).

Le transport actif de glutamate semble également possible dans les cellules FS. La libération de glutamate peut avoir lieu par un antiport glutamate/cystine (Pow, 2000). A l'opposé, les cellules FS expriment le transporteur de type GLAST (Berger and Hediger, 2000), qui permet la capture du glutamate. Elles expriment également la glutamine synthétase, qui permet la synthèse de glutamine à partir de glutamate (Shirasawa and Yamanouchi, 1999). La glutamine étant contenue en grande quantité dans les cellules FS (Pow, 1993), on peut supposer que les cellules FS captent le glutamate extracellulaire, modulant ainsi son action sur les cellules endocrines voisines sensibles au glutamate (Villalobos *et al.*, 1996).

Enfin, les cellules FS expriment un transporteur qui permet la capture de différents dipeptides comme la carnosine (β -Ala-His), ou l'un de leurs dérivés fluorescents, le β -Ala-Lys-N_ε-AMCA (AMCA, 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid) (Otto *et al.*, 1996). Il

s'agit d'un transport actif, à la fois Na⁺, H⁺ et ATP-dépendant, qui s'effectue par le transporteur de type PepT2, également présent dans le rein et dans des cellules gliales (Dieck *et al.*, 1999).

3. Modulation de l'activité des cellules FS

3.1. Cytokines et facteurs de croissance

Les cellules FS expriment à leur surface des récepteurs pour plusieurs types de cytokines. La première famille est celle des « cytokines gp130 », qui ont toutes en commun dans leur complexe récepteur cette sous-unité (Kishimoto *et al.*, 1994). Tous ces récepteurs, également appelés « récepteurs des hématopoïétines », activent la voie JAK/STAT. Cette redondance dans les voies de signalisation pourrait expliquer en partie les effets similaires de l'IL-6, de l'IL-11 et du ciliary neurotropic factor (CNTF), qui stimulent la prolifération de la lignée TtT/GF (Renner *et al.*, 1997 ; Perez Castro *et al.*, 2000). Par contre, seules l'IL-6 et l'IL-11 stimulent la libération de VEGF par cette même lignée (Gloddek *et al.*, 1999 ; Perez Castro *et al.*, 2000).

Les cellules TtT/GF sont également sensibles à l'IL-1 β , dans lesquelles elle active le facteur de transcription NF- κ B (Baur *et al.*, 2000). L'expression du récepteur de l'IL-1, qui fait partie de la famille des récepteurs aux immunoglobulines, n'a pas été démontrée dans les cellules FS. Il est donc difficile de savoir si l'effet stimulateur de l'IL-1 β sur la production d'IL-6 par les cellules hypophysaires en culture (Spangelo *et al.*, 1991a) est direct ou indirect.

Les messagers du récepteur p60 (ou p55) du TNF ont été détectés dans les cellules TtT/GF (Kobayashi *et al.*, 1997). Ce récepteur peut lier le TNF- α et le TNF- β (Schall *et al.*, 1990 ; Smith *et al.*, 1990), qui sont tous les deux capables de stimuler la production d'IL-6. Le TNF- α stimule également la libération de CINC (Zhang *et al.*, 1997) et l'expression de la iNOS (Theas *et al.*, 2001). Tout comme l'IL-1 β , il active la voie NF- κ B (Baur *et al.*, 2000).

Des récepteurs de la superfamille des TGF- β sont également présents dans les cellules FS. Le récepteur de type II du TGF- β est exprimé chez le rat et dans les cellules TtT/GF. Les récepteurs de type I et III, nécessaires à la transduction du signal par la voie des protéines SMAD (Massagué, 1996 ; Massagué *et al.*, 2000a, 2000b), n'ont pas été recherchés. Le TGF- β 1 stimule la prolifération des cellules FS (Jin *et al.*, 2001). Ses effets opposés sur la production de leptine dans les cellules normales ou les cellules TtT/GF (Jin *et al.*, 2001) pourraient être dus à des différences dans l'expression des membres de la famille SMAD entre les deux modèles. Les récepteurs de l'activine de type IB et IIB sont exprimés par les cellules PDFS (Danila *et al.*, 2000).

3.2. Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

a. Récepteurs β -adrénergiques

Ces récepteurs sont les premiers à avoir été identifiés dans des cellules FS par Swennen *et al.* (Swennen *et al.*, 1985), à partir de cellules purifiées par gradient de BSA. La fraction 2, majoritairement composée de cellules FS, est celle qui présente la plus forte accumulation d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol. Sur les cultures purifiées de cellules FS de bœuf, l'application d'isoprotérénol, d'adrénaline ou de noradrénaline induit une accumulation d'AMPc (Findell and Weiner, 1988). La fonction de ces récepteurs n'a pas été étudiée, mais il semble que l'effet stimulateur de l'adrénaline sur la sécrétion de GH passe par les cellules FS (Baes *et al.*, 1987a).

b. Récepteurs du PACAP et du VIP

Plus de 90% des cellules FS *in vivo* possèdent des sites de liaison pour le PACAP (PACAP-38 et PACAP-27), ce qui en fait une cible majeure du PACAP dans l'hypophyse (Vigh *et al.*, 1993). Environ 60 % des cellules FS en culture présentent des réponses calciques au PACAP (Yada *et al.*, 1993). Il est plus efficace que le VIP pour stimuler la libération d'IL-

6 dans les cellules FS normales (Tatsuno *et al.*, 1991), ce qui indique la présence du récepteur PAC₁-R. L'expression de ce récepteur dans les cellules FS de rat et les cellules TtT/GF a été confirmée par PCR (Jin *et al.*, 2001). Le PACAP-38, le PACAP-27 et le VIP ont la même capacité à stimuler la production d'AMPc dans la lignée TtT/GF, ce qui suggère que ces cellules expriment, en plus du PAC₁-R, le VPAC₁-R et/ou le VPAC₂-R (Matsumoto *et al.*, 1993a). En plus de son effet sur la libération d'IL-6, le PACAP stimule la libération de VEGF par les cellules FS de rat et les cellules TtT/GF, action qui passe par le PAC₁-R, le VIP n'ayant pas d'effet (Gloddek *et al.*, 1999). Le PAC₁-R est le récepteur prédominant chez la souris, car les cellules FS dans les tranches d'hypophyses de souris déficientes en PAC₁-R (Jamen *et al.*, 2000) ne présentent plus de réponses calciques au PACAP (Kunzelman *et al.*, 2000).

Le PACAP stimule également la prolifération de la lignée TtT/GF (Matsumoto *et al.*, 1993). Ce résultat est contredit dans l'article de Jin *et al.*, qui n'observent aucun effet du PACAP (Jin *et al.*, 2001). Mais dans ces expériences, le PACAP n'induit pas la libération d'IL-6, cytokine qui peut agir de manière autocrine pour stimuler la croissance de la lignée (Renner *et al.*, 1997). La libération d'IL-6 semble donc nécessaire à l'effet prolifératif du PACAP sur les cellules TtT/GF.

Enfin, les cellules FS pourraient être un relais essentiel dans l'action du PACAP sur les sécrétions hypophysaires, action qui semble dépendre d'une communication paracrine. Par exemple, le PACAP stimule la libération de PRL chez la ratte lactante *in vivo*, mais son effet est légèrement inhibiteur *in vitro* (Jarry *et al.*, 1992). Il augmente l'expression des ARNm de la PRL dans les cultures de cellules hypophysaires normales, mais pas dans les cultures enrichies en cellules lactotropes (Velkeniers *et al.*, 1994). Une action indirecte du PACAP sur les cellules FS et la libération d'IL-6 pourraient expliquer en partie ces phénomènes.

c. Effet des peptides de la famille de la calcitonine

Comme mentionné précédemment, la CT induit la production d'IL-6 par les cellules TtT/GF (Kiriyaama *et al.*, 2001). La présence du récepteur de la CT (CTR) de type C1a a été confirmée par RT-PCR, dans des cellules TtT/GF et dans des hypophyses de souris normales. Les voies de signalisation intracellulaire induites par la CT sont complexes. La production d'IL-6 nécessite l'activation de la PKA et de la PKC, *via* les protéines G_s et G_q respectivement. La toxine pertussique (PTX) ne présente pas d'effet sur les productions basales de cAMP et d'IL-6, mais elle potentialise l'action de la CT. La liaison de la CT au CTR conduit donc à l'activation de protéines G de type G_s et G_q d'une part, et G_i/G_o d'autre part. Selon Kiriyaama *et al.*, cette pluralité dans les voies de transduction liées à l'action de la CT pourrait être due à la présence de « Receptor Activity-Modifying Proteins » (RAMPs). Ces protéines, au nombre de 3 (RAMP-1, -2 et -3), sont des protéines à un domaine transmembranaire qui peuvent modifier la glycosylation du CTR ou du « Calcitonin Receptor-Like Receptor » (CRLR) (McLatchie *et al.*, 1998). Par exemple, la présence de RAMP-1 est nécessaire pour que le CRLR se comporte en récepteur du CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide). Or, ce neuropeptide de la famille de la CT a été identifié comme étant capable de stimuler la libération d'IL-6, *via* une augmentation d'AMPc. Le blocage de la PKA par le H89 suffit dans ce cas à inhiber la production d'IL-6 (Tatsuno *et al.*, 1991). La présence du récepteur n'a pas été démontrée.

L'amyline, une autre protéine de la famille de la CT, induit également une augmentation d'AMPc dans les cellules TtT/GF, mais ne modifie pas l'augmentation d'AMPc induite par la CT. Son effet est antagonisé par l'amyline-(8-37), un antagoniste spécifique du récepteur à l'amyline (Kiriyaama *et al.*, 2001). Les cellules TtT/GF expriment sans doute le récepteur de l'amyline, mais son identification n'est pas possible car les RAMPs qui interagissent avec CTR ou CRLR pour former celui-ci ne sont pas identifiées (Christopoulos *et al.*, 1999 ; Tilakaratne *et al.*, 2000). La question de l'identification des RAMPs dans les

cellules FS, et plus généralement l'hypophyse, et d'autant plus intéressante que l'on sait que cette glande synthétise et libère de la CT (Hanna *et al.*, 1995) et des « CT-like peptides » (Hilton *et al.*, 1998). De plus, la concentration de CT circulante (entre 0,02 et 0,1 nM) (Fox *et al.*, 1999) est capable de produire une production d'AMPC mais pas une libération d'IL-6 par les cellules TtT/GF. Ces peptides auraient une action paracrine sur les cellules FS.

d. Récepteurs purinergiques

Purines (ATP, ADP, adénosine) et pyrimidines (UTP et UDP) sont produites dans toutes les cellules et peuvent être co-libérées en même temps que les hormones par les cellules endocrines hypophysaires (Chen *et al.*, 1995 ; Nunez *et al.*, 1997). Elles peuvent agir de manière paracrine *via* des récepteurs de type P1 (adénosine) ou P2 (ATP, ADP, UTP) dont les multiples isoformes sont présentes dans l'hypophyse (Stojilkovic and Koshimizu, 2001).

Sur la base des réponses calciques à l'ATP des cellules de la lignée Tpit/F1 et de leur pharmacologie, la présence de récepteurs purinergiques de type P2Y a été démontrée (Chen *et al.*, 2000). Ces récepteurs sont couplés aux protéines $G_{q/11}$ et activent la voie IP_3/PLC , alors que les récepteurs P2X sont des récepteurs canaux. L'application d'ATP ou d'UTP provoque une réponse calcique biphasique des cellules Tpit/F1 (figure 14). La première phase est due à la mobilisation des stocks de Ca^{2+} intracellulaires. Ces réponses sont bloquées après application de thapsigargine, un inhibiteur de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum endoplasmique, ou de suramine, un inhibiteur des récepteurs P2Y. La deuxième phase est due à un influx de calcium, puisqu'elle n'a pas lieu en absence de Ca^{2+} extracellulaire ou en présence de Gd^{3+} , un bloqueur de canaux calciques. Le blocage de la PLC diminue fortement la réponse. Dans cette même lignée, l'ATP augmente la libération de NO, vraisemblablement *via* l'activation Ca^{2+} -dépendante de la nNOS. Des réponses calciques similaires ont été obtenues sur des cellules FS en culture (Uchiyama *et al.*, 2001).

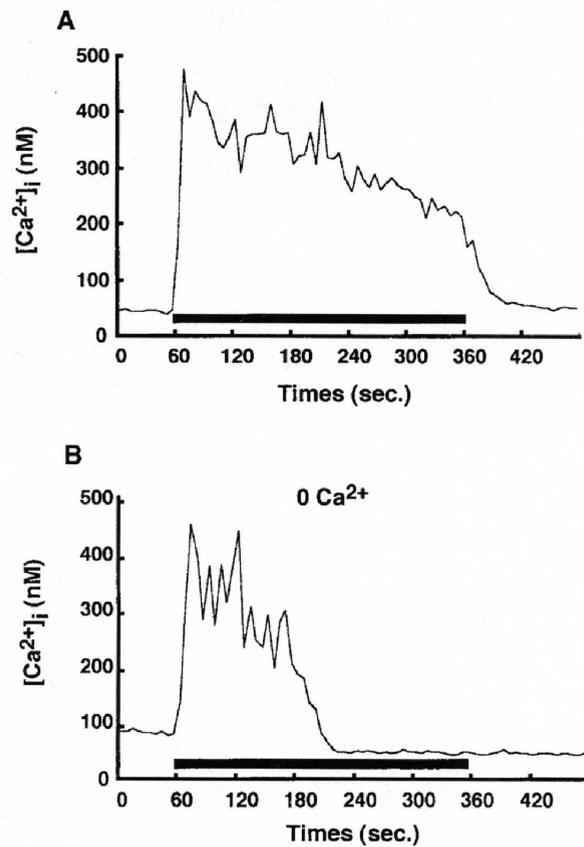


Figure 14 : Réponses calciques biphasiques à une stimulation purinergique dans une cellule Tpit/F1 (d'après Chen *et al.*, 2000).

L'application d'ATP à une concentration de 10 μ M (barre noire) déclenche une augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$ (A) dans une cellule PDFS. La deuxième phase de la réponse est bloquée en présence d'un milieu extracellulaire dépourvu de Ca^{2+} (B).

La présence de récepteurs de l'adénosine n'a pas été démontrée. Cependant, l'adénosine est capable *via* des récepteurs A₂ couplés positivement à l'adénylate cyclase (AC) de stimuler la libération d'IL-6 dans les cultures de cellules hypophysaires (Ritchie *et al.*, 1997). L'adénosine pourrait également stimuler indirectement la sécrétion de PRL en inhibant la production de NO par les cellules FS (Yu *et al.*, 1997). Cette action se ferait par un récepteur de type A₁, couplé négativement à l'AC.

e. Autres stimuli: Angiotensine II, ACh, TSH, Ps4, Cannabinoïdes.

Des réponses calciques à d'autres agonistes de récepteurs ont été observées, notamment à l'angiotensine II qui agit sur les cellules FS en culture (Du *et al.*, 2000). Elles pourraient donc intervenir dans l'effet facilitateur de l'AII sur les sécrétions hypophysaires (Steele *et al.*, 1981).

Les cellules FS en culture sont également sensibles à l'ACh, avec des réponses passant par le récepteur muscarinique de type M₁, réponses ayant les mêmes caractéristiques que celles qui sont induites par l'ATP (Nakajima *et al.*, 2001). Là aussi, les cellules FS pourraient jouer un rôle au sein du système cholinergique intrinsèque à l'hypophyse qui inhibe de manière tonique la sécrétion de GH et de PRL (Carmeliet and Denef, 1988, 1989).

La présence de récepteurs de la TSH dans l'hypophyse a été démontrée chez l'homme. Ces récepteurs sont uniquement localisés dans les cellules FS selon Prummel *et al.* (Prummel *et al.*, 2000), ou dans les cellules FS et les cellules thyroïdiques selon Theorodopoulou *et al.* (Theorodopoulou *et al.*, 2000). Ces derniers résultats suggèrent l'existence d'un rétrocontrôle intra-hypophysaire de la libération de TSH qui mettrait en jeu les cellules FS. Ces données sont d'autant plus intéressantes que les cellules FS sont la cible unique du Ps4 (ou prépro-TRH 160-169), un décapeptide issu du précurseur de la TRH (Valentijn *et al.*, 1998). Ce peptide est présent dans les terminaisons nerveuses de l'éminence médiane (Valentijn *et al.*, 1991), et il est libéré par un processus dépolarisant et Ca²⁺-dépendant par des tranches

d'hypothalamus (Valentijn *et al.*, 1992). Il potentialise la sécrétion de TSH induite par la TRH (Bulant *et al.*, 1990), et augmente l'expression basale des messagers de la TSH et de la PRL (Ladram *et al.*, 1994). D'une manière intéressante, la quantité de ces récepteurs varie au cours du développement. Chez le rat, on observe une légère augmentation au cours des deux premières semaines post-natales, puis une augmentation transitoire au moment du sevrage (Valentijn *et al.*, 1998). La présence de récepteurs de la TSH et du Ps4 dans les FS semble placer ces dernières dans une position importante concernant la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyréotrope et de la plasticité hypophysaire au moment du sevrage.

Dans les hypophyses humaines normales et adénomateuses, les cellules FS expriment les récepteurs CB1 aux cannabinoïdes (Pagotto *et al.*, 2001). Le rôle de ces récepteurs dans la physiologie des cellules FS reste toutefois inconnu.

Enfin, les cellules stellaires du lobe intermédiaire possèdent des sites de liaison au NPY (De Rijk *et al.*, 1991), et reçoivent une partie de l'innervation diffuse de ce lobe (Stoeckel *et al.*, 1981). Elles pourraient jouer un rôle indirect dans l'inhibition par ce neuropeptide de la sécrétion d' α -MSH (De Koning *et al.*, 1991).

3.3. Effet du lipopolysaccharide bactérien (LPS)

L'action du LPS passe par une protéine membranaire CD14 (mCD14), qui lie le LPS seul avec une faible affinité, et le LPS complexé à la LPB (LPS-binding protein) avec une haute affinité (Ulevitch and Tobias, 1995). Une forme soluble de ce récepteur (sCD14) existe également, qui permet une action sur des cellules dépourvues de mCD14 (Golenbock *et al.*, 1995). Le bon fonctionnement de CD14 nécessite la présence d'un autre élément essentiel à la transduction du signal, le « Toll-like receptor-4 » (Tlr4) (Poltorak *et al.*, 1998). La plus grande efficacité du LPS en présence de sérum peut être expliquée par le fait que ce dernier contient à la fois sCD14 et LPB. Le mécanisme d'action du LPS sur les cellules TtT/GF a été récemment décrit (Lohrer *et al.*, 2000). La lignée TtT/GF, ainsi que les hypophyses de souris,

expriment mCD14 et Trl4. Le LPS stimule la production de phosphoinositides, mais n'affecte pas la production d'AMPC. Le mécanisme de cette activation n'est pas connu, mais le domaine intracellulaire de Trl-4 est analogue à celui d'un des récepteurs de l'IL-1 (Medzhitov *et al.*, 1997), dont l'activation dans les cellules hypophysaires déclenche également la production d'IP₃ (Spangelo and Jarvis, 1996). Les étapes suivantes conduisant à la synthèse d'IL-6 sont mieux caractérisées. Le LPS induit une phosphorylation rapide de p38 α -MAPK, qui a son tour phosphoryle I κ B, l'inhibiteur de NF- κ B. Cette phosphorylation induit la dissociation du complexe (Brown *et al.*, 1995) et la libération du facteur de transcription actif NF- κ B, dont le rôle dans la transcription du gène de l'IL-6 au sein du système immunitaire est connu (Baeuerle and Henkel, 1994). Cet effet peut être inhibé par la dexaméthasone, un agoniste du récepteur aux GCs, récepteur connu pour jouer la contrepartie suppressive de NF- κ B dans le contrôle moléculaire des réponses immunitaires (McKay and Cidlowski, 1999). Enfin, la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction des ARNm, abolit totalement la réponse au LPS (Lohrer *et al.*, 2000). Le LPS ne stimulerait donc pas la libération rapide des stocks d'IL-6 pré-existants, mais une synthèse *de novo* de cette cytokine. Ceci est en accord avec le peu de vésicules observées dans les cellules FS et ainsi, leur faible capacité de stockage de produits à sécréter.

3.4. Récepteurs aux glucocorticoïdes et aux oestrogènes

Les cellules FS sont une des cibles hypophysaires de l'action des GCs. Ces derniers ont un effet inhibiteur sur la synthèse d'IL-6 par des cellules hypophysaires en culture (Carmeliet *et al.*, 1991) et des cellules TtT/GF stimulées au LPS (Lohrer *et al.*, 2000). Dans ces deux mêmes modèles, les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur sur la production de VEGF (Gloddek *et al.*, 1999 ; Lohrer *et al.*, 2001). Enfin, ils stimulent la production de LC1 et sa translocation à la face externe de la membrane (Taylor, 1995b), ainsi que la synthèse de la Glutamine Synthétase (Shirasawa and Yamanouchi, 1999). La présence de récepteurs aux

GCs a été observée par immunocytochimie dans des noyaux des cellules FS (Ozawa *et al.*, 1999). La participation des cellules FS dans l'action hypophysaire de GCs peut donc être envisagée.

D'autres récepteurs nucléaires sont présents dans les cellules FS. Il s'agit des récepteurs aux oestrogènes de type α et β (Mitchner *et al.*, 1998). Les estrogènes induisent l'expression de *c-fos* dans des cellules FS *in vivo*, ainsi que dans des cellules lactotropes (Allen *et al.*, 1997). Le rôle des oestrogènes sur les cellules FS n'est pas connu. Toutefois, ces cellules interviennent dans la formation d'adénomes induit par les oestrogènes en stimulant la prolifération des cellules lactotropes *via* la libération de bFGF (Hentges *et al.*, 2000a).

4. Propriétés membranaires des cellules FS : canaux ioniques et jonctions gap

4.1. Expression de canaux ioniques membranaires

La réponse calcique biphasique des cellules FS à l'ATP (Chen *et al.*, 2000 ; Uchiyama *et al.*, 2001) ou à l'ACh (Nakajima *et al.*, 2001) met en jeu une entrée de calcium. Les auteurs de ces études concluent à un influx de Ca^{2+} via des « store-operated channels », car les cellules répondent peu à une dépolarisation par 30mM K^+ . Pourtant, un article de Yada *et al.* (Yada *et al.*, 1993) fait état de telles réponses dans des cellules FS en culture. Les cellules FS pourraient donc exprimer des canaux calciques dépendants du potentiel. La seule étude électrophysiologique effectuée sur des cellules TtT/GF a montré la présence de canaux potassiques dépendants du potentiel. Les courants potassiques sortants ne sont présents que dans des cellules émettant des prolongements et/ou en contact avec d'autres cellules (Yamasaki *et al.*, 1997). Le potentiel de repos des cellules se situe entre -30 et -50 mV, et la résistance d'entrée (R_{in}) varie entre 1 et 5 $\text{G}\Omega$. D'autres types de courants n'ont pas été observés.

Des enregistrements en patch-clamp des cellules stellaires dans des *Pars Intermedia* de Xénope maintenues *in vitro* ont également montré la présence de courants potassiques sortants et entrants. Les cellules stellaires de Xénope ont un potentiel de repos d'environ -90 mV, et une R_{in} entre 200 et 600 M Ω (Borst *et al.*, 1996). Ces résultats sont en accord avec le rôle supposé de ces cellules dans la régulation de la teneur en K^+ du milieu extracellulaire.

Chez le rat, des enregistrements intracellulaires des cellules stellaires ont été effectués (Mudrick-Donnon *et al.*, 1993). Elles ont un potentiel de repos avoisinant les -60 mV, une R_{in} très faible aux alentours de 40 M Ω , et ne présentent pas de conductance activable par des injections de courant. Par contre, une stimulation électrique de la tige pituitaire induit des potentiels post-synaptiques de nature GABAergique et dopaminergique, montrant que l'innervation des cellules stellaires (Stoeckel *et al.*, 1981) est fonctionnelle.

Lors d'enregistrements de cellules stellaires de la PI, la présence dans l'électrode d'enregistrement de neurobiotine (NB) ou de jaune de lucifer (LY), deux traceurs de faible poids moléculaire, a permis d'observer une diffusion de ces molécules vers des cellules voisines. Ces résultats, ainsi que les faibles résistances d'entrée lors des enregistrements, indiquent la présence d'un couplage jonctionnel.

4.2. Communications intercellulaires *via* des jonctions gap.

Les jonctions gap (GJ) sont présentes dans l'hypophyse ainsi que dans de nombreuses glandes endocrines (Munari-Silem and Rousset, 1996). La première observation de jonctions gap dans l'hypophyse a été faite en microscopie électronique, montrant des jonctions gap entre cellules endocrines (Fletcher *et al.*, 1975) et entre cellules FS (Mira-Moser *et al.*, 1975). Fletcher et ses collaborateurs y ont même ajouté la preuve de l'existence d'un couplage électrique. Certaines connexines, constituants protéiques des jonctions gap, sont présentes dans l'hypophyse antérieure, de même que leurs messagers (Meda *et al.*, 1993). La connexine

43 (Cx 43) semble la plus abondante (Meda *et al.*, 1993 ; Yamamoto *et al.*, 1993), mais les connexines 26 et 36 ont également été observées (Meda *et al.*, 1993 ; Belluardo *et al.*, 2000).

La localisation de ces jonctions gap est matière à débat. Les nombreux travaux de microscopie électronique, essentiellement effectués par le groupe de Damon C. Herbert, ont conduit à l'observation de plaques de jonctions gap entre les cellules FS uniquement, et essentiellement au niveau des follicules (figure 15) (Soji and Herbert, 1989 ; Kuruno, 1996).

Les jonctions gap sont présentes à partir du 20^e jour postnatal chez le rat mâle, et à partir du 25^e chez la femelle. Leur nombre augmente jusqu'au 40^e jour où il atteint un plateau (Soji *et al.*, 1990, 1991b ; Soji and Herbert, 1990). Mais ces études ont surtout souligné la grande plasticité de ces structures intercellulaires. Chez le jeune mâle, les injections de LH-RH ou de testostérone accélèrent l'apparition des GJ (Soji *et al.*, 1990), alors que la castration au 5^e jour postnatal en diminue fortement le nombre (Soji and Herbert, 1990). L'effet de la gonadectomie est contrebalancé par l'injection de testostérone, mais pas par du LH-RH, montrant ainsi un contrôle du nombre de GJ par des stéroïdes sexuels. Ce contrôle est important très tôt chez le jeune, puisque la castration au 10^e jour n'a pas d'effet (Nishizono *et al.*, 1993). Les glucocorticoïdes provoquent également un retard dans le développement des GJ.

Chez la femelle, le nombre de jonctions gap entre cellules FS diminue de moitié au cours du diestrus et augmente légèrement entre le proestrus et l'oestrus (Soji *et al.*, 1991). L'ovariectomie n'a pas d'effet, mais un traitement à la testostérone, la progestérone ou l'oestradiol augmente la quantité de plaques observées (Kuruno, 1996). Au cours de la gestation, le nombre de GJ augmente brutalement entre le 17^e et le 19^e jour de gestation, et diminue légèrement jusqu'au 21^e. Au deuxième jour de lactation, ce nombre est revenu à la valeur initiale observée pendant l'oestrus (Soji *et al.*, 1992). Le contrôle des jonctions gap chez la femelle résulte sans doute d'un mécanisme complexe faisant intervenir les stéroïdes sexuels, les estrogènes et la progestérone. La PRL joue également un rôle dans ce phénomène,

puisque chez le vison, l'expression de la Cx 43 varie en fonction des variations saisonnières de cette hormone (Vitale *et al.*, 2001). Au printemps et pendant la lactation, la quantité de Cx43 est plus importante (x 2,5) qu'au cours des autres saisons, où le taux de PRL est bas. Chez le vison, cette connexine est exprimée majoritairement dans les cellules FS.

Par ailleurs, d'autres études ont révélé la présence de jonctions gap non seulement entre cellules FS mais également entre cellules endocrines. La présence *in situ* de la Cx 43 entre cellules FS a été montrée par immunomarquage à l'or, et dans des cellules gonadotropes par immunohistochimie (Yamamoto *et al.*, 1993). Les cellules FS en culture expriment également cette connexine (Morand *et al.*, 1996).

Jusqu'à présent, une seule publication fait état d'un couplage fonctionnel entre cellules FS, mais aussi entre cellules FS et cellules endocrines. En incubant pendant 2 minutes des héli-hypophyse dans un milieu contenant du LY et de la BSA-Texas Red, Morand *et al.* ont observé une diffusion du LY de cellule en cellule jusqu'à 300 μm à partir de la zone de lésion (figure 16) (Morand *et al.*, 1996). La BSA-TR ne pénètre pas dans le tissu, à cause de son poids moléculaire élevé (> 66 kDa). Un immuno-marquage des différentes hormones et de la protéine S-100 a montré que toutes les cellules hypophysaires possèdent des jonctions gap fonctionnelles. Dans ce cas, les principales voies de passage du LY sont les cellules FS, les cellules lactotropes et somatotropes. Des injections de LY dans des cellules en culture primaire ont permis de quantifier le pourcentage de cellules couplées, qui est supérieur à 60 % pour les cellules FS, mais inférieur à 5 % pour les cellules endocrines. Il existerait également un couplage homologue entre cellules FS, ainsi qu'un couplage hétérologue entre cellules FS et cellules lactotropes. Aucun couplage homologue n'a été observé dans ces conditions entre cellules endocrines d'un même type, mais un couplage hétérologue faisant intervenir à la fois cellules FS, cellules lactotropes et un troisième type cellulaire non identifié a été observé. La situation semble différente dans des tranches fraîches d'hypophyse de cobaye. Après injection de LY dans des cellules endocrines, il y a diffusion du traceur dans 47 % des cas (Guérineau

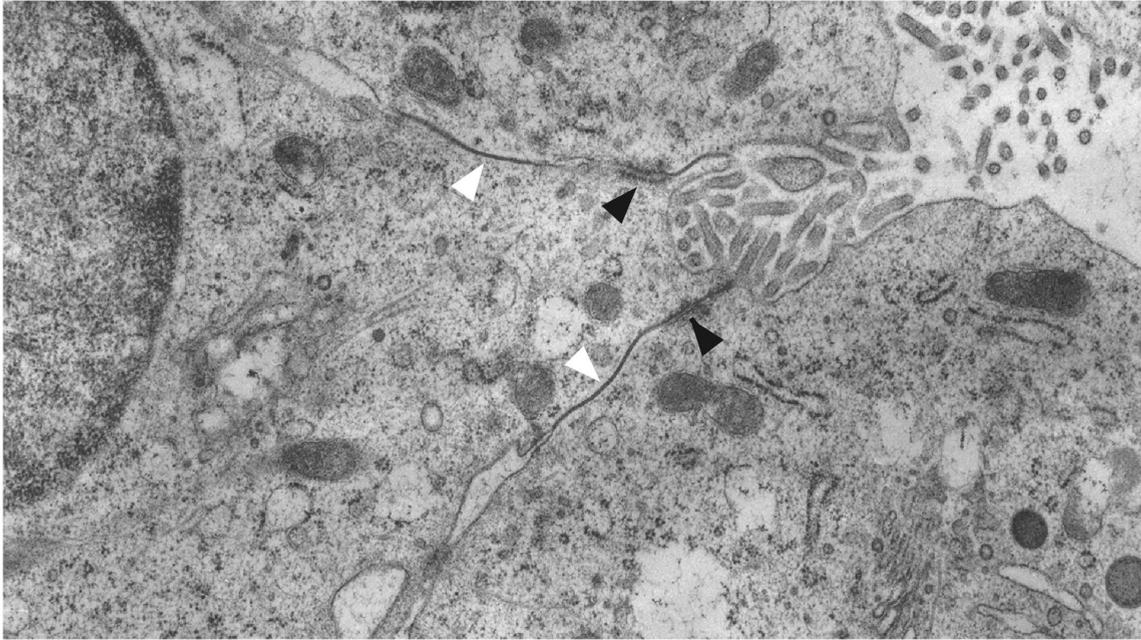


Figure 15 : Jonctions gap entre cellules FS. Des plaques de jonctions gap (pointes de flèches blanches) sont visibles entre cellules FS par microscopie électronique. Elles sont souvent séparées du bord du follicule par des jonctions intermédiaires (pointes de flèches noires) (x 30000) (d'après Soji *et al.*, 1990).

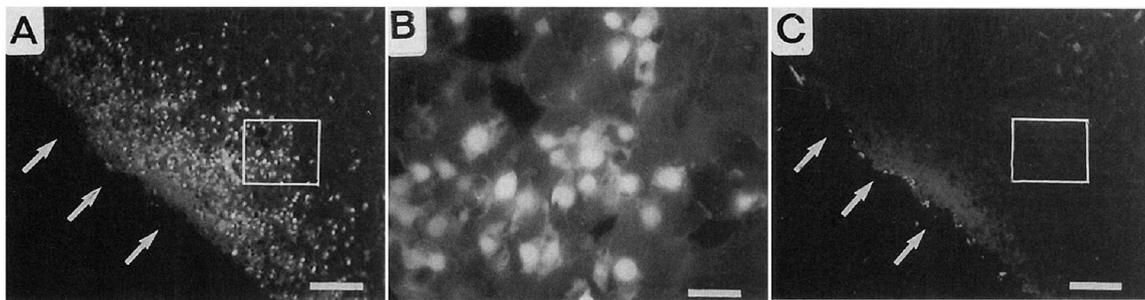


Figure 16 : Fonctionnalité du couplage intercellulaire dans des héli-hypophyses de rat (d'après Morand *et al.*, 1996).

Une hypophyse de rat a été coupée en deux parties avec une lame de rasoir, incubée dans un milieu contenant du LY et de la BSA-TR.

A, Le LY diffuse vers l'intérieur du tissu perpendiculairement au sens de coupe par la lame (indiqué par les flèches)

B, Agrandissement de la région encadrée en A, montrant que le marquage au LY est cytoplasmique et nucléaire.

C, La BSA-TR ne diffuse pas au sein du tissu.

Echelle: 100 μm en A et C, 20 μm en B.

et al., 1998). De plus, le couplage homologue est majoritaire, et concerne essentiellement les cellules somatotropes. Les espèces, modèles et techniques utilisées sont sans doute à l'origine des différences de résultats observées. L'étendue du couplage entre les cellules FS et son rôle *in situ* reste encore à déterminer.

5. Cellules FS et pathologies hypophysaires

L'implication des cellules FS dans les pathologies hypophysaires est encore obscure. Les données les plus probantes concernent leur intervention dans la formation de tumeurs lactotropes induites par les oestrogènes chez les rats Fischer-344, notamment *via* la libération de bFGF comme décrit dans le chapitre VI, 2.4 (Hentges *et al.*, 2000a). Dans ces tumeurs, les cellules FS ont une forte activité phagocytaire (Schechter *et al.*, 1988). L'expression du VEGF est également accrue, et favorise l'angiogenèse de la tumeur (Banerjee *et al.*, 1997). De plus, la présence de cellules FS est nécessaire à la croissance des tumeurs hypophysaires chez les souris « nude » (Koyama *et al.*, 1995).

La présence ou non de cellules FS dans les tumeurs hypophysaires humaines a fait l'objet de nombreux débats. Alors que certains auteurs ont décrit des tumeurs contenant essentiellement des cellules FS (Iwaki *et al.*, 1986), d'autres ont conclu à l'absence de ces cellules (Turpin *et al.*, 1988). Dans des tumeurs sécrétant la GH et la PRL, les cellules FS semblent s'accumuler dans le tissu sain (Höfler *et al.*, 1984a ; Velasco *et al.*, 1982) et dans la zone de transition entre le tissu sain et le tissu tumoral (Marin *et al.*, 1992 ; Farnoud *et al.*, 1994). Les cytokines influencent également la tumorigenèse (Ray and Melmed, 1997). L'IL-6 stimule également la prolifération des cellules tumorales (Artz *et al.*, 1993 ; Sawada *et al.*, 1995). Un modèle a été proposé dans lequel les cellules FS de la zone de transition stimulent la prolifération des cellules tumorales voisines, et leur propre prolifération grâce à la libération d'IL-6 (figure 17) (Renner *et al.*, 1998). Cette prolifération serait d'autant plus

importante que les cellules tumorales sécrètent elles-mêmes l'IL-6 (Jones *et al.*, 1991, 1994 ; Tsagarakis *et al.*, 1992 ; Ueta *et al.*, 1995). L'IL-6 induirait également la production de VEGF (Gloddek *et al.*, 1999), élément essentiel de la néovascularisation de la tumeur (Ferrara and Alitalo, 1999) tout comme le bFGF (Schechter *et al.*, 1993), le TIMP-II (Matsumoto, 1993b) et les gélatinases (Pàez-Pereda, 2000) produits par les cellules FS.

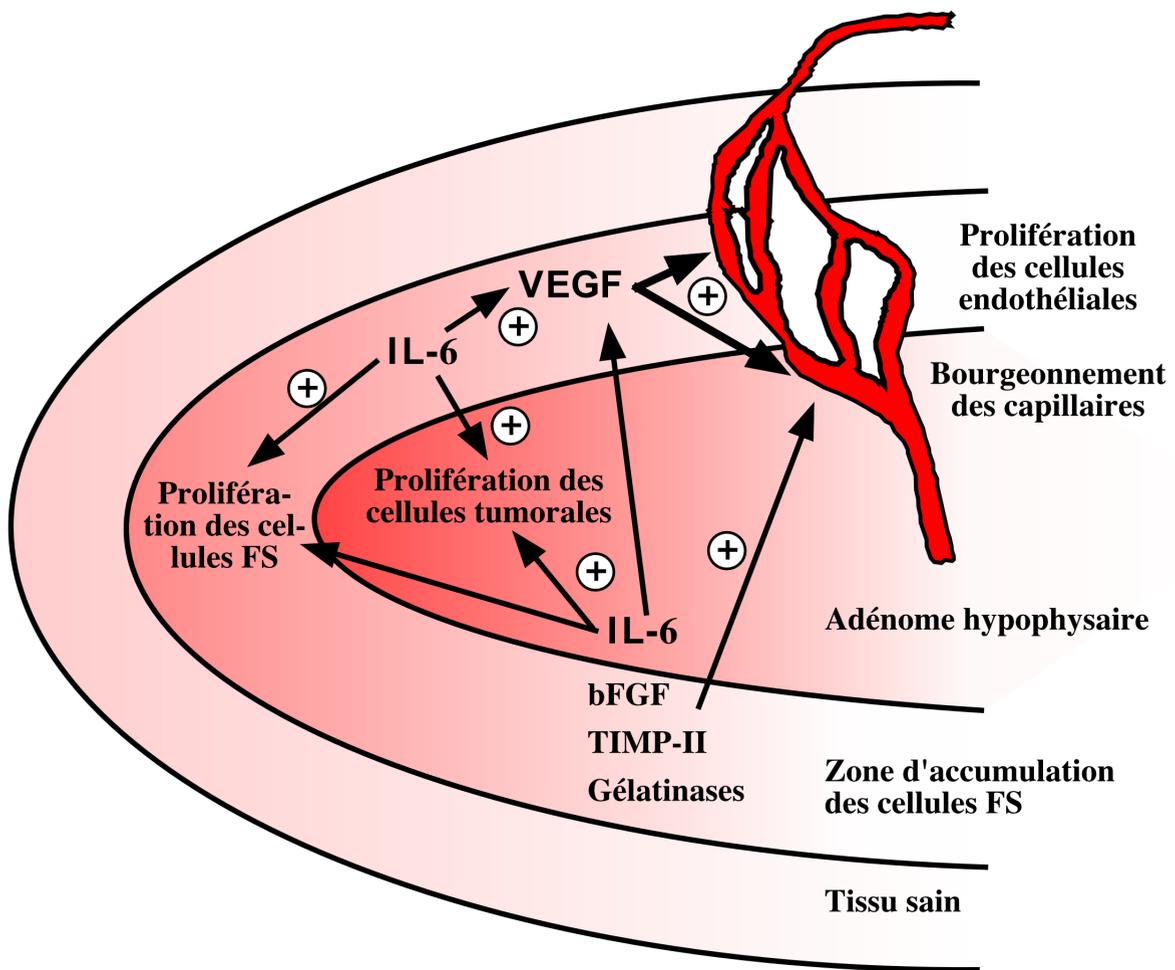


Figure 17 : Schéma hypothétique du rôle des cellules FS dans la formation des adénomes hypophysaires (d'après Renner *et al.*, 1998).

VI. PROBLEMATIQUE

Près d'un demi-siècle après leur découverte, les cellules FS restent à l'évidence le type cellulaire le plus mystérieux de l'hypophyse. De nombreuses études morphologiques ont permis leur description *in situ*. En parallèle, les nombreux travaux d'immunomarquage, d'hybridation *in situ* et d'approche physiologique *in vitro* ont permis de révéler que ces cellules disposent de tout un "arsenal" qui pourrait réguler l'activité (sécrétion, prolifération...) des cellules endocrines. Toutefois, l'absence de données obtenues *in situ* ainsi que la multiplicité des modèles utilisés ne rend pas aisée une vision intégrée du rôle de ces cellules.

L'utilisation de différentes lignées (TtT/GF, Tpit/F1, PDFS) a parfois conduit à des résultats contradictoires par rapport à ceux obtenus sur des cellules FS en culture primaire. Cette ambiguïté de résultats peut être due au fait que certaines de ces lignées ne sont représentatives que d'une sous-population des cellules FS. Citons par exemple la lignée TtT/GF dont l'ensemble des cellules exprime la GFAP (Inoue *et al.*, 1992), alors que cette protéine n'est présente que dans 30% de cellules FS *in vivo* (Tachibana and Yamashima, 1988). Des anomalies génétiques ont également été constatées, comme la présence de 60 chromosomes dans chaque cellule de la lignée PDFS (Danila *et al.*, 2000). Cette instabilité génétique qui résulte sans doute de l'origine tumorale de ces lignées (Farrell and Clayton, 2000) n'incite pas à leur utilisation dans le cadre d'études visant à déterminer le rôle physiologique des cellules FS.

Beaucoup de ces résultats ont également été obtenus hors de tout contexte tissulaire. Seul Carl Deneff et ses collaborateurs ont tenté de recréer un environnement proche de la réalité physiologique en utilisant des agrégats cellulaires. Mais ce modèle présente une distribution anarchique des cellules et l'étude des communications intercellulaires au sein de

ces agrégats est biaisée par l'absence des barrières physiques présentes dans le tissu, comme les lames basales intra-épithéliales et surtout les lames basales péri-cordiales.

Le maintien de l'intégrité tissulaire influence pourtant les mécanismes de transduction des cellules hypophysaires. Ceci a été démontré dans notre laboratoire ces dernières années grâce au développement et à l'utilisation de tranches d'hypophyse fraîchement préparées. Un des phénomènes les plus marquants est la description d'un profil d'activité calcique de type "bouffées" dans les cellules endocrines au sein du tissu (Bonfont *et al.*, 2000). Cette organisation temporelle est nettement moins évidente dans les cellules hypophysaires en culture.

Il est temps maintenant d'aborder l'activité des cellules FS dans une configuration qui préserve au mieux une de leurs principales caractéristiques, c'est-à-dire leur organisation en réseau. La première question qui se pose alors est celle de la réalité fonctionnelle de ce réseau en termes de communications intercellulaires.

Le premier but de cette thèse a été de déterminer s'il existait des mécanismes de communications entre cellules FS *in situ*. La position profonde de l'organe dans la boîte crânienne ne permettant pas une étude aisée *in vivo*, cette étude a été réalisée sur des tranches d'hypophyses de rat fraîchement préparées, modèle qui conserve l'architecture cordonale du tissu (Guérineau *et al.*, 1998). L'utilisation de ces tranches nous a permis d'étudier, dans un environnement proche de la réalité physiologique, les signaux calciques et électrophysiologiques, acteurs importants de l'activité cellulaire, et leurs dynamiques dans le cadre d'une communication cellule-cellule. Dans un second temps, nous avons étudié la dynamique spatio-temporelle de libération de l'IL-6 par les tranches d'hypophyse, afin de déterminer si les modulations de l'activité des cellules FS et des communications au sein du réseau pouvaient influencer sur la production de cette cytokine, élément régulateur important de la physiologie hypophysaire.

MATERIELS
ET
METHODES

1. Préparation de tranches aiguës d'hypophyse antérieure.

Par souci de continuité avec les données de la littérature, nous avons choisi comme modèle l'hypophyse de rat. Des femelles Wistar (Iffa Credo) âgées de 10 à 12 semaines ont été utilisées.

Après décapitation de l'animal, l'hypophyse est rapidement disséquée et refroidie à l'aide de solution physiologique glacée. Elle est ensuite collée sur un support d'agarose rigide lui-même fixé sur la platine d'un vibratome Dosaka DTK-1000. Pour l'utilisation du vibratome Leica VT 1000S, l'hypophyse est incluse dans un gel d'agarose à faible température de fusion permettant d'obtenir un bloc rigide sans provoquer de lésion thermique de la glande. Un soin particulier est apporté à l'exécution rapide de chaque étape ainsi qu'au maintien d'une température basse (1-4 °C) dans la chambre du vibratome. Contrairement à la préparation de tranches de système nerveux où le risque de destruction du tissu par anoxie est omniprésent et oblige à travailler très rapidement à chaque étape, une avancée très lente de la lame du vibratome (entre 10 et 50 $\mu\text{m}/\text{seconde}$) est primordiale pour l'obtention d'une tranche d'hypophyse d'épaisseur constante et de surface propre. L'épaisseur des tranches obtenues varie de 200 à 300 μm (rat), ce qui permet une transmission suffisante de la lumière en microscopie. Les tranches sont maintenues à 37°C, dans une solution de Ringer saturée en O_2/CO_2 et contenant 40 μM de $\beta\text{-Ala-Lys-N}_\epsilon\text{-AMCA}$. Ce dipeptide fluorescent est capturé de manière spécifique par les cellules FS (Otto *et al.*, 1996) grâce à un transporteur de type PepT2 (Dieck *et al.*, 1999), nous permettant ainsi de visualiser et de pré-identifier les cellules FS avant les enregistrements calciques et électrophysiologiques. Le $\beta\text{-Ala-Lys-N}_\epsilon\text{-AMCA}$ nous a été généreusement fourni par le Dr Karl Bauer (Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie, Hannover, Allemagne).

2. Protocoles d'utilisation des sondes calciques fluorescentes.

L'utilisation d'un microscope confocal (Odyssey XL, Noran Instruments Inc.) équipé d'un laser argon/krypton, ainsi que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de l'AMCA ne permettent pas l'utilisation des sondes calciques ratiométriques excitables dans l'ultraviolet telles que le fura-2. Nous avons utilisé des sondes non ratiométriques présentant des spectres d'absorption dans le visible, compatibles avec les raies d'excitation du laser Ar/Kr. Plusieurs sondes ont été testées : Fluo-3, Calcium Green, l'Oregon-Green 488 BAPTA-1. Seul l'Oregon-Green 488 BAPTA-1 a donné des résultats satisfaisants en termes de luminosité, de résistance à la photolyse, et de faible cytotoxicité. Les tranches sont chargées par immersion totale avec la sonde sous sa forme estérifiée (acetoxymethyl ester, AM) pendant 15-30 minutes à 37°C, soit par éjection locale et pulsée (3-4 secondes toutes les 20 secondes) de la sonde *via* une pipette en verre. Pour les mesures combinées des variations de la $[Ca^{2+}]_i$ et des signaux électrophysiologiques, la forme saline (sels de potassium) du Fluo-3 ou de l'Oregon-Green 488 BAPTA-1 a été introduite directement dans la pipette d'enregistrement.

Tous les enregistrements de longue durée présentent une baisse significative du niveau de fluorescence basale due à la fois à la photolyse de la sonde et à sa sortie hors des cellules. Pour augmenter leur lisibilité, ces signaux sont corrigés de cette baisse régulière par un algorithme comprenant une régression linéaire ou monoexponentielle suivant les cas, à l'aide du logiciel Igor Pro 3.14 (Wavemetrics).

3. Stimulations électriques.

Pour les stimulations unicellulaires, une pipette en verre (type pipette de patch) contenant une solution de Ringer tamponnée à l'HEPES et reliée au stimulateur a été posée

sur la cellule. Le signal électrique (0,5 à 10 V, 1 ms) a été déclenché soit manuellement, soit par un signal TTL provenant du microscope confocal permettant la synchronisation avec l'enregistrement des variations de la $[Ca^{2+}]_i$.

Pour les stimulations de champ, nous avons fait passer un courant entre deux électrodes en verre dont la pointe a été cassée et polie à la flamme. Les pointes de ces pipettes, posées sur le tissu, étaient distantes d'environ 70-80 μm . La stimulation (700 μA à 5mA, 25 à 100 ms) a été déclenchée manuellement.

4. Enregistrements électrophysiologiques.

Ces enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés dans la configuration "cellule-entière" de la technique du patch-clamp, grâce à un amplificateur EPC-9 (HEKA Electronics, Lambrecht/Pfalz, Allemagne). Seules les cellules présentant une forte fluorescence AMCA ont été enregistrées. La solution intra-pipette contenait 140 mM de gluconate de potassium, 10 mM de KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 1,1 mM d'EGTA et 5 mM d'HEPES, avec un pH ajusté à 7,2 par addition de KOH. Pour les enregistrements de courant entrant, le gluconate de potassium était remplacé par du $CsCl_2$ en quantité équimolaire, et 10 mM de BAPTA étaient utilisés comme chélateur de calcium. Les signaux enregistrés ont été analysés avec les logiciels Pulse + PulseFit 8.30 (HEKA Electronik) et Igor Pro 3.14 (Wavemetrics).

5. La technique du "Vaseline-gap".

Cette technique a pour but de créer une barrière étanche au milieu d'une tranche d'hypophyse afin de pouvoir en incubé les deux côtés dans des solutions différentes. La tranche est placée dans une chambre à deux compartiments (figure 18). L'étanchéité entre les

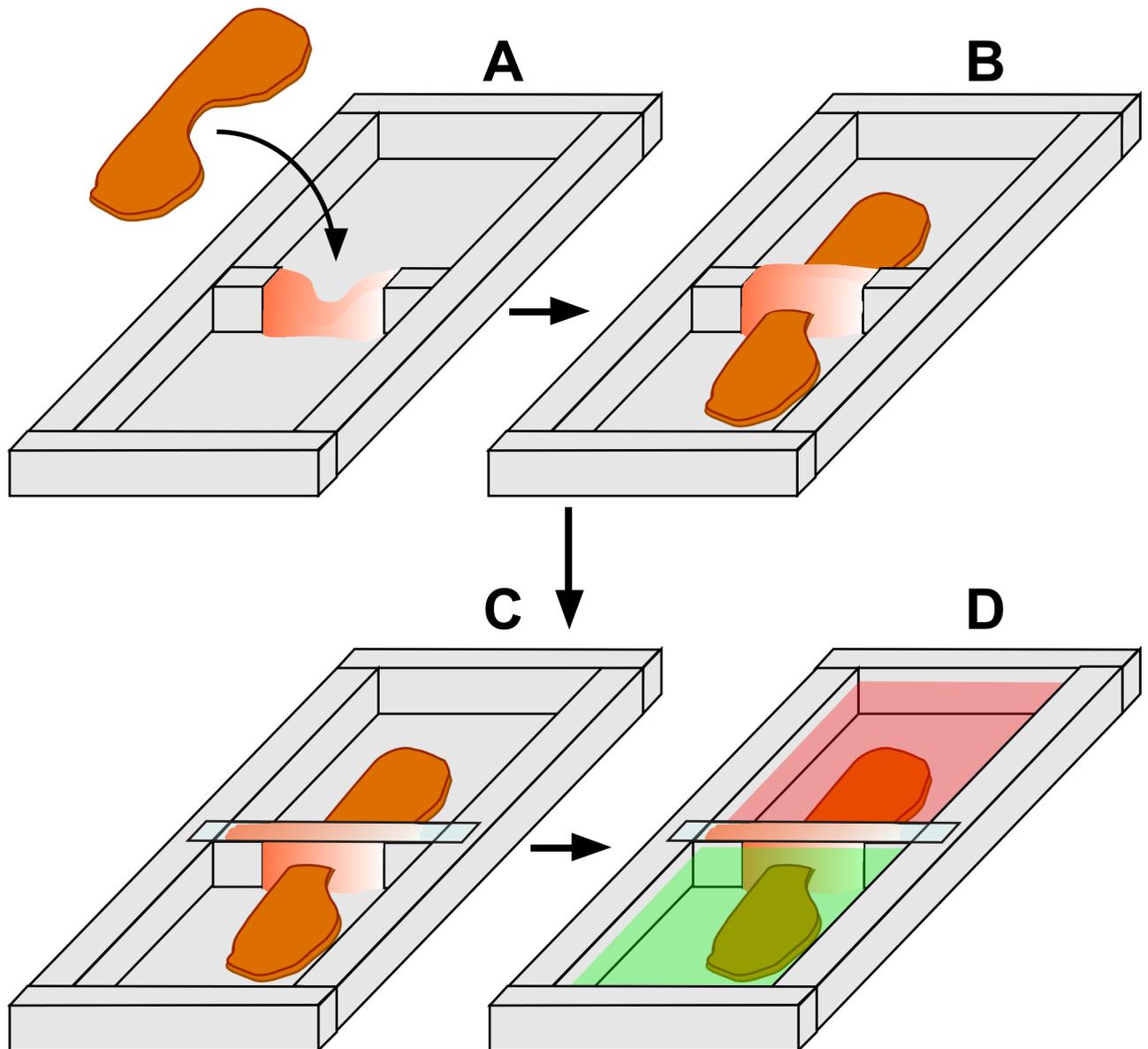


Figure 18 : La technique du "vaseline-gap".

A, Une tranche d'hypophyse est placée sur une couche de vaseline située entre les deux compartiments d'une même cuve.

B, Une deuxième couche de vaseline est déposée sur le centre de la tranche.

C, Une lamelle de verre permet de stabiliser le pont de vaseline.

D, Les deux compartiments sont remplis de solution de Ringer contenant des lectines fluorescentes afin de vérifier l'étanchéité du pont de vaseline.

deux compartiments est réalisée en déposant une couche de vaseline (Monot, Groupe Lipha) de 500 µm de largeur sur et sous la tranche, grâce à une aiguille de 0,40 x 12 mm montée sur une seringue de 1 ml. L'ensemble de la préparation est laissé dans une étuve pendant toute la durée des incubations. Pour les expériences de diffusion du β -Ala-Lys-N_ε-AMCA, des lectines fluorescentes ont été ajoutées aux milieux d'incubation pour vérifier l'étanchéité du pont de vaseline. Pour les dosages d'IL-6, de la ³[H]-carnosine (³[H]- β -Ala-His) (\approx 10000 cpm) a été ajoutée du côté stimulé, et 10 µl de chaque surnageant ont été comptés. La radioactivité du côté opposé n'a jamais dépassé le bruit de fond de l'appareil de comptage (\approx 10 cpm), montrant l'absence totale de fuite. Après 6 heures à l'étuve, un test d'exclusion du Bleu trypan montre que les cellules localisées sous le pont de vaseline ont la même viabilité que les cellules situées sur les côtés. Ces cellules présentent également une activité calcique spontanée normale.

6. Dosages d'interleukine-6.

Les tranches d'hypophyse ont été incubées dans 100 µl de Ringer contenant 1 % de solution d'acides aminés (Gibco BRL) et 1 % de BSA (Boehringer Mannheim). Les surnageants ont été prélevés aux temps indiqués dans les résultats, et remplacés par 100 µl de Ringer à 37°C. L'IL-6 a été dosée grâce à des prêts-à-monter de dosage ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay) (R&D Systems, Minneapolis, MN), en accord avec les instructions du fabricant. Le seuil de sensibilité de ces kits est de 3 pg/ml. Les tranches d'hypophyses ayant des tailles très variables, les quantités d'IL-6 sont exprimées en picogrammes d'IL-6 libérées par mm³ de tissu.

RESULTATS

1. Le réseau de cellules FS forme une route de communication à longue distance dans l'hypophyse antérieure.

Publication :

Folliculostellate cell network: A route for long-distance communication in the anterior pituitary.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 Jul 17 ; **98** (15) : 8891-6.

But de l'étude

L'hypophyse antérieure est dépourvue d'innervation chez les mammifères, et donc à priori de système de communication intra-hypophysaire capable d'acheminer rapidement une information à l'ensemble de la glande. Le réseau de cellules FS, décrit *in situ* de manière essentiellement anatomique, pourrait constituer un tel mécanisme de communication à longue distance. Nous avons donc étudié certains signaux de transduction, en nous focalisant sur les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ et les propriétés biophysiques membranaires des cellules FS, propriétés jusqu'alors inconnues. Le modèle de tranches d'hypophyse nous a permis d'étudier les mécanismes de communication intercellulaire de ces signaux au sein du réseau, ainsi que le couplage métabolique.

Méthodes

Les cellules FS ont été visualisées au sein des tranches d'hypophyse grâce à l'utilisation d'un dipeptide fluorescent, le β -Ala-Lys-N_ε-AMCA. Les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ ont été suivies en temps réel soit par microscopie confocale à balayage laser rapide, soit par imagerie conventionnelle à l'aide du caméra CCD refroidie intensifiée (Pentamax Gen IV, Princeton Instruments). Les enregistrements en patch-clamp dans la configuration cellule entière ont servi à l'étude des événements électriques ainsi qu'à l'introduction dans les

cellules de traceurs diffusibles. Les drogues ont été appliquées soit directement dans le bain, soit par application locale grâce à une pipette d'éjection placée à proximité des cellules. Enfin, la technique du " Vaseline-gap " a permis d'appréhender l'étendue du réseau à l'échelle de la tranche entière.

Principaux résultats

Les cellules FS s'avèrent être des cellules excitables capables de générer des potentiels d'action, résultant de l'action concertée de conductance sodiques, calciques et potassiques. Ces potentiels d'action peuvent générer une élévation transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$ (ou transitoire calcique). Une stimulation électrique locale permet également de déclencher un transitoire calcique, qui peut se propager à des cellules FS voisines à une vitesse moyenne de 124 $\mu\text{m/s}$. Là encore, l'excitabilité membranaire sert de support au déclenchement de cette vague. Ces vagues existent également de manière spontanée (voir chapitre suivant).

La propagation de la vague est fortement diminuée en présence de carbénoxolone (bloqueur de jonctions gap), mais pas par le blocage des récepteurs purinergiques. Même si les cellules FS répondent à l'ATP, l'action paracrine de ce nucléotide n'intervient pas dans la propagation. L'introduction d' IP_3 dans une cellule déclenche également une vague calcique, mais de vitesse plus lente (15 $\mu\text{m/s}$). La présence dans la pipette d'enregistrement d'un traceur de faible poids moléculaire qui diffuse par les jonctions gap révèle un fort couplage intercellulaire et une organisation tridimensionnelle du réseau. L'étendue de ce couplage permet le transfert d'une vague calcique ou de molécules de petite taille sur des distances de l'ordre du millimètre.

Discussion

Les cellules FS, considérées depuis longtemps comme des cellules silencieuses, sont des cellules excitables au même titre que les cellules endocrines. La propagation de vagues

calciques sur une longue distance, vraisemblablement due à la propagation de dépolarisations *via* des jonctions gap, est un nouveau mode de communication à longue distance dans l'hypophyse, en supplément du système sanguin. Ces résultats mettent également en évidence l'importance de l'intégrité tissulaire, sans doute à l'origine des différences observées au niveau des propriétés électriques membranaires, et au niveau du couplage jonctionnel, par rapport aux cellules FS en culture. Cinquante ans après sa découverte, le réseau de cellules FS prend donc une réalité fonctionnelle en termes de communications intercellulaires. L'étude des facteurs pouvant moduler son activité et de son action sur les cellules endocrines devrait procurer de nouvelles pistes d'investigation concernant son rôle qui demeure encore obscur.

Folliculostellate cell network: A route for long-distance communication in the anterior pituitary

Teddy Fauquier*, Nathalie C. Guérineau*, R. Anne McKinney†, Karl Bauer‡, and Patrice Mollard*§

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 469, Centre National de la Recherche Scientifique–INSERM de Pharmacologie–Endocrinologie, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 5, France; †Brain Research Institute, University of Zurich, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zurich, Switzerland; and ‡Max-Planck-Institut für Experimentelle Endocrinologie, Feodor-Lynen-Strasse 7, 30625 Hannover, Germany

Edited by Michael V. L. Bennett, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, and approved May 9, 2001 (received for review July 21, 2000)

All higher life forms critically depend on hormones being rhythmically released by the anterior pituitary. The proper functioning of this master gland is dynamically controlled by a complex set of regulatory mechanisms that ultimately determine the fine tuning of the excitable endocrine cells, all of them heterogeneously distributed throughout the gland. Here, we provide evidence for an intrapituitary communication system by which information is transferred via the network of nonendocrine folliculostellate (FS) cells. Local electrical stimulation of FS cells in acute pituitary slices triggered cytosolic calcium waves, which propagated to other FS cells by signaling through gap junctions. Calcium wave initiation was because of the membrane excitability of FS cells, hitherto classified as silent cells. FS cell coupling could relay information between opposite regions of the gland. Because FS cells respond to central and peripheral stimuli and dialogue with endocrine cells, the form of large-scale intrapituitary communication described here may provide an efficient mechanism that orchestrates anterior pituitary functioning in response to physiological needs.

Classically, the anterior pituitary is considered as a secondary oscillator obeying mainly hypothalamic factors, either increasing or decreasing secretion of pituitary hormones, which are released in an episodic manner at the base of the median eminence (1–4). The portal blood vessels form the interorgan communication system driving the hypothalamic inputs to the anterior pituitary. They collect the transmitters released by hypothalamic nerve endings at the primary capillary plexus level and slowly distribute them in the endocrine parenchyma via the arborescence of pituitary sinusoids between the columnar units of pituitary cells (“cell cords”) (5, 6). Over the last three decades, many studies carried out in isolated endocrine cells have provided strong evidence that endocrine cells generate action potential-driven rises in cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) that are probably the keystones of dynamic adjustment of numerous cellular functions, including exocytosis and gene expression (7–9). Recently, the technique of acute slice preparations applied to the anterior pituitary revealed that endocrine cells do fire short-term $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients because of their electrical activity *in situ* (10, 11).

However, the activity of the gland as a whole does not reflect the average of independent dynamics of cellular messages that occur in the distinct endocrine cell types scattered throughout the tissue. In this respect, one puzzling finding is the persistence of pulsatile releasing profiles of hormones when the gland is disconnected from the hypothalamic inputs (12, 13). This indicates that a large-scale communication system exists *within* the anterior pituitary. Despite the wealth of information on cell-to-cell mechanisms between endocrine cells that comprise the release of paracrine factors (14) and gap junction signaling (10), spreading of spatial information that crosses the limits of single cell cords could not be explained by these mechanisms.

Because a highly efficient process spreading spatial information to the entire gland and even to pituitary subregions has not been reported yet, we explored here whether nonendocrine folliculostellate (FS) cells can support long-distance information

transfer within the gland. FS cells display a star-shaped cytoplasmic configuration intermingled between hormone-secreting cells. The organization of FS cells within the parenchyma forms a three-dimensional anatomical network, in the meshes of which the endocrine cells reside (15, 16). Very little is known about the functioning of this FS cell network, in particular with regard to the dynamics of cellular/intercellular messages. To study the behavior of this network, we measured multicellular changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a messenger involved in a wide range of cell-to-cell communication mechanisms (17–23), electrophysiological properties of FS cells, and intercellular diffusion of dyes in acute pituitary slices. We show here that the FS cell network forms a functional intrapituitary circuitry in which information— Ca^{2+} signals and small diffusible molecules—can be transferred over long distances (millimeter range) within the intact pituitary tissue.

Methods

Cytosolic Ca^{2+} Monitoring in Acute Slices. Pituitary slices (200 μm thick) from 10- to 12-week-old female Wistar rats were prepared as previously described (11). Ringer’s saline contained (in mM): 125 NaCl/2.5 KCl/2 CaCl₂/1 MgCl₂/1.25 NaH₂PO₄/26 NaHCO₃/12 glucose. Slices were incubated with 40 μM β -Ala-Lys-*N*^ε-AMCA, a UV light-excitabile fluorescent dipeptide (AMCA, 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid) taken up by FS cells (24), at 37°C for 1.5 h and then exposed to 15 μM Oregon green 488 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetate (BAPTA)-1 acetoxymethyl ester (Molecular Probes) periodically delivered (3 s per 20 s for 15–20 min) onto a cell field via a blunt micropipette (11). Time-lapse optical sequences were captured with a real-time confocal microscope (Noran Odyssey XL, 488-nm excitation wavelength, 120 images per s with averaging 4 frames), which also delivered a TTL (transistor-transistor logic) signal that synchronized image acquisition with a brief voltage pulse (1 ms, 0.5–10 V) applied to a patch-pipette filled with Ringer’s saline and positioned on the cell (10). Because the confocal microscope was fitted with an Ar/Kr laser (visible light wavelengths), cells at the slice surface were first viewed with a xenon lamp via the epifluorescent port of the upright microscope. Only cells that showed both β -Ala-Lys-*N*^ε-AMCA and Oregon green 488 BAPTA-1 were taken for subsequent $[\text{Ca}^{2+}]_i$ monitoring. In some experiments, electrical field stimulation was used to locally stimulate a cell field. A current step was shortly applied between the tips (50–100 μm apart) of two pipettes (filled with Ringer’s saline) touching the slice

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: FS, folliculostellate; $[\text{Ca}^{2+}]_i$, cytosolic calcium concentration; TTX, tetrodotoxin; TEA, tetraethylammonium; BAPTA, 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetate; AMCA, 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid; IP₃, inositol 1,4,5-trisphosphate.

§To whom reprint requests should be addressed. E-mail: mollard@u469.montp.inserm.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

surface. $[Ca^{2+}]_i$ changes were imaged with an intensified cooled charge-coupled device camera (PentaMAX Gen IV; Princeton Instruments, Trenton, NJ) and acquired with Metafluor (Universal Imaging, Media, PA). Image analysis was carried out with INTERVISION 1.5.1, NIH IMAGE 68K 1.58, IGOR PRO 3.14, and ADOBE PHOTOSHOP 5.0. Pharmacological agents were either superfused or locally applied with a puff pipette.

Patch-Clamp Measurements. Whole-cell electrical events were recorded by using an EPC-9 patch-clamp amplifier (HEKA Electronics, Lambrecht/Pfalz, Germany). Intrapipette solution contained (in mM): 140 potassium gluconate/10 KCl/2 MgCl₂/1.1 EGTA/5 Hepes, pH 7.2 (KOH). Current steps were injected through the pipette tip at the soma level only. When membrane potential measurements were combined with $[Ca^{2+}]_i$ imaging, fluo-3 potassium salt (100 μ M) was included, and EGTA was lowered to 0.2 mM. Lucifer yellow (1 mM, Sigma) or Neurobiotin [*N*-(2-aminoethyl)biotinamide hydrochloride, 1%, Vector Laboratories] was added to the intrapipette solution when appropriate. When inward currents were recorded in voltage-clamp conditions, CsCl replaced potassium gluconate in equimolar amounts, and BAPTA (10 mM) was used as a Ca^{2+} chelator. Only cells with a high input resistance (≥ 1 G Ω), which provided acceptable space-clamp conditions, were recorded with the voltage-clamp mode.

Immunostaining. Laminin staining was performed with a polyclonal antibody (Sigma) when the FS cell network had been traced with Neurobiotin (revealed with FITC-labeled avidin D). Samples were examined with a Zeiss LSM 410 confocal microscope. Neurobiotin was visualized with an argon ion laser at 488 nm, and a He/Ne laser, pretuned to 543 nm, was used to image laminin simultaneously. Optical slices of 0.2- μ m intervals with each image averaged were used to improve the signal-to-noise ratio. Dual staining was reconstructed three-dimensionally by using Imaris software (Bitplane, Zurich).

Vaseline-Gap Technique. Coronal slices were placed in a two-compartment chamber so that the two slice sides were bathed in separate compartments. Insulation between compartments was secured by a thin Vaseline (petroleum jelly) bridge surrounding a slice portion of about 0.5 mm in width. One compartment was usually filled with β -Ala-Lys-*N*^e-AMCA-containing Ringer's saline, whereas the other contained peptide-free medium. Incubation for 3 h at 37°C was carried out to achieve intense AMCA fluorescence because of peptide uptake by FS cells. Fluorescent lectins were routinely included in the bathing solutions to check the water-tightness of the Vaseline bridge and to help delineate the bridge borders after slice fixation.

Results

Generation of Calcium Waves Within the FS Cell Network. Experiments were carried out in acute pituitary slices (10) to preserve the framework of the FS cell network. We visualized FS cells by incubating slices with β -Ala-Lys-*N*^e-AMCA, a fluorescent dipeptide that specifically accumulates in FS cells (24) (Fig. 1*a*). In addition, short-term (≤ 15 –20 min) exposure with Oregon green 488 BAPTA-1 acetoxymethyl ester (11) allowed Ca^{2+} dye loading of β -Ala-Lys-*N*^e-AMCA-positive FS cells before loading the neighboring endocrine cells to a detectable threshold (Fig. 1*b*). Voltage from a micropipette touching an FS cell was used to deliver local electrical stimulation (10), whereas multicellular $[Ca^{2+}]_i$ changes were monitored with real-time confocal microscopy. Brief stimulation triggered a fast-peaking $[Ca^{2+}]_i$ rise (time to peak < 1 s), which was conveyed from one FS cell to the next (Fig. 1*c*) (156 of 176 trials, 59 different slices). The apparent velocities of $[Ca^{2+}]_i$ waves (measured from the delays between onsets of $[Ca^{2+}]_i$ rises in FS cell somas located at the same optical

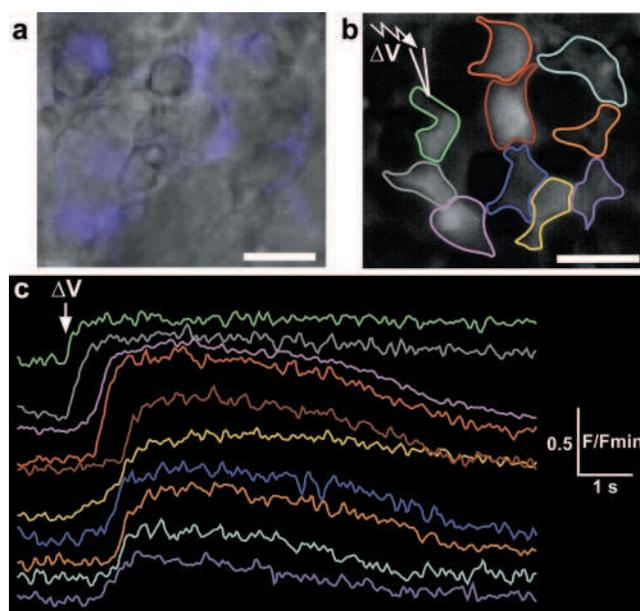


Fig. 1. Generation of propagated $[Ca^{2+}]_i$ waves in FS cells in response to electrical stimulation. (a) Superimposed differential interference contrast microscopy image of the slice surface with β -Ala-Lys-*N*^e-AMCA fluorescence (pseudocolored in blue) of FS cells (scale bar, 10 μ m). (b) A confocal image showing 10 FS cells loaded with a fluorescent Ca^{2+} dye (scale bar, 10 μ m). The color circles highlight the area of each cell used to monitor changes in fluorescence reflecting $[Ca^{2+}]_i$ levels. The stimulating micropipette was touching the cell circled in green. (c) Changes in fluorescence, normalized to baseline fluorescence (F/F_{min}), for the 10 regions in *b*. The spread of a $[Ca^{2+}]_i$ wave was initiated by a brief electrical stimulation. Onset of the stimulation is indicated by an arrow.

plane) were 124 ± 13 μ m/s ($n = 207$ cells, 23 fields). The $[Ca^{2+}]_i$ rises observed in FS cells distant from the site of stimulation resulted from propagated $[Ca^{2+}]_i$ waves. It is highly unlikely that these $[Ca^{2+}]_i$ rises were the result of direct electrical excitation as they did not occur simultaneously, but only when a stimulation was applied through a pipette in contact with an FS cell, and they did not spread uniformly in all directions. Finally, it should be noted that the FS cell network could also work as an autonomous system because $[Ca^{2+}]_i$ waves propagating spontaneously between FS cells at a single plane of focus were occasionally observed during long-lasting optical recordings and in the absence of any stimulation electrode (data not shown).

FS Cell Membrane Excitability Is Responsible for Initiating $[Ca^{2+}]_i$ Waves. Establishing $[Ca^{2+}]_i$ transients in FS cells mostly depends on membrane excitability because tetrodotoxin (TTX, 0.5 μ M), a specific Na^+ channel antagonist, reversibly blocked the $[Ca^{2+}]_i$ transients in FS cells that propagated $[Ca^{2+}]_i$ waves (Fig. 2*a*, 8 of 10 cell fields). Also, Cd^{2+} , a blocker of voltage-gated Ca^{2+} channel currents, completely suppressed both the initial $[Ca^{2+}]_i$ rise and propagated waves (7 of 7 cell fields, data not shown). This result was astonishing because FS cells were previously considered to be silent cells (25). We therefore examined the electrical membrane properties of FS cells with the whole-cell patch-clamp technique. FS cells showed a resting potential of -61 ± 5 mV ($n = 115$) and displayed a remarkably wide range of input resistance (35 M Ω to 4.2 G Ω), which occasionally varied during the time period of recordings. When FS cells had a relatively high input resistance (≥ 1 G Ω), action potentials could be triggered upon step depolarization in 37 of 70 of these cells (Fig. 2*b–d*). In the remainder cells recorded under current-clamp conditions, the spatiotemporal current flow along the

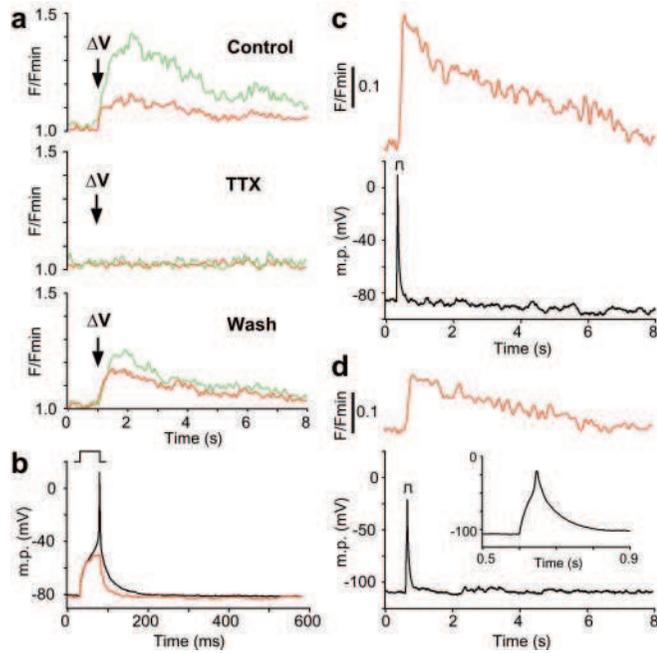


Fig. 2. Generation of $[Ca^{2+}]_i$ transients depends on membrane excitability. (a) Stimulated $[Ca^{2+}]_i$ transients in two adjoining FS cells (red trace: triggered cell) in normal Ringer's saline (Top) and in the presence of $0.5 \mu M$ TTX (Middle) are shown. (Bottom) The TTX-mediated alteration of $[Ca^{2+}]_i$ transients recovered after a 12-min wash. (b) Step current injection triggered an all-or-none action potential (black trace), which was suppressed in the presence of $0.5 \mu M$ TTX (red trace). (c) Current-clamp recording of a single action potential triggered upon current step (Lower) that caused a transient rise in $[Ca^{2+}]_i$ (Upper). (d) Similar combined electrical and optical recordings in a TTX-treated cell. (Inset) The TTX-resistant spike on expanded time scale.

processes might not have been strong enough to generate ectopic action potentials (23), as most FS cells emit prolonged cell processes with distal "end-feet" (16). TTX consistently suppressed the fast component of action potentials (Fig. 2*b*). Smaller spikes, however, were observed in some TTX-treated cells (Fig. 2*d*). Both types of action potential were able to induce a transient $[Ca^{2+}]_i$ rise when patch-clamp recordings were simultaneously combined with $[Ca^{2+}]_i$ imaging (Fig. 2*c* and *d*, 10 of 15 cells).

As the initiation of $[Ca^{2+}]_i$ waves most probably depended on action potential firing, we characterized the voltage-gated conductances expressed in FS cells. When K^+ currents were blocked by Cs^+ dialysis through the patch-clamp pipette, a fast-activating, fast-inactivating TTX-sensitive inward Na^+ current was measured in 27 of 43 cells (Fig. 3*a*). In 51 of 84 cells recorded in the presence of both TTX and Ba^{2+} ions, step depolarization triggered voltage-gated inward currents flowing through Ca^{2+} channels that were abolished by Cd^{2+} ions (Fig. 3*b*). It should be noted that the activation threshold of Ca^{2+} currents corresponded to the threshold of TTX-resistant spikes (Fig. 2*d*). Besides the voltage-dependent switch-off of both Na^+ and Ca^{2+} currents, spike repolarization probably involved K^+ currents in FS cells because Ba^{2+} ions, a strong K^+ channel blocker, markedly prolonged action potential duration (100 ± 4 ms calculated at 50% of spike repolarization, 4 of 9 cells, data not shown). In over 57 cells recorded in the presence of Ringer's saline, step depolarization could trigger at least two distinguishable outward currents, which both were most likely carried by K^+ ions (mean reversal potential: -74 ± 3 mV); 86% of cells showed a delayed outward K^+ current (mean activation threshold: -25 ± 0.3 mV) (Fig. 3*c*), which was suppressed by 15 mM

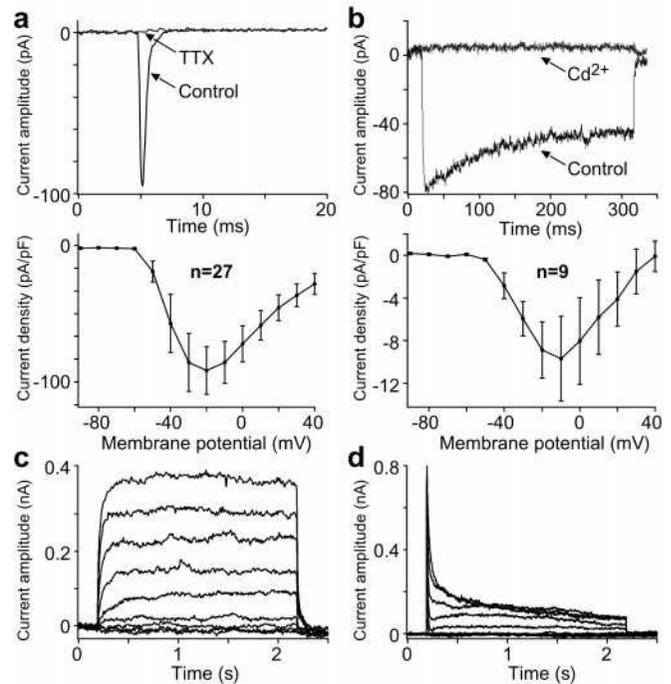


Fig. 3. Voltage-gated currents in FS cells. Voltage-clamp recordings were carried out in FS cells (holding potential = -80 mV). (a Upper) Inward current triggered upon step depolarization. TTX ($0.5 \mu M$) blocked the inward current. (Lower) Relative current-voltage relationship of the peak inward current (mean \pm SEM). (b Upper) Inward current carried by Ba^{2+} ions (in the presence of TTX) and triggered upon depolarization to -20 mV. Cd^{2+} ions ($500 \mu M$) suppressed the Ba^{2+} current. (Lower) Relative current-voltage relationship of peak Ba^{2+} current. (c) Outward currents triggered upon a series of voltage steps (-80 to $+80$ mV, 20-mV increment). (d) Similar recordings in another cell treated with 15 mM TEA.

tetraethylammonium ions (TEA, $n = 12$). In 70% of recorded cells, a transient outward K^+ current with a low threshold for voltage activation (-42 ± 0.3 mV) was observed. This transient current persisted in the presence of TEA (Fig. 3*d*), whereas it was reduced by more than 50% by 5 mM 4-aminopyridine ($n = 6$, data not shown).

$[Ca^{2+}]_i$ Wave Propagation Depends on Gap Junction Signaling. We

then explored the mechanism that underlies $[Ca^{2+}]_i$ wave propagation. Two sources of cell-to-cell communication not mutually exclusive could be involved. Gap junctions were observed along FS cell membranes (27, 28). FS cells are also known to release various products that may act on neighboring FS cells (14, 29).

We first examined whether the spreading of $[Ca^{2+}]_i$ waves required gap junction signaling. Carbenoxolone, a glycyrrhetic acid analog, reversibly reduced by $70.5 \pm 10\%$ the number of FS cells propagating $[Ca^{2+}]_i$ waves ($n = 10$ fields; $P < 0.001$, paired Student's two-tailed t test) (Fig. 4*a*). The action of carbenoxolone was most likely the result of its efficiency at blocking gap junctional communication (30) because (i) it did not alter the initial $[Ca^{2+}]_i$ rise in the stimulated FS cell (Fig. 4*a* Middle), (ii) it markedly decreased the cell-to-cell diffusion of small molecular weight dyes (Neurobiotin tracer, 13 fields; β -Ala-Lys- N^{ϵ} -AMCA, see below), (iii) it caused an increase in input resistance in FS cells probably reflecting a reduction of electrotonic coupling (841 ± 152 M Ω vs. $1,589 \pm 250$ M Ω in control and carbenoxolone-treated FS cells, respectively; $n = 41$ and 22, $P < 0.05$), and (iv) it also significantly diminished the propagation of intercellular $[Ca^{2+}]_i$ waves initiated by dialysis against inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) ($40 \mu M$ IP_3 in the intrapipette solution)

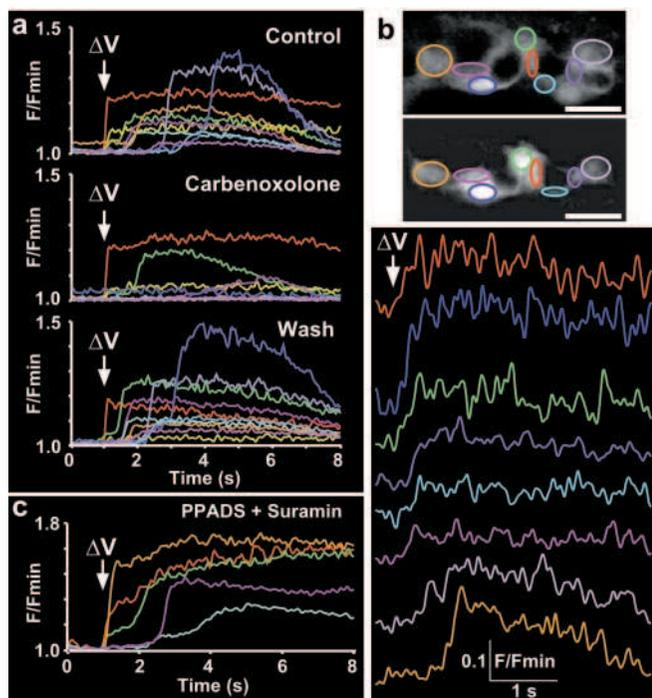


Fig. 4. Propagation of $[Ca^{2+}]_i$ waves between FS cells depends on gap junctional signaling. (a) Electrically stimulated $[Ca^{2+}]_i$ waves between FS cells (red trace: triggered cell) in normal Ringer's saline (Top) and in the presence of 100 μ M carbenoxolone (Middle) are shown. Carbenoxolone reduced the number of FS cells propagating the $[Ca^{2+}]_i$ wave in a reversible manner (Bottom). (b Top) Field of FS cells loaded with the Ca^{2+} -sensitive dye (cell circled in red: stimulated cell). (Middle) Lucifer yellow-filled cells after the patch-clamp recording of the stimulated cell (scale bar, 5 μ m). (Bottom) $[Ca^{2+}]_i$ wave triggered in response to voltage stimulation in the FS cells that subsequently showed Lucifer yellow diffusion. (c) Pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid + suramin (100 μ M each), antagonists of purinergic receptors, failed to suppress a propagated $[Ca^{2+}]_i$ wave in response to voltage stimulation.

without suppressing the initial IP_3 calcium-mobilizing response ($n = 6$ and 11 fields in control and carbenoxolone-treated cells, respectively; $P < 0.001$, χ^2 test). Interestingly, IP_3 -triggered $[Ca^{2+}]_i$ waves were much slower to propagate ($15 \pm 5 \mu\text{m/s}$, $n = 16$ cells) than electrically induced $[Ca^{2+}]_i$ waves ($P < 0.05$, Mann-Whitney U test). Finally, cell-to-cell transfer of Lucifer yellow that diffuses through most gap junctions revealed that the FS cells undergoing $[Ca^{2+}]_i$ waves were dye-coupled (Fig. 4b, $n = 7$ fields).

We then investigated the possible involvement of an extracellular route in the $[Ca^{2+}]_i$ wave propagation. Purine nucleotides have been identified as an extracellular messenger in various cells including FS cells (31), and there is evidence that they may act in concert with gap junction signaling for wave propagation in cell preparations (17–20, 22). Bath application of both pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS) and suramin (100 μ M each), antagonists known to depress purinergic receptor transmission in glial cell networks (18), failed to suppress propagated $[Ca^{2+}]_i$ waves (Fig. 4c) ($n = 9$ fields), whereas they abolished $[Ca^{2+}]_i$ responses to ATP (10 μ M, 10-s application, $n = 23$ cells, data not shown).

FS Cell Network: A Functional Large-Scale Communication System. In the view that we imaged propagated $[Ca^{2+}]_i$ waves with a restricted spatial resolution (square fluorescent confocal images $\leq 5,600 \mu\text{m}^2$), it was important to know whether the FS cell network could transfer information over long distances within

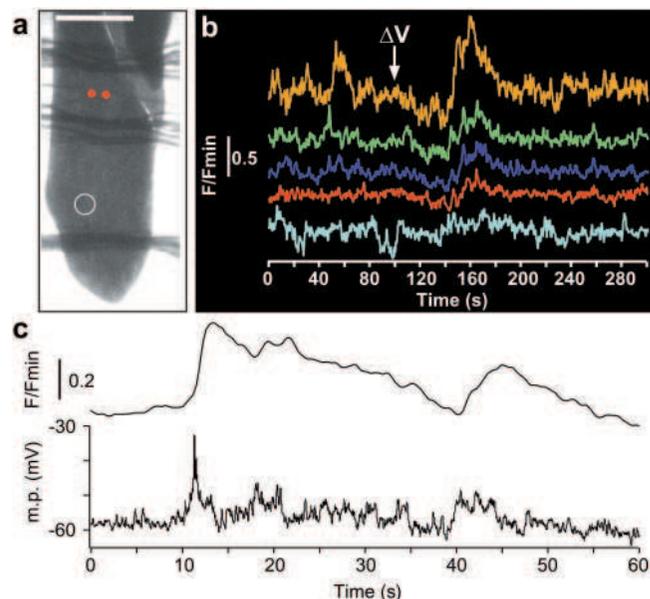


Fig. 5. Long-distance propagation of electrical and Ca^{2+} signals along the FS cell circuit. (a) Bright-field image of a coronal pituitary slice. The irregular transverse lines were the nylon threads used to keep the slice in place. The two red dots help identify the position of the two stimulation pipette tips touching the slice surface. (Scale bar, 500 μ m.) (b) $[Ca^{2+}]_i$ changes were recorded (5 frames per s) in five FS cells that were located in the region delimited by the white circle (620 μ m from the pair of stimulation pipettes) in a. Electrical stimulation (700 μ A, 75 ms) induced the occurrence of coincident $[Ca^{2+}]_i$ rises in these cells. (c) In another slice, electrical and $[Ca^{2+}]_i$ recordings were simultaneously combined in an FS cell, 520 μ m away from the point of stimulation. $[Ca^{2+}]_i$ rise did not occur, neither did depolarization between the electrical stimulation and the beginning of the plots (39-s time span). Transient depolarizing events then coincided with the propagated $[Ca^{2+}]_i$ rises.

the parenchyma. $[Ca^{2+}]_i$ imaging of FS cells combined with distant electrical field stimulation (Fig. 5a) revealed prominent, coordinated transient $[Ca^{2+}]_i$ rises that occurred far away (0.5–1 mm) from the stimulation site (Fig. 5b, 6 slices). $[Ca^{2+}]_i$ waves, which were first recruited upon electrical stimulation and then propagated along the FS cell network, were very likely to be at the origin of the distant $[Ca^{2+}]_i$ rises, as these only occurred when stimulation intensity exceeded a threshold level (700 μ A to 5 mA). Also, propagated $[Ca^{2+}]_i$ waves were closely correlated with changes in membrane potential. $[Ca^{2+}]_i$ recordings combined with patch-clamp monitoring of FS cells several hundred microns distant from the site of stimulation showed the occurrence of transient depolarization that coincided with each propagated $[Ca^{2+}]_i$ rise (Fig. 5c, $n = 5$ cells). Similar depolarizing events were detected upon propagated $[Ca^{2+}]_i$ rises in FS cells that were near single electrically stimulated FS cells ($n = 4$, data not shown). Propagated $[Ca^{2+}]_i$ rises were always associated with transient depolarization exceeding a threshold level of about -50 mV (Fig. 5c), notwithstanding the distance between the patched cells and the site of stimulation (range 17–520 μ m, $n = 9$). Inversely, such a depolarization was never observed in FS cells that failed to display propagated $[Ca^{2+}]_i$ rises ($n = 6$, data not shown).

A final set of results provided evidence that the FS cell network forms an extended three-dimensional mode of communication. Consistent with this assumption, we found that $[Ca^{2+}]_i$ waves were electrically triggered in FS cells from coronal as well as sagittal slices. Also, the apparent low velocity of $[Ca^{2+}]_i$ waves ($17.7 \pm 0.8 \mu\text{m/s}$, $n = 45$ cells, 6 fields) calculated from the distance between the pair of electrode tips and recorded FS cells (Fig. 5) suggested a complex arborization of the gap junction-

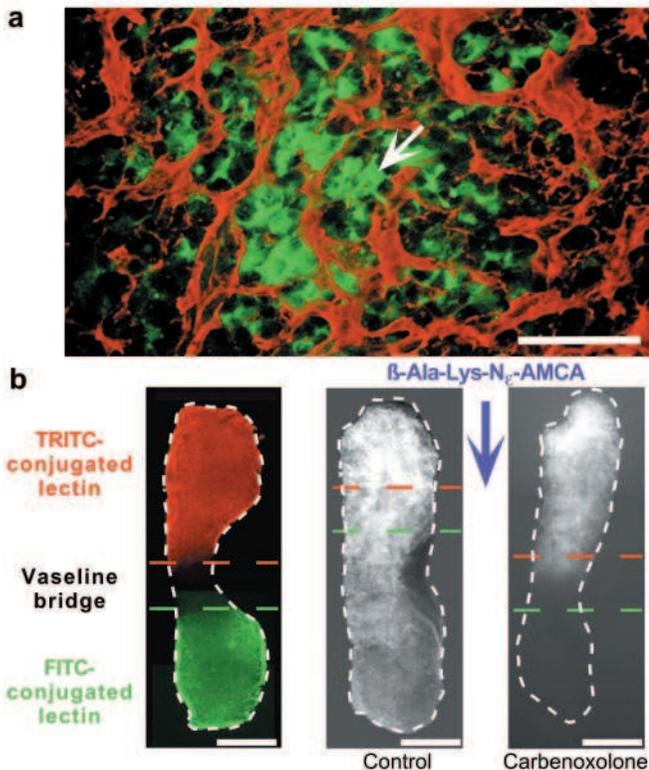


Fig. 6. Three-dimensional, large-scale communication through the FS cell network. (a) Three-dimensional reconstruction (20- μ m depth) of Neurobiotin-filled FS cells (labeled in green) together with the immunolabeling of laminin, a component of basal laminae surrounding the cell cords (labeled in red). The arrow indicates the approximate location of the cell initially recorded during 90 min with a Neurobiotin-containing patch-clamp pipette (scale bar, 50 μ m). (b) FS cell network visualized with the Vaseline-gap technique. (Left) Coronal slice straddling between two compartments of a chamber. Fluorescent lectin stainings localized the Vaseline bridge covering the slice at the compartment interface (scale bar, 500 μ m). TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate. Colored dashed lines delineate the approximate location of the Vaseline bridge, whereas the white one shows the slice periphery. (Center) Bath application of β -Ala-Lys- N^{ϵ} -AMCA in the top compartment allowed the staining of FS cells across the whole slice. (Right) When carbenoxolone (100 μ M) was present in both compartments, β -Ala-Lys- N^{ϵ} -AMCA-stained FS cells were seen only in the top compartment and, marginally, within the Vaseline gap.

coupled FS cell network within the labyrinthine cell cords. Two results strengthened this proposal. First, single-cell dialysis of the Neurobiotin tracer traced a meshwork of connected FS cells over territories, which crossed cell cord boundaries (Fig. 6a, $n = 16$ fields). Second, multiple site introduction of low-molecular weight fluorescent dyes into FS cells provided further evidence for multidirectional, long-distance (millimeter range) transfer of information throughout the parenchyma (Fig. 6b). Bath application of β -Ala-Lys- N^{ϵ} -AMCA on one side of the coronal slices (insulated from the other side with a Vaseline bridge) allowed many FS cells to take up the fluorescent dipeptide. β -Ala-Lys- N^{ϵ} -AMCA diffused across the Vaseline bridge up to the opposite side of the slices ($n = 9$). Carbenoxolone (100 μ M) blocked the spreading of β -Ala-Lys- N^{ϵ} -AMCA ($n = 5$), which, given its low molecular weight (432.5) (24), probably diffused between FS cells coupled by gap junctions.

Discussion

In this study, we provide strong evidence that the anterior pituitary possesses an intrinsic system of communication that allows long-distance transfer of information within its paren-

chyma. The hitherto enigmatic agranular FS cells form the framework of this communication system. These FS cells express an extended repertoire of signaling mechanisms to generate and transmit messages (regenerative $[Ca^{2+}]_i$ waves, cell-to-cell diffusion of molecules) along their cell network wiring up the gland.

This work reveals that the FS cells can now be given the label “excitable cell,” nearly half a century after they were discovered (15). Only one study so far has shown in cultured FS cells (TtT/GF cell line) the presence of a delayed rectifier K^+ current, which was detectable when the cloned FS cells were in contact (25). We demonstrate here that, *in situ*, FS cells had a set of voltage-gated conductances sufficient to generate action potentials and ensuing transient $[Ca^{2+}]_i$ rises. To do so, FS cells displayed TTX-sensitive Na^+ currents and Cd^{2+} -sensitive Ca^{2+} currents, which both could provide a depolarization at the foot of action potential that increases the probability of spike firing. Whereas a built-in inactivation process led Na^+ channels to close quickly, the fast-activating, slow-inactivating Ca^{2+} channels apparently remained open long enough during single action potentials to cause a significant $[Ca^{2+}]_i$ increase. Also, two K^+ currents, which shared common properties with the 4-aminopyridine-sensitive I_A and TEA-sensitive delayed rectifier K^+ currents (32), respectively, helped shape the repolarizing process of action potentials.

Excitability, which may at first appear as an atypical behavior for such agranular cells, is most likely one of the means to trigger long-range $[Ca^{2+}]_i$ signaling, a hitherto unknown mode of communication at the anterior pituitary level. Brief electrical stimulation of one or a few FS cells promoted $[Ca^{2+}]_i$ waves between FS cells over long distances across the parenchyma. Because of their sensitivity to both TTX and Cd^{2+} ions, we propose that the electrical activity induced in stimulated FS cells initiated the propagation of intercellular $[Ca^{2+}]_i$ waves along the FS cell network.

A closely related question is how $[Ca^{2+}]_i$ rises traveled from one FS cell to the next. Our results strongly suggest that, *in situ*, many FS cells were extensively coupled through gap junctions and that these gap junctions were responsible for the propagation of $[Ca^{2+}]_i$ rises between the coupled cells. The involvement of gap junctions in this phenomenon was fourfold. First, the gap junction blocker carbenoxolone reversibly reduced the number of FS cells propagating $[Ca^{2+}]_i$ waves that were initiated by either focal electrical stimulation or IP_3 dialysis; second, intracellular injections of Lucifer yellow traced the FS cells that propagated $[Ca^{2+}]_i$ waves; third, intercellular diffusion of small tracers (Neurobiotin and β -Ala-Lys- N^{ϵ} -AMCA) resulted in the labeling of three-dimensional ensembles of FS cells that were also blocked by carbenoxolone; and fourth, it was highly unlikely that activation of membrane receptors, such as purinergic receptors after ATP release, be involved in $[Ca^{2+}]_i$ waves triggered after voltage stimulation.

The nature of signals flowing between gap junction-coupled FS cells that propagated electrically induced $[Ca^{2+}]_i$ waves was then addressed. Both the velocity (124 μ m/s) and extent (millimeter range) of $[Ca^{2+}]_i$ waves suggested that the latter spread along the three-dimensional FS cell network in a regenerative manner. Two types of regenerative signals seemed feasible: a cell-to-cell transfer of second messengers (22) or an electrical event (33, 34). The first possibility appeared barely compatible with our results. In FS cells, average speeds of intercellular $[Ca^{2+}]_i$ waves driven by single-cell IP_3 dialysis were slow (15 μ m/s), as has been observed for second messenger waves involving Ca^{2+} release from internal stores in a chain reaction, owing to the regenerative nature of the release process (19–22). Thus, second messenger waves could propagate between FS cells, but they were probably not representative of propagation mechanisms in most FS cells when an electrical stimulation was locally applied. In favor of the second possibility was the

detection of membrane depolarization coincident with propagated $[Ca^{2+}]_i$ rises. Such a transient depolarization probably participated in the occurrence of propagated $[Ca^{2+}]_i$ rises as it overlapped with the activation threshold of both Na^+ and Ca^{2+} channel currents. However, we did not observe large spikes that coincided with the spreading of $[Ca^{2+}]_i$ waves, possibly because of the poor space-clamp control in the highly coupled FS cells that propagated large-scale $[Ca^{2+}]_i$ waves. Consistent with this assumption, it was possible to trigger action potentials in FS cell somas, but only when the cells displayed a high input resistance. Also, the electrical signal might be filtered when passing through gap junctions, as observed between gap junction-coupled neurons (33, 34). Hence, techniques that permit subcellular monitoring of membrane potential (e.g., potential-sensitive dyes) (35) need to be developed for pituitary slices to better address this issue that should include the detection of signals within the long and slender processes of FS cells (16), which are rich in gap junctions (27).

What might be the function of such a network of cells wiring up the anterior pituitary? It has been well documented that FS cells are not just sustentacular elements but perform regulatory functions that determine the responsiveness of hormone-secreting cells (14, 29). With their long cytoplasmic processes

between other cell types, they are in an ideal position to play a role in intercellular communication mechanisms. Although FS cells do not secrete hormones, they are known to release biologically important factors and signaling molecules (e.g., IL-6, nitric oxide, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, follistatin) (14, 29, 36) and are responsive to central and peripheral stimuli [e.g., pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP), vasoactive intestinal peptide, estrogens] (37–39) including immune factors (tumor necrosis factor α , transforming growth factor β 3, IFN- γ) (40–42). Moreover and most remarkably, the FS cell network seems to provide a unique system of large-scale communication that may rapidly adjust cellular activities within the anterior pituitary. Hence, distant endocrine cells might receive coordinated information from both extrapituitary molecules (1–4) slowly carried by the pituitary microvasculature (5) and intrapituitary signals mostly emanating from the FS cell circuitry.

We thank A. Carrette and J.-M. Michel for technical assistance. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and grants from the European Union, Région Languedoc-Roussillon, Association pour la Recherche sur le Cancer, and Fondation pour la Recherche Médicale.

- Knobil, E. (1980) *Recent Prog. Horm. Res.* **36**, 53–88.
- Liu, J. H., Kazer, R. R. & Rasmussen, D. D. (1987) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**, 1027–1035.
- Sassin, J. F., Frantz, A. G., Weitzman, E. D. & Kapen, S. (1972) *Science* **177**, 1205–1207.
- Plotsky, P. M. & Vale, W. (1985) *Science* **230**, 461–463.
- Porter, J. C., Ondo, J. G. & Cramer, O. M. (1974) *Handb. Physiol. Sect. Endocrinol.* **4**, 33–43.
- Baker, B. L. (1974) *Handb. Physiol. Sect. Endocrinol.* **4**, 45–80.
- Schlegel, W., Winiger, B. P., Mollard, P., Vacher, P., Wuarin, F., Zahnd, G. R., Wollheim, C. B. & Dufy, B. (1987) *Nature (London)* **329**, 719–721.
- Fomina, A. F. & Levitan, E. S. (1995) *J. Neurosci.* **15**, 4982–4991.
- Villalobos, C., Faught, W. J. & Frawley, L. S. (1998) *Mol. Endocrinol.* **12**, 87–95.
- Guérineau, N. C., Bonnefont, X., Stoeckel, L. & Mollard, P. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 10389–10395.
- Bonnefont, X., Fiekers, J., Creff, A. & Mollard, P. (2000) *Endocrinology* **141**, 868–875.
- Stewart, J. K., Clifton, D. K., Koerker, D. J., Rogol, A. D., Jaffe, T. & Goodner, C. J. (1985) *Endocrinology* **116**, 1–5.
- Gambacciani, M., Liu, J. H., Swartz, W. H., Tueros, V. S., Rasmussen, D. D. & Yen, S. S. (1987) *Clin. Endocrinol.* **26**, 557–563.
- Schwartz, J. (2000) *Endocr. Rev.* **21**, 488–513.
- Rinehart, J. & Farquhar, M. (1953) *J. Histochem. Cytochem.* **1**, 93–113.
- Vila-Porcile, E. (1972) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **129**, 328–369.
- Guthrie, P. B., Knappenberger, J., Segal, M., Bennett, M. V., Charles, A. C. & Kater, S. B. (1999) *J. Neurosci.* **19**, 520–528.
- Scemes, E., Suadicani, S. O. & Spray, D. C. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 1435–1445.
- Cotrina, M. L., Lin, J. H., Lopez-Garcia, J. C., Naus, C. C. & Nedergaard, M. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 2835–2844.
- Newman, E. A. & Zahs, K. R. (1997) *Science* **275**, 844–847.
- Newman, E. A. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 2215–2223.
- Charles, A. (1998) *Glia* **24**, 39–49.
- Garaschuk, O., Linn, J., Eilers, J. & Konnerth, A. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 452–459.
- Otto, C., tom Dieck, S. & Bauer, K. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, C210–C217.
- Yamasaki, T., Fujita, H., Inoue, K., Fujita, T. & Yamashita, N. (1997) *Endocrinology* **138**, 4346–4350.
- Pinault, D. (1995) *Brain Res. Rev.* **21**, 42–92.
- Soji, T. & Herbert, D. C. (1989) *Anat. Rec.* **224**, 523–533.
- Yamamoto, T., Hossain, M. Z., Hertzberg, E. L., Uemura, H., Murphy, L. J. & Nagy, J. I. (1993) *Histochemistry* **100**, 53–64.
- Allaerts, W., Carmeliet, P. & Deneef, C. (1990) *Mol. Cell. Endocrinol.* **71**, 73–81.
- Alvarez-Maubecin, V., Garcia-Hernandez, F., Williams, J. T. & Van Bockstaele, E. J. (2000) *J. Neurosci.* **20**, 4091–4098.
- Chen, L., Maruyama, D., Sugiyama, M., Sakai, T., Mogi, C., Kato, M., Kurotani, R., Shirasawa, N., Takaki, A., Renner, U., et al. (2000) *Endocrinology* **141**, 3603–3610.
- Hille, B. (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes* (Sinauer, Sunderland, MA).
- Galarreta, M. & Hestrin, S. (1999) *Nature (London)* **402**, 72–75.
- Venance, L., Rozov, A., Blatow, M., Burnashev, N., Feldmeyer, D. & Monyer, H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10260–10265. (First published August 15, 2000; 10.1073/pnas.160037097)
- Yuste, R., Lanni, F. & Konnerth, A. (2000) *Imaging Neurons: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY).
- Yu, W. H., Kimura, M., Walczewska, A., Porter, J. C. & McCann, S. M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7795–7798.
- Yada, T., Vigh, S. & Arimura, A. (1993) *Peptides* **14**, 235–239.
- Tatsuno, I., Somogyvari-Vigh, A., Mizuno, K., Gottschall, P. E., Hidaka, H. & Arimura, A. (1991) *Endocrinology* **129**, 1797–1804.
- Allen, D. L., Mitchner, N. A., Uveges, T. E., Nephew, K. P., Khan, S. & Ben-Jonathan, N. (1997) *Endocrinology* **138**, 2128–2135.
- Kobayashi, H., Fukata, J., Murakami, N., Usui, T., Ebisui, O., Muro, S., Hanaoka, I., Inoue, K., Imura, H. & Nakao, K. (1997) *Brain Res.* **758**, 45–50.
- Hentges, S., Boyadjieva, N. & Sarkar, D. K. (2000) *Endocrinology* **141**, 859–867.
- Vankelecom, H., Matthys, P. & Deneef, C. (1997) *J. Histochem. Cytochem.* **45**, 847–857.

2. Activité spontanée au sein du réseau de cellules FS.

Les évènements calciques et électrophysiologiques observés de manière spontanée au sein du réseau de cellules FS sont décrits dans ce chapitre. Une partie de ces résultats a été mentionnée dans la publication précédente, mais n'a pas été illustrée. Ils feront partie d'un article de revue sur invitation en cours d'écriture pour le journal *Trends in Endocrinology and Metabolism*. L'appareillage et les méthodes utilisées sont identiques à ceux qui sont décrits dans le chapitre précédent.

Principaux résultats

Lors d'enregistrements de l'activité calcique des cellules FS, nous avons observé des variations spontanées de la $[Ca^{2+}]_i$ en absence de stimulation. Ces variations présentent des organisations temporelles très diverses. Une activité constituée de transitoires uniques a été enregistrée dans 52 % des cellules (n= 565 cellules sur 1087, 30 tranches). Dans certaines de ces cellules, les transitoires reviennent à une fréquence assez régulière (figure 19a), avec une période souvent supérieure à la minute. Dans 31 % des cellules (n=337), les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ s'organisent en périodes d'activité entrecoupées de phase de silence (figure 19b). Durant ces périodes, plusieurs transitoires calciques s'enchaînent sans que la $[Ca^{2+}]_i$ retourne à sa valeur de base. Seulement 17 % des cellules (n=185) ne présentent pas d'activité calcique spontanée.

Le potentiel de membrane des cellules FS présente également des variations spontanées, mais le peu d'enregistrements effectués en "courant imposé" sur de longues durées ne permet pas de dégager un profil d'activité précis. Lors d'enregistrements combinés du potentiel de membrane et des variations de la $[Ca^{2+}]_i$ dans des cellules ayant une résistance d'entrée supérieure à 1 G Ω , nous avons observé des trains de potentiels d'action spontanés accompagnés de transitoires calciques (figure 20). Les caractéristiques de ces transitoires

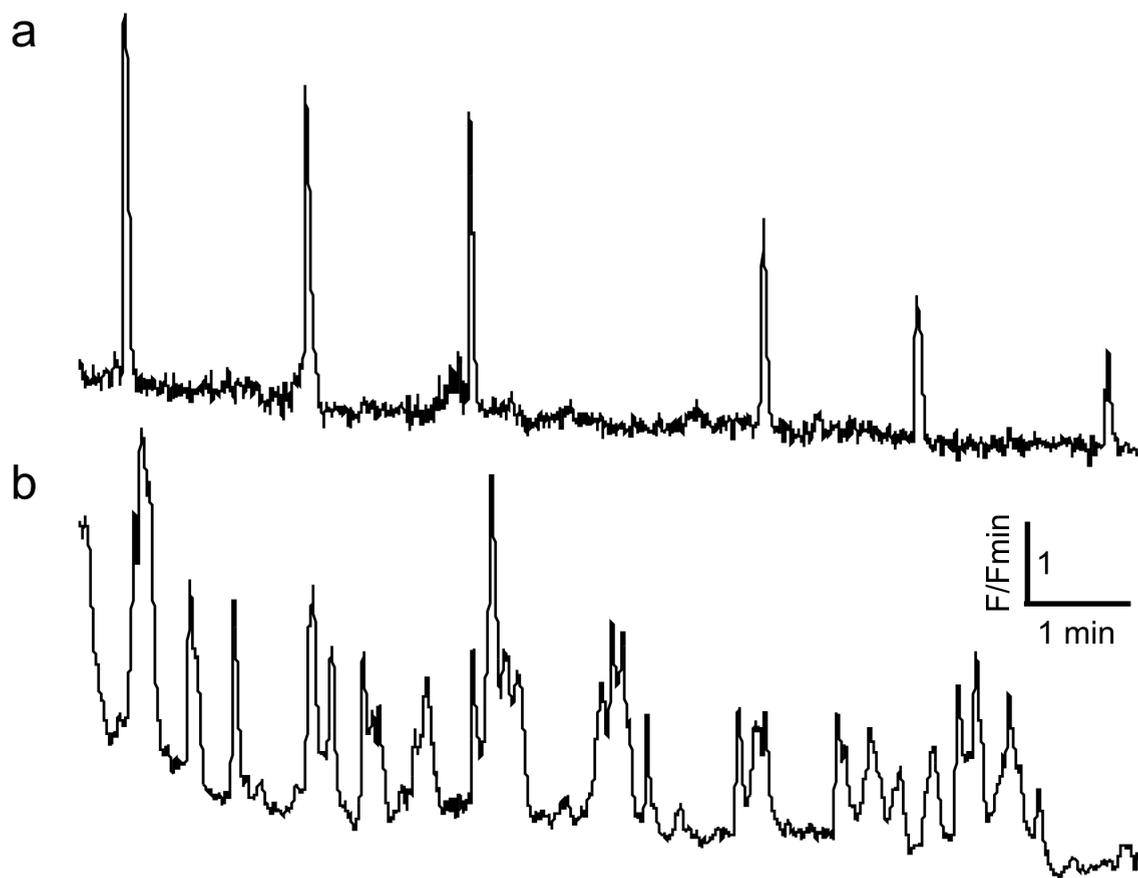


Figure 19 : Activité calcique spontanée dans des cellules FS.

Ces traces sont représentatives des différents types d'activité calcique qui ont été enregistrés dans les cellules FS. La décroissance de la fluorescence est due à la photolyse de la sonde calcique. Cette décroissance n'a pu être corrigée mathématiquement que de manière partielle.

La cellule (a) présente une activité régulière, avec des transitoires calciques de courte durée. Les signaux calciques de la cellule (b) sont organisés en périodes d'activité (bouffées) interrompues par des phases de silence.

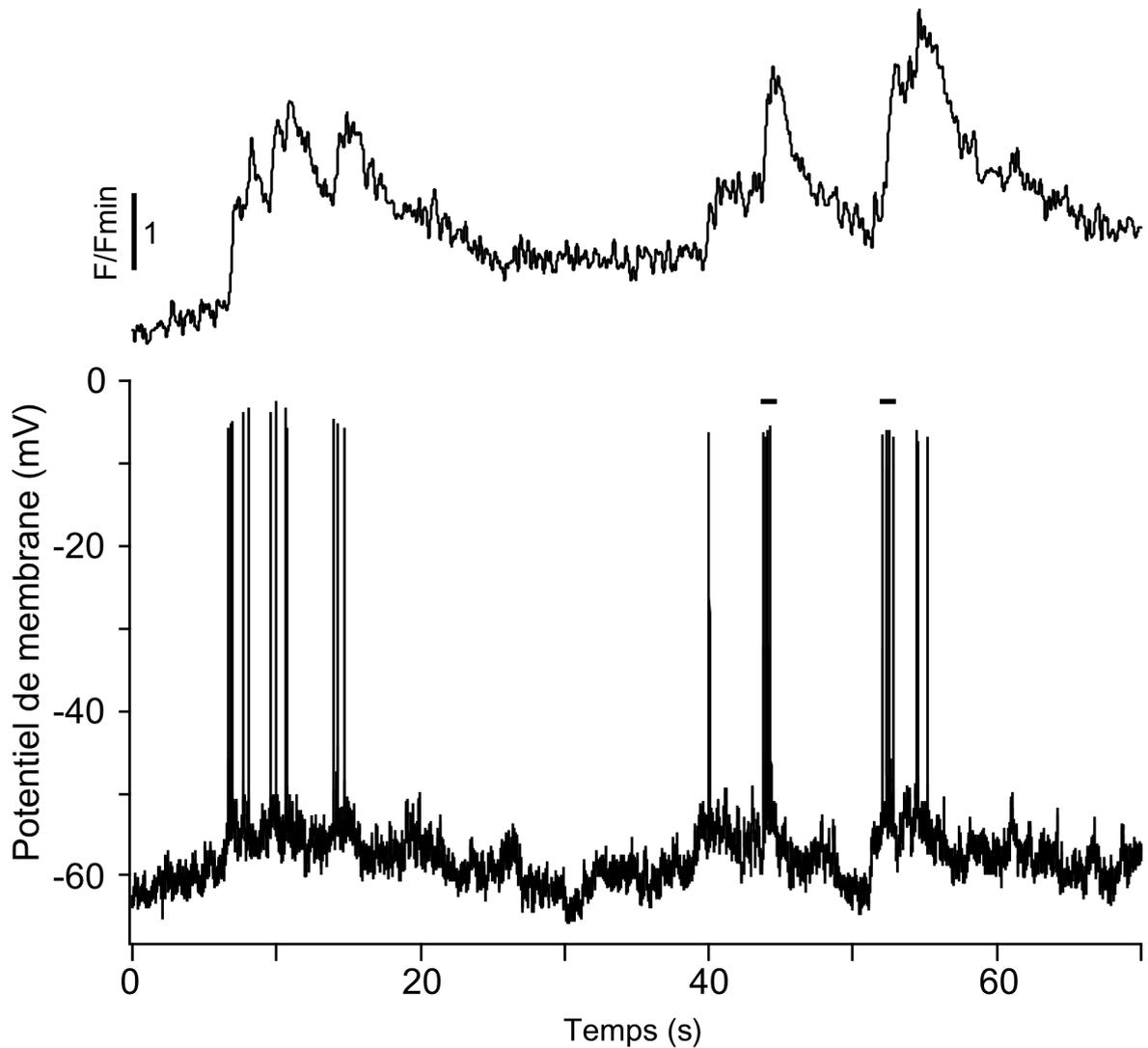


Figure 20 : Transitoires calciques dûs à l'activité spontanée dans une cellule FS.

L'activité électrique est enregistrée grâce à la technique du patch-clamp dans sa configuration "cellule entière". Les signaux calciques sont suivis en microscopie confocale en temps réel.

La cellule FS enregistrée présente des variations spontanées et simultanées de la $[Ca^{2+}]_i$ et du potentiel de membrane. L'amplitude et la cinétique des transitoires calciques dépend du nombre de potentiels d'action. Les épisodes d'activité électrique à haute fréquence (barres noires) se caractérisent par les réponses calciques les plus amples.

(cinétique, amplitude) sont similaires à celles des transitoires obtenus après déclenchement de potentiels d'action par injection de courant dépolarisant dans les cellules FS (chapitre précédent). La figure 20 illustre également comment les potentiels d'action peuvent coder en amplitude les signaux calciques dans les cellules FS. Les signaux liés à l'activité électrique ayant une phase de décroissance lente (voir figure 2 et 5, dans Fauquier *et al.*, 2001), des potentiels d'action déchargeant à haute fréquence (de 2 à 4 Hz dans la figure 20) provoquent des augmentations de $[Ca^{2+}]_i$ plus amples que celles qui sont dues aux potentiels d'action spontanés apparaissant à faible fréquence.

Des vagues calciques spontanées ont également été observées. Lors d'un même enregistrement (figure 21), des augmentations coïncidentes de la $[Ca^{2+}]_i$ peuvent avoir lieu soit entre un nombre restreint de cellules FS (indiqué par une pointe de flèche dans les cellules 2, 6 et 7) soit dans la quasi-totalité des cellules FS du champ (indiqué par une flèche). En outre, ces transitoires spontanés et synchrones peuvent avoir lieu dans des cellules distantes de plusieurs dizaines de microns sans que les zones de contact intercellulaires soient obligatoirement visibles dans le plan x, y d'observation de la fluorescence.

Discussion

Les cellules FS dans les tranches aiguës d'hypophyse de rat possèdent des activités électriques et calciques autonomes. L'activité électrique de type potentiel d'action, spontanée ou déclenchée, n'a jamais été observée sur les cellules TtT/GF (Yamasaki *et al.*, 1997). Contrairement aux cellules FS dans les tranches d'hypophyse, les cellules des lignées TtT/GF (Nakajima *et al.*, 2001), Tpit/F1 (Chen *et al.*, 2000), ainsi que les cellules FS en culture (Du *et al.*, 2000 ; Uchiyama *et al.*, 2001) ne présentent pas de variations spontanées de la $[Ca^{2+}]_i$.

Quels pourraient être les mécanismes permettant de sous-tendre une telle activité électrique et calcique spontanée *in situ* ? Tout d'abord, il est envisageable qu'ils soient intrinsèques à chaque cellule FS dans son environnement natif. La morphologie spécifique de

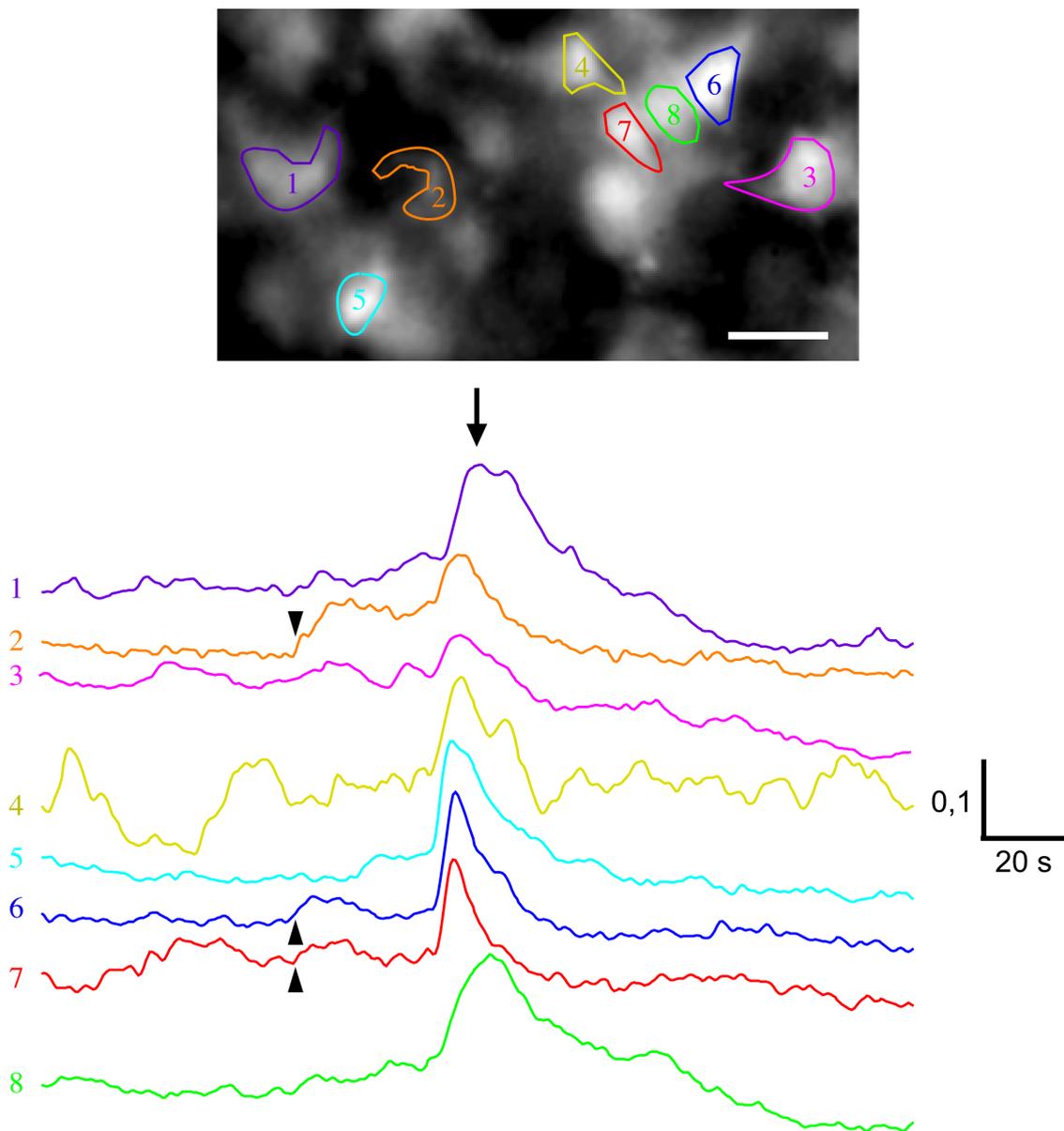


Figure 21 : Vague calcique spontanée au sein du réseau de cellules FS.

a) images moyennée de 8 cellules chargées avec la sonde calcique Oregon Green BAPTA-1 AM

b) signaux calciques enregistrés en microscopie conventionnelle.

Les couleurs encerclant les cellules correspondent aux couleurs des tracés.

Barre d'échelle : 10 μ m

ces cellules dans le tissu dépend très certainement d'éléments extracellulaires (type protéine d'adhésion) et intracellulaires (e. g. arrangement du cytosquelette). Concernant notamment ces derniers, il y a de nombreux exemples dans la littérature de relation étroite entre degré d'organisation du réseau intracellulaire d'actine F et activité de canaux ioniques (Rosenmund and Westbrook, 1993 ; Levitan *et al.*, 1995). Ensuite, ces mécanismes peuvent dépendre des communications cellule-cellule tel que cela a été observé dans d'autres modèles cellulaires (Talavera *et al.*, 1995 ; Rasband *et al.*, 1999). Dans ce contexte, il a déjà été montré que l'expression de canaux potassiques dans la lignée TtT/GF était régulée par des contacts cellulaires (Yamasaki *et al.*, 1997).

Un autre aspect indéniable des cellules FS est leur capacité d'avoir un flux de métabolites entre elles, et ce *via* leur réseau couplé par des jonctions gap. Des canaux ioniques comme certains canaux calciques ont leurs activités tributaires de niveaux de phosphorylation/déphosphorylation (Catterall, 2000), ces dernières pourraient ainsi dépendre de l'ajustement de la balance énergétique *via* le réseau cellulaire couplé.

Une autre possibilité serait que l'activité de cellules endocrines serait le moteur de l'activité des cellules FS. Cette influence pourrait se faire par couplage direct *via* des jonctions gap, hypothèse peu probable car nous n'avons jamais observé de signaux calciques synchrones entre cellules FS et cellules endocrines, ni de diffusion de traceurs de faible poids moléculaire. L'influence paracrine des cellules endocrines est toutefois envisageable. Deux arguments sont en faveur d'une telle relation cellule endocrine \Rightarrow cellule FS. Tout d'abord, des cellules endocrines, comme des cellules GH stimulées par un sécrétagogue, présentent en microscopie électronique des images d'exocytose de grains de sécrétion en vis-à-vis avec des prolongements de cellules FS (Shimada and Tosaka-Shimada, 1989). Outre l'hormone d'intérêt, les cellules endocrines hypophysaires libèrent, par exemple, de l'ATP (Chen *et al.*, 1995 ; Nunez *et al.*, 1997) qui pourrait agir soit directement *via* des récepteurs P2 (Chen *et al.*, 2000 ; Uchiyama *et al.*, 2001), soit indirectement *via* un métabolite comme l'adénosine se

fixant sur des récepteurs A_1 et A_2 (Ritchie *et al.*, 1997 ; Yu *et al.*, 1997) à la surface des cellules FS. Ces mécanismes potentiels d'interaction cellule endocrine \Rightarrow cellule FS pouvant être différenciellement sollicités selon le degré de stimulation/inhibition des cellules endocrines par des facteurs extra-hypophysaires (type facteurs hypophysiotropes d'origine hypothalamique), ils mériteront d'être envisagés lors d'études ultérieures. En effet, si l'on tient également compte de toute la palette de communication possible cellule FS \Rightarrow cellule endocrine, des zones de contact entre ces deux types cellulaires pourraient être des lieux privilégiés de communication bidirectionnelle. Une connaissance plus approfondie de ces zones serait nécessaire afin d'évaluer si ces dernières présentent des analogies avec d'autres zones spécialisées de communication intercellulaire, de type synapse ou nœud de Ranvier qui inclurait, par exemple, l'expression de canaux ioniques spécifiques ou l'agrégation de récepteurs (Rasband and Trimmer, 2001 ; Sheng, 2001).

Enfin, cette étude de l'activité spontanée des cellules FS a montré la grande diversité des possibilités de communication intercellulaire au travers du réseau de cellules FS. La simple visualisation du décours temporel de la cellule numérotée « 7 » dans la figure 21 montre trois états de couplage dans le laps d'une minute d'enregistrement. Cette cellule présente tout d'abord une activité spontanée à priori sans coïncidence avec les autres cellules FS du champ optique bidimensionnel. Ensuite, cette cellule montre une coïncidence « restreinte » avec les cellules 2 et 6 (pointes de flèche). Enfin la cellule 7 semble propager une vague calcique commune aux cellules FS du champ (flèche). La cellule 4 présente quant à elle une activité spontanée soutenue dont le décours n'est apparemment modifié que lors de la propagation de la vague calcique spontanée « globale ». Cette dernière est très certainement associée au recrutement de réponses calciques dans des cellules FS non visibles dans ce champ et pouvant être situées soit sur le même plan focal soit dans des zones profondes de la tranche. Plusieurs commentaires ressortent de ce type d'observation. Tout d'abord, il est fort possible qu'un ou plusieurs foyers de dépolarisation du réseau tri-dimensionnel de cellules FS

soient la source de vagues calciques se propageant « spontanément » (i.e. sans influence extra-hypophysaire) dans la glande. En effet, la vague calcique spontanée « globale » montrée dans la figure 21 n'est pas sans rappeler les vagues calciques se propageant à longue distance en réponse à une stimulation électrique (voir figure 5, Fauquier *et al.*, 2001). Toutefois, quel est le phénomène électrique capable de déclencher une vague intercellulaire ? En effet, les transitoires calciques spontanés (attribués à l'activité électrique) sont loin d'être toujours associés à la propagation d'une vague calcique. Les signaux calciques se propageant à de nombreuses cellules sont le plus souvent de plus forte amplitude que celle des signaux calciques restreints à une ou quelques cellules. Un phénomène électrique, type bouffée de potentiels d'action à haute fréquence capable d'induire des signaux calciques amples (figure 20) serait un signal approprié pour promouvoir la propagation de vagues calciques à large échelle. Des résultats préliminaires obtenus par Sébastien Blaise (étudiant DEA 2000-2001) sur des tranches d'hypophyse de souris sont en faveur d'un tel mécanisme. En effet, dans les cellules FS de souris, un protocole de stimulation électrique extracellulaire sous forme de trains d'impulsion de faible amplitude, mais à haute fréquence, est le plus adéquat pour déclencher des vagues calciques intercellulaires. Des exemples de « priming » de vagues calciques lors de dépolarisation membranaire ont également été observés dans d'autres systèmes cellulaires (Enkvist and McCarthy, 1994). Si un tel phénomène existe spontanément dans des cellules FS d'hypophyse de rat, il est fort possible que ces dernières pourraient constituer des foyers de cellules « chef d'orchestre » (unicellulaire/multicellulaire ?), comme le sont, par exemple, les « chattering cells » dans le cortex visuel (Gray and McCormick, 1996). Enfin, nous n'excluons pas que certains signaux calciques se propageant ou non à d'autres cellules FS soient dus à des libérations des réserves de calcium intracellulaires (voir les expériences de dialyse d'IP₃ dans la première publication). Les vitesses de diffusion que nous avons mesuré (15 µm/s) sont comparables à celles des vagues calciques observées dans d'autres modèles intégrés comme la rétine (Newman and Zahs, 1997), ou le foie intact

(Robbgaspers and Thomas, 1995), mais reste très inférieure à celle de vagues calciques induites électriquement dans les tranches d'hypophyse, de cerveau (Gallarreta and Hestrin, 1999 ; Venance *et al.*, 2000) ou de glande surrénale (Martin *et al.*, 2001). Des expériences basées sur l'emploi d'outils pharmacologiques (thapsigargine...) seront nécessaires pour clarifier ce point.

L'ensemble de ces données montre que les cellules FS forment un réseau de communication modulaire. Il est fort envisageable qu'en fonction du type de stimulus (d'origine extra- et/ou intra-hypophysaire) et des lieux de stimulation dans le réseau, des réponses (calciques ou autres) se propagent à tout le réseau alors que d'autres seront localisées à des régions restreintes de ce dernier. Il sera, dans ce cas, nécessaire de comprendre comment les acteurs de communication intercellulaire (e. g. les connexines formant les jonctions gap entre les cellules FS) ont leurs activités modulées en fonction de chaque patron de stimulation du réseau. À cela s'ajoute la question du lien potentiel entre le degré de couplage du réseau de cellules FS et l'influence de ce dernier sur les communications cellule FS-cellule endocrine. Un premier élément de réponse à cette question est apporté dans le chapitre suivant qui porte sur la production d'IL-6 par le réseau de cellules FS.

3. Libération d'interleukine-6 dans des tranches d'hypophyse : effets du PACAP et rôle des jonctions gap.

But de l'étude

Nous avons orienté notre étude sur la modulation de la libération d'IL-6 par le PACAP. Les récepteurs du PACAP sont exprimés par tous les types cellulaires hypophysaires, mais leur présence dans plus de 90 % des cellules FS fait de ces dernières la cible préférentielle de ce neuropeptide dans l'hypophyse (Vigh *et al.*, 1993). Le PACAP stimule la prolifération des cellules TtT/GF, et cet effet nécessiterait la libération et l'action auto/paracrine de l'IL-6 (voir chapitre VI, 3.2b). L'IL-6 pourrait également être impliquée dans les effets du PACAP sur les sécrétions endocrines hypophysaires. Une action indirecte du PACAP *via* la libération d'IL-6 par les cellules FS serait une explication possible aux effets contradictoires du PACAP sur la sécrétion de PRL et de GH. Dans des cultures de cellules hypophysaires de rat, le PACAP inhibe la sécrétion de PRL et n'a pas d'effet sur la sécrétion de GH. En revanche, il stimule la sécrétion de ces deux hormones *in vivo*, même chez des rats ayant subi une lésion de l'hypothalamus (Jarry *et al.*, 1992). Un scénario possible serait que le PACAP agisse sur la libération hypophysaire d'un facteur pouvant stimuler de manière paracrine les sécrétions hypophysaires. Ce facteur pourrait être l'IL-6, cytokine connue pour augmenter fortement la sécrétion de GH et de PRL (Spangelo *et al.*, 1989).

Nous avons donc réalisé une étude préliminaire de la libération basale d'IL-6 dans des tranches d'hypophyse, ainsi que de l'effet du PACAP sur cette libération. Nous avons également commencé à étudier la relation potentielle entre la communication *via* le réseau de cellules FS *in situ* et la production d'IL-6 par ces dernières.

Méthodes

Les dosages ont été effectués sur des tranches frontales d'hypophyses de rattes Wistar âgées de 10 à 12 semaines. Les protocoles d'incubation et de dosage sont décrits dans la partie "Matériel et méthodes".

Principaux résultats

Les premiers résultats obtenus ont permis d'affiner les techniques de dosage et d'analyse. La première observation a été celle d'une période nécessaire à la stabilisation de la libération d'IL-6 par les tranches. Après la préparation des tranches, la libération augmente et atteint un plateau au bout de quatre heures (figure 22). **Tous les dosages qui suivent ont débuté au moins quatre heures après préparation des tranches.** Quand le plateau est atteint, la quantité moyenne d'IL-6 libérée par heure et par mm³ de tissu est de 218± 18 pg (n=18 tranches).

La quantité d'IL-6 diminue avec l'ordre de préparation des tranches, c'est-à-dire à mesure que l'on s'éloigne de la partie rostrale de la glande. Cette baisse est d'environ 20 % pour la quatrième tranche (par rapport à la première) et de 40 % pour la huitième tranche. La première valeur de la cinétique, toujours réalisée en dehors de toute stimulation, sert de valeur de base. Les points suivants sont exprimés en pourcentage de cette valeur, afin de minimiser les différences dues à la position de la tranche dans la glande et à la variabilité observée d'un animal à l'autre.

L'incubation des tranches en présence de 100 nM de PACAP pendant une heure stimule la libération d'IL-6 (figure 23). L'effet n'est pas immédiat puisqu'il a lieu après la fin de la stimulation, et persiste pendant au moins trois heures (n=3, 18 tranches). Les courbes présentées dans cette figure sont issues d'une seule expérience, mais sont représentatives de l'ensemble des résultats obtenus lors d'expériences similaires. Le but est d'attirer l'attention sur le fait que, hormis pour l'effet de la stimulation par le PACAP, les profils de libération dans les deux conditions présentent des fluctuations similaires de faible amplitude (figure 23).

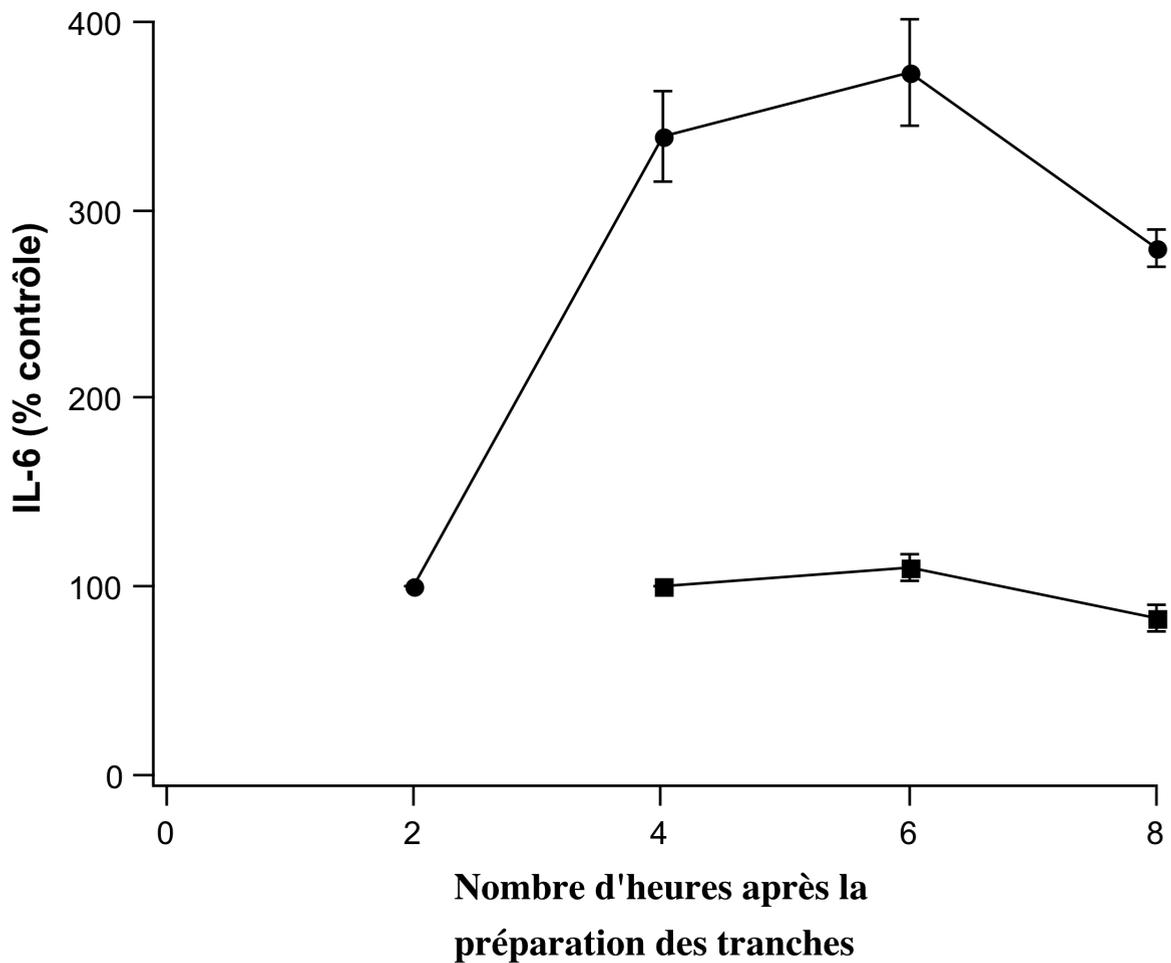


Figure 22 : Stabilisation de la libération d'IL-6.

Chaque tranche a été incubée dans 100 μ l de solution de Ringer. Le milieu a été prélevé toutes les deux heures et remplacé par du milieu frais. La quantité d'IL-6 a été mesurée par dosage ELISA. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la quantité d'IL-6 libérée à la deuxième heure (●) ou à la quatrième heure (■). La libération d'IL-6 atteint un plateau quatre heures après la préparation des tranches et reste relativement stable pendant les quatre heures suivantes.

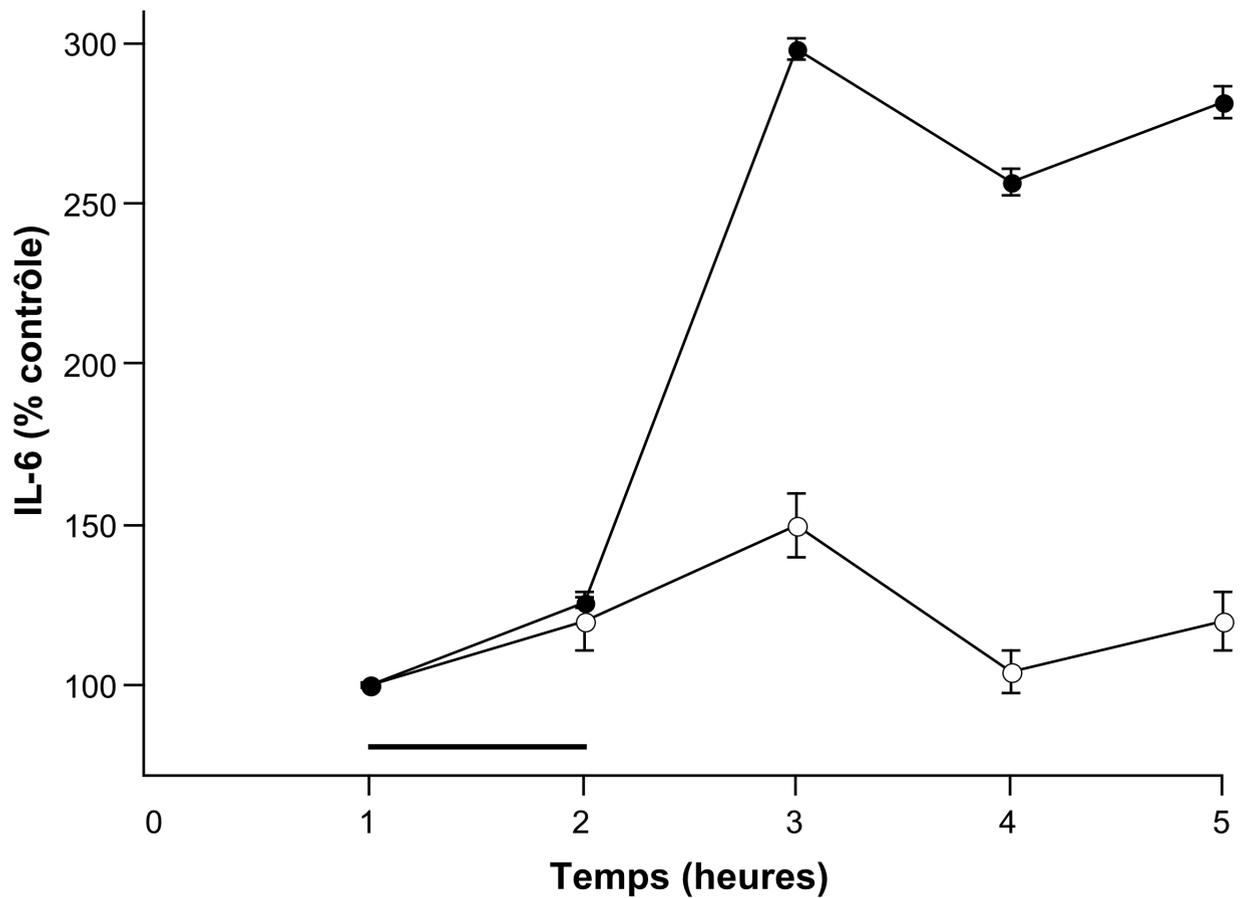


Figure 23 : Effet du PACAP sur la libération d'IL-6 dans des tranches d'hypophyse. La libération d'IL-6 varie peu en absence de stimulation (μ). L'application de 100 nM de PACAP pendant une heure (barre noire) stimule la libération d'IL-6 (●). Chaque courbe représente la moyenne de trois tranches.

Afin de déterminer si le couplage intercellulaire est impliqué dans la production d'IL-6, nous avons testé les effets de la carbénoxolone. Ce bloqueur n'affecte pas la libération basale d'IL-6 (n=3) (figure 24). En revanche, le blocage des jonctions gap ralentit la cinétique d'induction de la production d'IL-6, mais potentialise à plus long terme l'effet du PACAP (n=3). En absence de carbénoxolone, la quantité d'IL-6 libérée par heure se stabilise une heure après la stimulation, alors que ce plateau n'est atteint qu'entre deux et trois heures plus tard en présence de carbénoxolone. Quand le plateau est atteint, la quantité d'IL-6 libérée chaque heure est supérieure en présence de carbénoxolone.

Une autre approche visant à déterminer l'importance du couplage jonctionnel dans ces phénomènes a été utilisée grâce à la technique du "Vaseline-gap". Cette expérience n'a été effectuée que deux fois, mais les résultats obtenus sont semblables dans les deux expériences. Les deux parties d'une tranche ont été isolées par un pont de vaseline et un côté seulement a été stimulé avec 100 nM de PACAP. La stimulation par le PACAP inhibe de 20 % la production d'IL-6 pendant l'application, et ceci des deux côtés (figure 25). Au cours des heures suivantes, on retrouve une activation de la production d'IL-6 d'assez faible intensité du côté stimulé, alors que cette production ne cesse de décroître du côté opposé. La communication entre les deux parties situées de part et d'autre du pont implique la participation des jonctions gap. En effet, en présence de carbénoxolone, l'application de PACAP augmente la libération d'IL-6 du côté stimulé et a même un effet légèrement stimulateur (20 %) sur le côté opposé (figure 25).

Discussion

Ces travaux montrent que les tranches d'hypophyse de rat libèrent de l'IL-6. Les mécanismes de libération semblent complexe, à l'image de la multiplicité des voies de régulation décrites dans la littérature (Renner et al., 1998). Ces résultats soulèvent plusieurs questions.

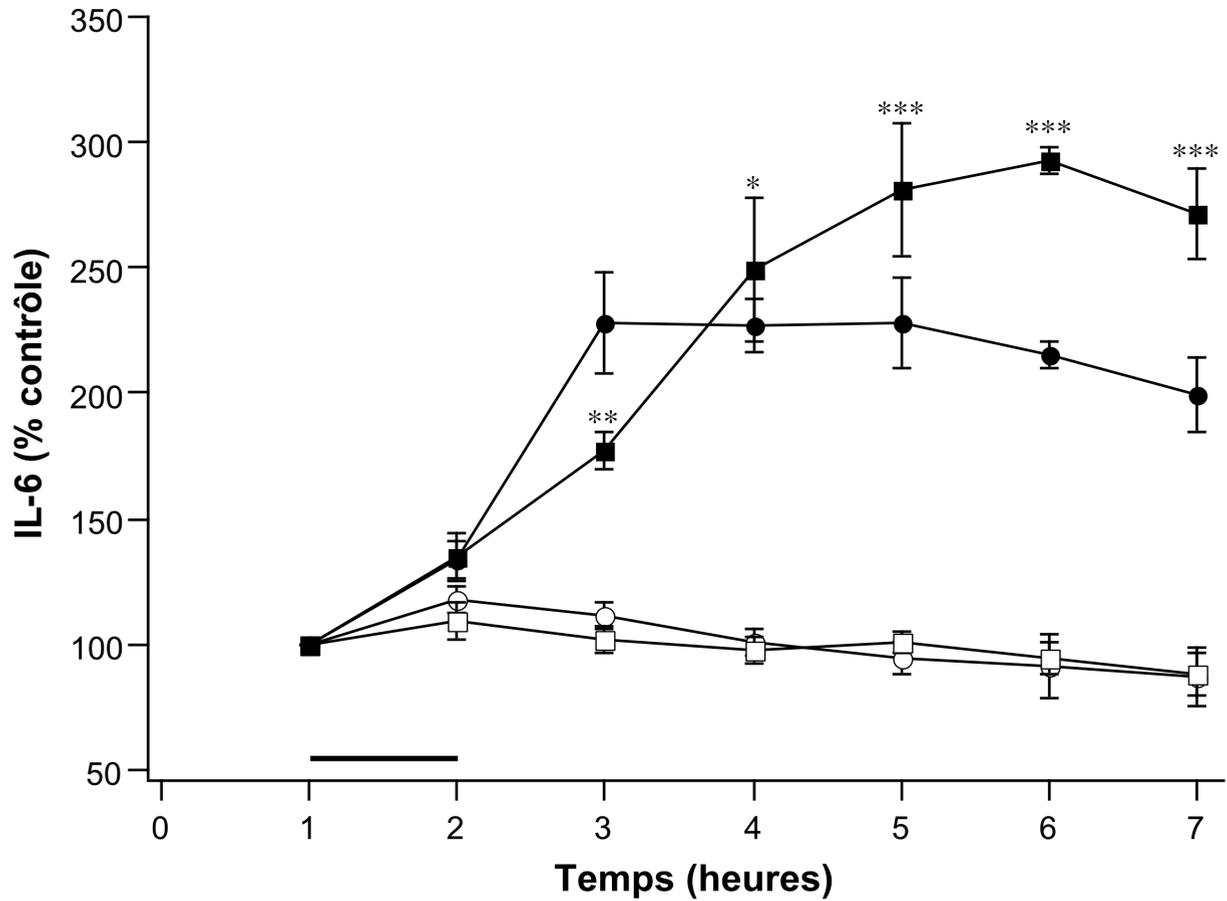


Figure 24 : Effet du blocage des jonctions gap sur la libération d'IL-6.

En dehors de toute stimulation, la libération d'IL-6 est stable en absence (μ) ou en présence (\square) de carbénoxolone. L'application de 100 mM de PACAP pendant une heure (barre noire) stimule la libération d'IL-6 (\bullet) qui se stabilise une heure après l'arrêt de la stimulation. En présence de carbénoxolone (\blacksquare), le plateau est atteint entre trois et quatre heures après la fin de la stimulation, avec une quantité libérée supérieure à celle obtenue en absence de carbénoxolone.

*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,005$ comparé à (\bullet).

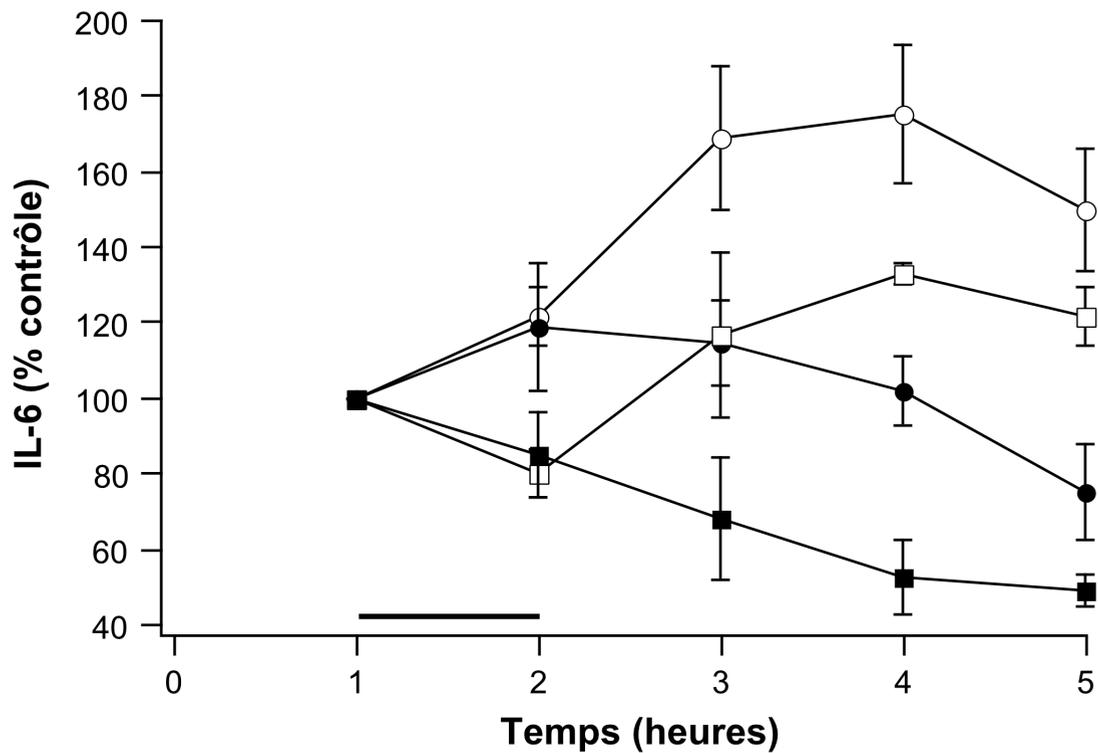


Figure 25 : Dosage d'IL-6 sur des tranches d'hypophyse en "Vaseline-gap".

Le PACAP (100 nM) est appliqué pendant une heure (barre noire) d'un seul côté de la tranche (□). La libération est inhibée des deux côtés pendant cette incubation. Pendant les trois heures suivantes, la quantité d'IL-6 libérée augmente du côté stimulé, mais diminue du côté contrôle (■).

L'expérience est répétée en présence de carbénoxolone. La libération est plus forte du côté stimulé (μ) par rapport à l'expérience précédente. L'effet inhibiteur sur le côté opposé (●) est bloqué par la carbénoxolone. On observe une légère augmentation de la production d'IL-6.

La première concerne les différences dans les quantités d'IL-6 libérées par des tranches issues d'une même hypophyse. La diminution de cette libération à mesure que les tranches sont issues des parties postérieures de la glande peut avoir deux explications. Les hypophyses sont coupées de la partie antérieure vers la partie postérieure. Les tranches successives ont séjourné de plus en plus longtemps dans un milieu à 4°C, et ont été soumises plus de fois à la vibration de la lame du vibratome. Il en résulte une moins bonne viabilité cellulaire que nous avons déjà constaté. L'inversion du sens de coupe devrait nous apporter des informations sur ce problème. Une localisation préférentielle des cellules FS vers les parties supérieures de la glande est également envisageable. 50 % de cellules dans la *Pars Tuberalis* sont des cellules FS, alors qu'il n'y en a qu'entre 5 et 10 % dans la *Pars Distalis* (Wittkowski *et al.*, 1999). Il pourrait ainsi exister un gradient rostro-caudal de cellules FS, au moins en ce qui concerne les phénomènes de libération d'IL-6.

Les quantités basales d'IL-6 libérées sont stables pendant au moins huit heures, même si des fluctuations de faible amplitude ont été observées. Ces fluctuations sont parallèles dans les tranches issues d'un même animal. L'origine de ces fluctuations est inconnue, mais pourrait refléter des changements dans l'activité intrinsèque du réseau, et une harmonisation de la libération d'IL-6 dans l'ensemble de la glande.

L'application de PACAP à 100 nM pendant une heure stimule la libération d'IL-6 une heure après la fin de l'incubation. Le délai observé entre l'application du neuropeptide et son effet sur la libération peut être dû au fait qu'il y a une synthèse *de novo* de la cytokine, et non à une libération à partir de réserves préexistantes. Des résultats similaires ont déjà été observés après application de LPS sur des cellules TtT/GF. Cette libération d'IL-6 est bloquée par la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction des ARNm (Lohrer *et al.*, 2000). Des données obtenues avec l'aide de Marie-Noëlle Matthieu et en collaboration avec le groupe de Werner Schlegel (Genève) favorisent également l'hypothèse selon laquelle le PACAP stimule directement l'expression du gène de l'IL-6 dans les cellules FS. Des cellules FS purifiées sur

gradient de Percoll ont été stimulées avec 100 nM de PACAP pendant des durées allant de 30 minutes à 4 heures. La quantité des ARNm de l'IL-6, mesurée grâce à un appareil de PCR quantitative Taqman®, est supérieure dans les cellules stimulées par rapport aux cellules contrôle. L'augmentation des ARNm de l'IL-6 est détectable au bout de 30 minutes d'incubation en présence de PACAP et atteint un maximum après une heure d'incubation. Toutefois, même si le PACAP a un effet direct sur des cellules FS en culture, on ne peut exclure un effet indirect *via* les cellules endocrines, la majorité d'entre elles exprimant des récepteurs du PACAP (Vigh *et al.*, 1993).

L'effet de la carbénoxolone montre que la communication intercellulaire par les jonctions gap est impliquée dans la production *in situ* d'IL-6 stimulée par le PACAP. Les informations qui transitent par ces canaux seraient de deux natures. D'une part, il existerait une information stimulatrice qui favoriserait une induction rapide de la libération d'IL-6. D'autre part, un message inhibiteur présenterait une phase d'activation plus lente que l'information stimulatrice et exercerait ensuite un effet stabilisant sur la production d'IL-6 pendant une période de plusieurs heures. Les expériences de "Vaseline-gap", bien que préliminaires, semblent abonder dans ce sens et suggèrent l'implication des jonctions gap dans le phénomène inhibiteur. Le PACAP présent d'un côté de la tranche a un effet légèrement inhibiteur durant son application, mais l'effet stimulateur apparaît pendant les heures qui suivent. Du côté non stimulé, on observe une inhibition croissante de la libération d'IL-6. En bloquant les jonctions gap, on retrouve l'effet stimulateur du PACAP, essentiellement du côté où il est appliqué.

Comment pourrait-on expliquer la propagation d'un signal « inhibiteur » via les jonctions gap ? Plusieurs types d'informations peuvent être transmis *via* ces jonctions. Il peut s'agir de seconds messagers diffusibles, ou d'une vague calcique comme décrit dans les chapitres précédents. Le PACAP stimule la production d'AMPc et la production d'IL-6 dans les cellules TtT/GF (Matsumoto *et al.*, 1993a). Il déclenche des réponses calciques dans les

cellules FS en culture (Yada *et al.*, 1993) et induit également des oscillations calciques régulières des cellules FS dans des tranches d'hypophyse de souris (Kunzelman *et al.*, 2000). Or, ce type de signaux calciques est important dans l'activation spécifique de facteurs de transcription (Dolmetsch *et al.*, 1997) et dans la sélectivité de l'expression de certaines cytokines (Dolmetsch *et al.*, 1998 ; Feske *et al.*, 2001). Le blocage des jonctions gap altère l'expression de cytokines dans des cultures de lymphocytes (Oviedo-Orta *et al.*, 2001). Une caractérisation pharmacologique des voies de transduction induites par le PACAP est maintenant nécessaire pour comprendre comment s'harmonise la production de cette cytokine au sein du réseau de cellules FS. Cette approche combinée avec la technique du "Vaseline-gap" pourrait permettre la mise en évidence d'un rôle des jonctions gap dans le contrôle spatio-temporel de l'expression d'un gène au sein d'un tissu.

Un aspect qui mériterait également d'être abordé serait de comprendre comment s'insèrent ces productions d'IL-6, apparemment décalées dans le temps (une à plusieurs heures) par rapport à l'arrivée du stimulus (PACAP dans notre cas), dans la régulation des sécrétions hormonales par les sécrétagogues hypothalamiques. L'IL-6 ayant une action directe sur la sécrétion de plusieurs hormones, il est envisageable qu'une pré-stimulation du réseau de cellules FS puisse avoir des effets décalés dans le temps sur l'activation ou l'inhibition d'un type précis de cellules endocrines.

Enfin, ces données renforcent l'importance de l'intégrité tissulaire pour pouvoir aborder un phénomène biologique comme la relation entre la production de cytokines et les fonctions hypophysaires. Le simple fait de stimuler la production d'IL-6 à partir de fragments de tissu plus ou moins représentatifs de la glande fonctionnelle (tranche épaisse frontale, demi-tranche exposée au stimulus, modification du couplage jonctionnel entre les cellules) amènent à des résultats sensiblement, mais significativement différents. Il en découlera très certainement une utilisation de plus en plus intensive de ces stratégies *in situ*, et ce en complément des approches *in vitro* sur des cellules hypophysaires isolées de leur contexte

tissulaire, afin d'appréhender au mieux les phénomènes biologiques qui gouvernent le fonctionnement de l'hypophyse antérieure.

DISCUSSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

L'ensemble de ce travail apporte des indices concernant le rôle énigmatique des cellules FS, en confirmant la réalité fonctionnelle du réseau qu'elles forment, en termes de communications intercellulaires. L'utilisation de tranches d'hypophyse a permis de répondre à cette question, souvent posée par de nombreux auteurs depuis la découverte de ces cellules. Mais cette préparation semble soulever à nouveau des questions qui ont souvent été éludées par l'utilisation de préparations éloignées du contexte tissulaire.

L'hypophyse antérieure est un organe doté d'une grande plasticité. Cette glande est en perpétuelle prolifération (Leblond and Walker, 1956), avec un taux de renouvellement pouvant atteindre 1,58 % par jour (Nolan *et al.*, 1998). Le contrôle de la prolifération des cellules lactotropes pendant la gestation et leur retour rapide par apoptose massive à leur niveau de base après la lactation montre la présence d'une grande coordination des événements cellulaires à l'échelle du tissu. La régulation fine de l'activité des cellules endocrines fait intervenir des éléments régulateurs provenant de l'hypothalamus, de l'hypophyse même et des organes périphériques. Cependant, la structure du tissu semble aller à l'encontre d'une distribution homogène de l'information à l'ensemble des cellules endocrines. En effet, nous avons montré au cours de ce travail qu'un dipeptide comme la carnosine, dont le poids moléculaire est de 226 Da, ne diffuse que très peu au sein des espaces intercellulaires. Il est difficilement concevable que les facteurs hypophysiotropes, dont le plus petit connu d'entre eux, la TRH, a un poids moléculaire de 363 Da, puissent diffuser sur de longues distances au sein du tissu une fois sorti des vaisseaux sanguins. Un relais entre les vaisseaux sanguins et les cellules endocrines éloignées est peut-être présent.

Un autre exemple frappant de cette coordination est le fait que l'hypophyse déconnectée de l'hypothalamus maintient une pulsativité dans ses sécrétions hormonales (Gambacianni *et al.*, 1987), qui n'est plus le résultat de la périodicité de libération des facteurs

hypothalamiques qui la contrôlent *in vivo*. Il existe une coordination dans l'espace et dans le temps de l'activité sécrétrice d'un type cellulaire. Or, la distribution des différents types endocrines au sein du parenchyme hypophysaire est hétérogène, et une série de contacts continus entre cellules granulaires est rare, au sein de ce tissu partiellement cloisonné en cordons (Vila-Porcile, 1972). Le couplage via les jonctions gap ne synchronise l'activité calcique que dans des foyers restreints de cellules endocrines (Guérineau *et al.*, 1998). Une communication rapide entre cellules endocrines sur une longue distance semble peu probable.

Il existe vraisemblablement au sein du lobe antérieur de l'hypophyse des mécanismes de communication rapide permettant l'harmonisation spatio-temporelle de l'activité des cellules endocrines d'un même type. L'existence d'un tel système de communication rapide est d'autant plus nécessaire que cette glande est dépourvue d'innervation.

Les cellules folliculostellaires pourraient constituer un tel mécanisme d'harmonisation. Comme nous l'avons démontré au cours de ce travail, elles forment un vaste réseau de cellules excitables au sein du tissu. L'excitabilité membranaire des cellules FS, qui peut paraître comme exotique pour une cellule non sécrétrice, est un des moyens de déclenchement de vagues calciques. Cette excitabilité procure également un processus régénératif, qui va permettre la propagation rapide de ces vagues sur de longues distances.

Cette vague calcique peut-elle influencer l'activité des cellules endocrines, et par quels mécanismes ? À ce stade de notre travail, nous ne disposons pas d'éléments de réponses précis, mais nous pouvons formuler plusieurs hypothèses. Ces vagues pourraient stimuler l'activité de la nNOS (Nathan and Xie, 1994) ou la libération Ca^{2+} -dépendante d'un messager paracrine comme l'ATP. Le NO et l'ATP agiraient sur la majorité des cellules endocrines hypophysaires.

Ces deux exemples évoquent un rôle global des cellules FS. Mais pourrait-il y avoir une modulation de l'activité d'un type cellulaire endocrine précis ? Si tel est le cas, soit l'information (vague calcique, seconds messagers...) transite le long du réseau par différents

chemins « privilégiés » qui vont aboutir à certaines cellules mais pas à d'autres, soit la spécificité du message va se situer au niveau du signal de sortie. Ces deux idées ne doivent pas être mutuellement exclusives. Dans le cas d'une spécificité dans les chemins empruntés, des différences dans l'expression de jonctions gap, ainsi qu'une modulation au cours du temps, devraient exister d'une cellule à l'autre. À ce titre, nous avons observé au cours d'enregistrements électrophysiologiques des variations de résistance d'entrée de certaines cellules, et donc sans doute du couplage jonctionnel. Les expériences de diffusion de neurobiotine ou de LY ont également montré que le couplage ne concerne pas toutes les cellules dans un champ. Nous n'avons jamais observé le couplage entre cellules FS et cellules endocrines qui a été décrit dans des cultures de cellules hypophysaires (Morand *et al.*, 1996). Des changements dans l'expression des connexines entre les deux modèles peuvent être la cause de cette différence. La présence dans les tranches d'un facteur qui inhibe ce couplage de manière tonique est également envisageable. Le couplage jonctionnel est sûrement un système modulable, dont l'état pourrait dépendre des facteurs environnants. Mais certainement l'argument le plus fort en faveur d'une sélectivité de transfert d'information dans l'arborescence du réseau de cellules FS provient de l'identification de vagues calciques intercellulaires spontanées qui apparaissent d'une manière restreinte dans certaines cellules FS (voir figure 21).

La présence dans certaines cellules de jonctions gap ayant des propriétés différentes de celles qui sont présentes dans d'autres cellules, en termes de conductances (White and Bruzzone, 1996), de dépendance vis-à-vis du potentiel (Brink, 2000) et de filtrage en fréquence du signal (Venance et al., 2000), est envisageable. Il s'agirait d'un moyen de constituer des voies sélectives de propagation pour une fréquence et/ou une amplitude du signal électrique, et donc de l'information qu'il contient en termes de signaux calciques. Ces mécanismes pourraient également influencer la diffusion de seconds messagers. Ceci expliquerait les différences dans le couplage et la dynamique des signaux calciques observées

dans certaines cellules dans des fenêtres de temps relativement courtes (moins d'une minute) (voir la cellule 7, figure 21). Une expression ou une régulation différente des canaux ioniques dans certaines cellules, qui favoriserait ou interromprait la propagation du signal, est également envisageable. Dans tous les mécanismes qui viennent d'être cités, l'influence des interactions proches (contacts cellulaires, paracrinie) entre un type cellulaire endocrine et les cellules FS sur l'expression différentielle de ces protéines prendrait tout son sens, puisqu'il y aurait un « balisage » de la route.

Considérons maintenant la possibilité d'une sélectivité dans le signal de sortie qui agit sur les cellules endocrines. Les cellules FS possèdent tout un « arsenal » pouvant réguler l'activité (sécrétion, prolifération...) des cellules endocrines *in vitro*, et ce en réponse à des stimuli d'origine centrale, intra-hypophysaire ou périphérique. Un de ces facteurs, libéré par l'ensemble du réseau, serait susceptible d'agir sur les cellules proches. Si l'on prend cette fois l'exemple de la iNOS, celle-ci est exprimée dans 15 à 20 % des cellules FS (Vankelecom *et al.*, 1997b). Il serait intéressant de savoir si cette sous-population de cellules FS présente une localisation préférentielle à proximité d'un type cellulaire précis.

Enfin, une double sélectivité dans le trajet suivi par l'information et la nature du signal émis est possible. Par exemple, des oscillations calciques induites par le PACAP (Kunzelman *et al.*, 2000) pourraient se propager le long du réseau. Des propriétés locales du couplage entre cellules FS dues à l'environnement de celles-ci pourraient modifier la dynamique des signaux calciques en amplitude et en fréquence dans différentes zones. Ces deux paramètres étant primordiaux pour la spécificité d'expression de certains gènes (Dolmetsch *et al.*, 1997 ; Dolmetsch *et al.*, 1998), les produits libérés dans ces différentes zones ne seraient pas les mêmes. On peut donc proposer que le PACAP stimule la production d'IL-6 dans des cellules du réseau proches des cellules lactotropes (par exemple), et de VEGF dans des cellules FS proches des vaisseaux.

Un tel réseau de communication rapide à longue distance dans l'hypophyse antérieure pourrait contribuer à en harmoniser le fonctionnement. En effet, l'activité globale de cette glande n'est pas le reflet de l'activité unitaire décrite jusqu'à présent dans des cellules endocrines dispersées de manière hétérogène au sein du tissu (Bonfont *et al.*, 2000). Une synchronisation des phases d'activité entre des foyers de cellules distantes pourrait s'effectuer, en empruntant cette « autoroute de l'information » que forme le réseau de cellules folliculostellaires.

Enfin, nos expériences, encore relativement préliminaires, concernant le lien entre la production d'IL-6 par les cellules FS et leurs activités en réseau devrait permettre de dégager des mécanismes de régulation hypophysaire encore peu abordés jusqu'à maintenant. Il est en effet fort possible, comme évoqué ci-dessus, que le couplage du réseau soit un facteur critique du contrôle d'expression du gène d'IL-6. Une des voies à suivre dans ce domaine sera très certainement de comprendre comment ce système de régulation génique (et de libération attenante d'IL-6) intervient dans le contrôle temporel des fonctions hypophysaires. Il est en effet vraisemblable qu'un facteur, comme le PACAP, induise une réponse à court terme (dans l'heure) sur des cellules endocrines, alors que son action indirecte, via la libération d'IL-6 par les cellules FS, ne serait pleinement effective que plusieurs heures après la stimulation par le neuropeptide et ce, en fonction du degré de couplage du réseau de cellules FS. Le réseau couplé serait plus rapide à répondre mais d'une manière moins intense (voir figure 24). La production d'IL-6 n'étant très certainement pas le seul mécanisme lié au degré de couplage du réseau de cellules FS, on peut alors imaginer de nombreuses régulations fines de l'hypophyse qui seraient en permanence ajustées en fonction de la dynamique du réseau.

PERSPECTIVES

Ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour des études futures visant à déterminer le rôle de cellules FS dans le fonctionnement de l'hypophyse. La préservation de l'intégrité tissulaire sera un des éléments primordiaux, d'où la nécessité d'utiliser des techniques peu invasives, comme les enregistrements électrophysiologiques et l'imagerie calcique.

L'analyse des relations spatio-temporelles entre l'activité calcique des cellules FS et celle des cellules endocrines sera nécessaire à la compréhension du rôle du réseau de cellules FS dans la l'harmonisation de l'activité de la glande. L'utilisation d'outils mathématiques (cross-correlation, simulation Monte-Carlo) sera primordiale pour l'analyse de ces phénomènes d'une grande complexité (Yuste *et al.*, 1995). L'utilisation de souris transgéniques exprimant la GFP sous contrôle du promoteur du gène d'une hormone hypophysaire (Magoulas *et al.*, 2000 ; Cowley *et al.*, 2001) permettrait de corréler ces observations à un type cellulaire endocrine précis. Les expériences de stimulation par un sécrétagogue hypothalamique d'un côté du « Vaseline-gap » et de dosages des hormones hypophysaires des deux côtés seront également importantes pour déterminer un éventuel rôle des cellules FS en tant que relais des informations provenant du système nerveux central.

La possibilité d'obtenir des populations de cellules FS pures par « Fluorescence-Assisted Cell Sorting » après une charge au β -Ala-Lys-N_ε-AMCA devrait faciliter l'analyse des gènes exprimés dans les cellules FS. Un faisceau de preuves convergentes semble indiquer une origine commune des cellules FS et des cellules endocrines. Or, chaque famille de cellule endocrine hypophysaire exprime un gène qui lui est spécifique, en l'occurrence celui d'une hormone, ainsi que certains facteurs de transcription permettant une spécification de chaque lignage (Dasen and Rosenfeld, 2001). L'identification d'un gène spécifique des cellules FS (qui pourrait être appelé gène SFS par la suite) permettrait d'envisager l'utilisation

de diverses techniques issues de la transgénèse, et ferait entrer les cellules FS dans l'ère de la génomique fonctionnelle.

Une des approches possibles pour connaître le rôle d'une population de cellules consiste à l'éliminer. On peut envisager la création d'une souris transgénique exprimant une protéine « tueuse » comme la nitroréductase (NTR) d'E. coli (Cui *et al.*, 2001), sous contrôle du promoteur du gène SFS, s'il existe et s'il présente un niveau d'expression suffisant. Dans ce cas, la drogue (CB 1954) dont le produit de dégradation par la NTR est toxique serait injectée par voie intra-péritonéale, et devrait conduire à la mort spécifique des cellules FS. Si le gène SFS n'existe pas, l'injection intra-hypophysaire de CB 1954 dans des souris exprimant la NTR sous contrôle du promoteur de la protéine S-100 devrait conduire à un résultat similaire. Ce genre de modèle devrait permettre d'aborder par des expériences relativement simples (immunomarquages, hybridation *in situ*, dosages d'hormones) le rôle des cellules FS *in vivo*. En particulier, la cinétique d'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien après injection de LPS chez des animaux dépourvus de cellules FS pourrait montrer que ces cellules sont une interface directe entre le système immunitaire et le système endocrine (figure 13). Un « knock-out » hypophysaire du gène de l'IL-6 procurerait également des informations intéressantes. Le rétrocontrôle périphérique sur les sécrétions hypophysaires pourrait également être perturbé chez ces animaux ainsi que la prolifération des cellules lactotropes pendant la gestation et leur apoptose après le sevrage des petits. Enfin, les animaux dont les hypophyses sont dépourvues de cellules FS devraient développer des adénomes hypophysaires induits par les oestrogènes plus rarement que des animaux normaux.

Si les cellules FS sont le mécanisme d'harmonisation et de relais que nous supposons, la libération pulsatile d'hormones dans des hypophyses sans cellules FS maintenues *in vitro* ne devrait plus exister, et devrait être fort perturbée *in vivo*. L'utilisation de la technique du « Vaseline-gap » sur des tranches d'hypophyses issues de tels animaux devrait fournir de

nombreux renseignements sur les éventuelles possibilités de communications intercellulaires à longue distance en absence du réseau de cellules FS.

À plus long terme, une approche plus fine consistant à faire exprimer le canal EKO (Electrical Knock Out) dans les cellules FS (White *et al.*, 2001) permettrait de déterminer le rôle de l'excitabilité dans la fonction des cellules FS. Ce canal potassique modifié présente une forte conductance, s'active à des potentiels très bas (-60 mV) et ne s'inactive pas, bloquant ainsi l'excitabilité des cellules.

Seul le développement de nouvelles technologies adaptées à l'étude des cellules FS dans leur environnement natif permettra de mettre à jour le rôle physiologique de ces cellules, rôle qui pourrait être primordial dans le fonctionnement de l'hypophyse antérieure, glande maîtresse du système endocrine.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Akita S., Webster J., Ren S.G., Takino H., Said J., Zand O. & Melmed S. (1995). Human and murine pituitary expression of leukemia inhibitory factor. Novel intrapituitary regulation of adrenocorticotropin hormone synthesis and secretion. *J Clin Invest* **95** (3), 1288-98.
- Akita S., Readhead C., Stefanescu L., Fine J., Tampanaru-Sarmesiu A., Kovacs K. & Melmed S. (1997). Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene forms Rathke's cleft cysts and impairs adult pituitary function. A model for human pituitary Rathke's cysts. *J Clin Invest* **99** (10), 2462-9.
- Allaerts W. & Denef C. (1989). Regulatory activity and topological distribution of folliculo-stellate cells in rat anterior pituitary cell aggregates. *Neuroendocrinology* **49** (4), 409-18.
- Allaerts W., Carmeliet P. & Denef C. (1990). New perspectives in the function of pituitary folliculo-stellate cells. *Mol Cell Endocrinol* **71** (2), 73-81.
- Allaerts W., Engelborghs Y., Van Oostveldt P. & Denef C. (1990). Evidence that folliculo-stellate cells do not impede the permeability of intercellular spaces to molecular diffusion in three-dimensional aggregate cell cultures of rat anterior pituitary. *Endocrinology* **127** (3), 1517-25.
- Allaerts W., Jeucken P.H., Hofland L.J. & Drexhage H.A. (1991). Morphological, immunohistochemical and functional homologies between pituitary folliculo-stellate cells and lymphoid dendritic cells. *Acta Endocrinol (Copenh)* **125** (Suppl 1), 92-7.
- Allaerts W., Fluitsma D.M., Hoefsmit E.C., Jeucken P.H., Morreau H., Bosman F.T. & Drexhage H.A. (1996). Immunohistochemical, morphological and ultrastructural resemblance between dendritic cells and folliculo-stellate cells in normal human and rat anterior pituitaries. *J Neuroendocrinol* **8** (1), 17-29.
- Allaerts W., Salomon B., Leenen P.J., van Wijngaardt S., Jeucken P.H., Ruuls S., Klatzmann D. & Drexhage H.A. (1997a). A population of interstitial cells in the anterior pituitary with a hematopoietic origin and a rapid turnover: a relationship with folliculo-stellate cells? *J Neuroimmunol* **78** (1-2), 184-97.
- Allaerts W., Jeucken P.H., Debets R., Hoefakker S., Claassen E. & Drexhage H.A. (1997b). Heterogeneity of pituitary folliculo-stellate cells: implications for interleukin-6 production and accessory function in vitro. *J Neuroendocrinol* **9** (1), 43-53.
- Allaerts W., Boonstra-Blom A.G., Peeters K., Janse E.M., Berghman L.R. & Jeurissen S.H. (1999). Prenatal development of hematopoietic and hormone-producing cells in the chicken adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol* **114** (2), 213-24.
- Allen D.L., Mitchner N.A., Uveges T.E., Nephew K.P., Khan S. & Ben-Jonathan N. (1997). Cell-specific induction of c-fos expression in the pituitary gland by estrogen. *Endocrinology* **138** (5), 2128-35.
- Amano O., Yoshitake Y., Nishikawa K. & Iseki S. (1993). Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in the rat pituitary gland. *Arch Histol Cytol* **56** (3), 269-76.
- Andersen H., von Bülow F.A. & Møllgård K. (1971). The early development of the pars distalis of human foetal pituitary gland. *Z. Anat. Entwickl.-Gesch.* **135**, 117-38.

- Arzt E., Buric R., Stelzer G., Stalla J., Sauer J., Renner U. & Stalla G.K. (1993). Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* **132** (1), 459-67.
- Auernhammer C.J., Chesnokova V. & Melmed S. (1998). Leukemia inhibitory factor modulates interleukin-1beta-induced activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* **139** (5), 2201-8.
- Bach M.A. & Bondy C.A. (1992). Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* **131** (6), 2588-94.
- Baes M., Allaerts W. & Deneef C. (1987a). Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* **120** (2), 685-91.
- Baes M. & Deneef C. (1987b). Evidence that stimulation of growth hormone release by epinephrine and vasoactive intestinal peptide is based on cell-to-cell communication in the pituitary. *Endocrinology* **120** (1), 280-90.
- Baeuerle P.A. & Henkel T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* **12**, 141-79.
- Baird A., Esch F., Bohlen P., Ling N. & Gospodarowicz D. (1985). Isolation and partial characterization of an endothelial cell growth factor from the bovine kidney: homology with basic fibroblast growth factor. *Regul Pept* **12** (3), 201-13.
- Baker B.L., Pek S., Midgley A.R.J. & Gersten B.E. (1970). Identification of the corticotropin cell in rat hypophysis with peroxidase-labeled antibody. *Anat. Rec.* **166**, 557-68.
- Baker B.L. & Yu Y.Y. (1971a). The thyrotropic cell of the of the rat hypophysis as studied with peroxidase-labeled antibody. *Am. J. Anat.* **131**, 55-72.
- Baker B.L. & Yu Y.Y. (1971b). hypophyseal changes induced by thyroid deficiency and thyroxine administration as revealed by immunochemical staining. *Endocrinology* **89**, 996-1004.
- Bambauer H.J., Ueno S., Umar H. & Ueck M. (1985). Histochemical and cytochemical demonstration of Ca⁺⁺-ATPase activity in the stellate cells of the adenohypophysis of the guinea pig. *Histochemistry* **83** (3), 195-200.
- Banchereau J. & Steinman R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392** (6673), 245-52.
- Banerjee S.K., Sarkar D.K., Weston A.P., De A. & Campbell D.R. (1997). Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* **18** (6), 1155-61.
- Baur A., Bauer K., Jarry H. & Kohrle J. (2000). Effects of proinflammatory cytokines on anterior pituitary 5'-deiodinase type I and type II. *J Endocrinol* **167** (3), 505-15.

- Belluardo N., Mudò G., Trovato-Salinaro A., Le Gurun S., Charollais A., Serre-Beinier V., Amato G., Haefliger J.A., Meda P. & Condorelli D.F. (2000). Expression of connexin36 in the adult and developing rat brain. *Brain Res* **865** (1), 121-38.
- Berger U.V. & Hediger M.A. (2000). Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* **421** (3), 385-99.
- Bergland R.M. & Torack P.M. (1969). An ultrastructural study of follicular cells in the human anterior pituitary. *Am. J. Pathol.* **57**, 273-97.
- Besecke L.M., Guendner M.J., Sluss P.A., Polak A.G., Woodruff T.K., Jameson J.L., Bauer-Dantoin A.C. & Weiss J. (1997). Pituitary follistatin regulates activin-mediated production of follicle-stimulating hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **138** (7), 2841-8.
- Betchaku T. & Douglas W.W. (1981). Cellular composition of the rostral pars distalis of the anterior pituitary gland of alewife, *Alosa pseudoharengus*, during the spawning run. *Anat. Rec.* **199**, 403-21.
- Bethin K.E., Vogt S.K. & Muglia L.J. (2000). Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (16), 9317-22.
- Bilezikjian L.M., Turnbull A.V., Corrigan A.Z., Blount A.L., Rivier C.L. & Vale W.W. (1998). Interleukin-1beta regulates pituitary follistatin and inhibin/activin betaB mRNA levels and attenuates FSH secretion in response to activin-A. *Endocrinology* **139** (7), 3361-4.
- Bonnefont X., Fiekers J., Creff A. & Mollard P. (2000). Rhythmic bursts of calcium transients in acute anterior pituitary slices. *Endocrinology* **141** (3), 868-75.
- Borst J.G., Lodder J.C., Roubos E.W. & Kits K.S. (1996). In situ recordings of presumed folliculo-stellate cells in the intermediate lobe of the pituitary gland of *Xenopus laevis*. *Neurosci Lett* **209** (1), 61-4.
- Brink P. (2000). Gap junction voltage dependence. A clear picture emerges. *J Gen Physiol* **116** (1), 11-2.
- Brown K., Gerstberger S., Carlson L., Franzoso G. & Siebenlist U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267** (5203), 1485-8.
- Brunetti L., Ragazzoni E., Preziosi P. & Vacca M. (1995). A possible role for nitric oxide but not for prostaglandin E2 in basal and interleukin-1-beta-induced PRL release in vitro. *Life Sci* **56** (15), L277-83.
- Bulant M., Roussel J.P., Astier H., Nicolas P. & Vaudry H. (1990). Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biologically active peptide, prepro-TRH-(160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (12), 4439-43.

- Cardell R.R., Jr. (1969). The ultrastructure of stellate cells in the pars distalis of the salamander pituitary gland. *Am J Anat* **126** (4), 429-55.
- Cardin J., Carbajal M.E. & Vitale M.L. (2000). Biochemical and morphological diversity among folliculo-stellate cells of the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary. *Gen Comp Endocrinol* **120** (1), 75-87.
- Carmeliet P. & Deneef C. (1988). Immunocytochemical and pharmacological evidence for an intrinsic cholinomimetic system modulating prolactin and growth hormone release in rat pituitary. *Endocrinology* **123** (2), 1128-39.
- Carmeliet P. & Deneef C. (1989). Synthesis and release of acetylcholine by normal and tumoral pituitary corticotrophs. *Endocrinology* **124** (5), 2218-27.
- Carmeliet P., Vankelecom H., Van Damme J., Billiau A. & Deneef C. (1991). Release of interleukin-6 from anterior pituitary cell aggregates: developmental pattern and modulation by glucocorticoids and forskolin. *Neuroendocrinology* **53** (1), 29-34.
- Carter D.A. (1995). Leukaemia inhibitory factor expression in cultured rat anterior pituitary is regulated by glucocorticoids. *J Neuroendocrinol* **7** (8), 623-8.
- Catterall W.A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 521-55.
- Ceccatelli S., Hulting A.L., Zhang X., Gustafsson L., Villar M. & Hokfelt T. (1993). Nitric oxide synthase in the rat anterior pituitary gland and the role of nitric oxide in regulation of luteinizing hormone secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (23), 11292-6.
- Chen Z.P., Kratzmeier M., Levy A., McArdle C.A., Poch A., Day A., Mukhopadhyay A.K. & Lightman S.L. (1995). Evidence for a role of pituitary ATP receptors in the regulation of pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (11), 5219-23.
- Chen L., Maruyama D., Sugiyama M., Sakai T., Mogi C., Kato M., Kurotani R., Shirasawa N., Takaki A., Renner U., Kato Y. & Inoue K. (2000). Cytological characterization of a pituitary folliculo-stellate-like cell line, Tpit/F1, with special reference to adenosine triphosphate-mediated neuronal nitric oxide synthase expression and nitric oxide secretion. *Endocrinology* **141** (10), 3603-10.
- Chesnokova V., Auernhammer C.J. & Melmed S. (1998). Murine leukemia inhibitory factor gene disruption attenuates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress response. *Endocrinology* **139** (5), 2209-16.
- Chesnokova V. & Melmed S. (2000). Leukemia inhibitory factor mediates the hypothalamic pituitary adrenal axis response to inflammation. *Endocrinology* **141** (11), 4032-40.
- Childs G.V. (1992). Structure-function correlates in the corticotropes of the anterior pituitary. *Front Neuroendocrinol* **13** (3), 271-317.
- Christian H.C., Taylor A.D., Flower R.J., Morris J.F. & Buckingham J.C. (1997). Characterization and localization of lipocortin 1-binding sites on rat anterior pituitary cells by fluorescence-activated cell analysis/sorting and electron microscopy. *Endocrinology* **138** (12), 5341-51.

- Christopoulos G., Perry K.J., Morfis M., Tilakaratne N., Gao Y., Fraser N.J., Main M.J., Foord S.M. & Sexton P.M. (1999). Multiple amylin receptors arise from receptor activity-modifying protein interaction with the calcitonin receptor gene product. *Mol Pharmacol* **56** (1), 235-42.
- Chronwall B.M., Sands S.A., Cummings K.C., 3rd & Schwartz J.P. (2000). Glial somatostatin-14 expression in the rat pituitary intermediate lobe: a possible neurotrophic function during development? *Int J Dev Neurosci* **18** (7), 685-92.
- Ciocca D.R., Rodriguez E.M. & Cuello C.A. (1979). Comparative light and electron microscopic study of the normal adenohypophysis in the human. *Acta Anatom.* **103**, 83-99.
- Ciocca D.R., Puy L.A. & Stati A.D. (1984). Constitution and behavior of follicular structures in the human anterior pituitary gland. *Am. J. Pathol.* **115**, 165-74.
- Coates P.J. & Doniach I. (1988). Development of folliculo-stellate cells in the human pituitary. *Acta Endocrinol (Copenh)* **119** (1), 16-20.
- Correr S. & Motta P.M. (1985). A scanning electron-microscopic study of "supramarginal cells" in the pituitary cleft of the rat. *Cell Tissue Res* **241** (2), 275-81.
- Cowley M.A., Smart J.L., Rubinstein M., Cerdan M.G., Diano S., Horvath T.L., Cone R.D. & Low M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411** (6836), 480-4.
- Coya R., Alvarez C.V., Perez F., Gianzo C. & Dieguez C. (1999). Effects of TGF-beta1 on prolactin synthesis and secretion: an in-vitro study. *J Neuroendocrinol* **11** (5), 351-60.
- Cui W., Allen N.D., Skynner M., Gusterson B. & Clark A.J. (2001). Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia* **34** (4), 272-82.
- Danila D.C., Zhang X., Zhou Y., Dickersin G.R., Fletcher J.A., Hedley-Whyte E.T., Selig M.K., Johnson S.R. & Klibanski A. (2000). A human pituitary tumor-derived folliculostellate cell line. *J Clin Endocrinol Metab* **85** (3), 1180-7.
- Dasen J.S. & Rosenfeld M.G. (2001). Signaling and transcriptional mechanisms in pituitary development. *Annu Rev Neurosci* **24**, 327-55.
- de Koning H.P., Jenks B.G., Scheenen W.J., de Rijk E.P., Caris R.T. & Roubos E.W. (1991). Indirect action of elevated potassium and neuropeptide Y on alpha MSH secretion from the pars intermedia of *Xenopus laevis*: a biochemical and morphological study. *Neuroendocrinology* **54** (1), 68-76.
- de Rijk E.P., Crujisen P.M., Jenks B.G. & Roubos E.W. (1991). [125I]Bolton-Hunter neuropeptide-Y-binding sites on folliculo-stellate cells of the pars intermedia of *Xenopus laevis*: a combined autoradiographic and immunocytochemical study. *Endocrinology* **128** (2), 735-40.
- Denef C., Maertens P., Allaerts W., Mignon A., Robberecht W., Swennen L. & Carmeliet P. (1989). Cell-to-cell communication in peptide target cells of anterior pituitary. *Methods Enzymol* **168**, 47-71.

- Dieck S.T., Heuer H., Ehrchen J., Otto C. & Bauer K. (1999). The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys- Nepsilon-AMCA in astrocytes. *Glia* **25** (1), 10-20.
- Dingemans (1970) in *VIIè Congr. Int. Microsc. Electron.* (Favard P. ed, Grenoble), Vol. 3, pp. 563-4.
- Dingemans K.P. & Feltkamp C.A. (1972). Nongranulated cells in the mouse adenohypophysis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **129** (3), 387-405.
- Dolmetsch R.E., Lewis R.S., Goodnow C.C. & Healy J.I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386** (6627), 855-8.
- Dolmetsch R.E., Xu K. & Lewis R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392** (6679), 933-6.
- Donato R. (1999). Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* **1450** (3), 191-231.
- Du J., Sudo T., Sakuma Y. & Kato M. (2000). Angiotensin II increases intracellular Ca⁽²⁺⁾ concentration in folliculo-stellate cells of the rat anterior pituitary in primary culture. *Brain Res* **859** (1), 167-8.
- Dubois P. & Girod C. (1970). Les cellules ciliées de l'antéhypophyse. Etude au microscope électronique. *Z. Zellforsch.* **103**, 502-17.
- Duvilanski B.H., Zambruno C., Seilicovich A., Pisera D., Lasaga M., Diaz M.C., Belova N., Rettori V. & McCann S.M. (1995). Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (1), 170-4.
- el-sherif G. & Bacsy E. (1989). Ultrastructural study of the Ca²⁺-dependent ATPase activity in rat adenohypophyseal cells. *Histochemistry* **91** (6), 501-5.
- Enkvist M.O. & McCarthy K.D. (1994). Astroglial gap junction communication is increased by treatment with either glutamate or high K⁺ concentration. *J Neurochem* **62** (2), 489-95.
- Fan L. & Iseki S. (1998). Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor in the endocrine glands of the rat. *Arch Histol Cytol* **61** (1), 17-28.
- Farnoud M.R., Kujas M., Derome P., Racadot J., Peillon F. & Li J.Y. (1994). Interactions between normal and tumoral tissues at the boundary of human anterior pituitary adenomas. An immunohistochemical study. *Virchows Arch* **424** (1), 75-82.
- Farquhar M.G. (1957). "Corticotrophs" of the rat adenohypophysis as revealed by electron microscopy (Abstr.). *Anat. Rec.* **127**, 291.
- Farquhar M.G., Stutelsky E.H. & Hopkins C.R. (1975) Structure and function of anterior pituitary and dispersed pituitary cells. In vitro studies. Dans *The anterior pituitary gland*, ed. Tixier-Vidal A. F., M.G. (Academic Press, New-york), pp. 82-135.

- Farrell W.E. & Clayton R.N. (2000). Molecular pathogenesis of pituitary tumors. *Front Neuroendocrinol* **21** (3), 174-98.
- Fauquier T., Guérineau N.C., McKinney R.A., Bauer K. & Mollard P. (2001). Folliculostellate cell network: a route for long-distance communication in the anterior pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (15), 8891-6.
- Fernandez-Moran H. & Luft R. (1949). Submicroscopic cytoplasmic granules in the anterior lobe cells of the rat hypophysis as revealed by electron microscopy. *Acta Endocrinol.* **2**, 199-211.
- Ferrara N., Goldsmith P., Fujii D. & Weiner R. (1986). Culture and characterization of follicular cells of the bovine anterior pituitary and pars tuberalis. *Methods Enzymol* **124**, 245-53.
- Ferrara N., Schweigerer L., Neufeld G., Mitchell R. & Gospodarowicz D. (1987a). Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (16), 5773-7.
- Ferrara N., Fujii D.K., Goldsmith P.C., Widdicombe J.H. & Weiner R.I. (1987b). Transport epithelial characteristics of cultured bovine pituitary follicular cells. *Am J Physiol* **252** (3 Pt 1), E304-12.
- Ferrara N. & Gospodarowicz D. (1988). Regulation of ion transport in hypophysial pars intermedia follicular cell monolayers. *Biochem Biophys Res Commun* **157** (3), 1376-82.
- Ferrara N. & Henzel W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **161** (2), 851-8.
- Ferrara N. & Alitalo K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* **5** (12), 1359-64.
- Ferrer J. (1956). Histophysiology of the pituitary cleft and colloid cysts in the adenohypophysis of the rat. Changes after gonadectomy and adrenalectomy. *J. Endocr.* **13**, 349-53.
- Feske S., Giltman J., Dolmetsch R., Staudt L.M. & Rao A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* **2** (4), 316-24.
- Findell P.R. & Weiner R.I. (1988). Bovine pituitary folliculo-stellate cells have beta-adrenergic receptors positively coupled to adenosine 3',5'-cyclic monophosphate production. *Endocrinology* **123** (5), 2454-61.
- Fletcher W.H. (1975). Intercellular communication in the rat anterior pituitary gland. An in vivo and in vitro study. *J. Cell. Biol.* **67**, 469-76.
- Foster C.L. (1971). Relationship between ultrastructure and function in the adenohypophysis of the rabbit. *Mem. Soc. Endocrino.* **19**, 125-46.

- Fox J., Lowe S.H., Conklin R.L., Petty B.A. & Nemeth E.F. (1999). Calcimimetic compound NPS R-568 stimulates calcitonin secretion but selectively targets parathyroid gland Ca(2+) receptor in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **290** (2), 480-6.
- Frémont P.H. & Ferrand R. (1980). The differentiation of follicular-like cells from the epithelium of Rathke's pouch grown *in vitro*. *Anat. Embryol.* **160**, 275-84.
- Galarreta M. & Hestrin S. (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* **402** (6757), 72-5.
- Girod C. & Lheritier M. (1981). Ultrastructure des cellules folliculo-stellaires de la pars distalis de l'hypophyse chez le spermophile (*Citellus variegatus* Erxleben), le graphiure (*Graphurium murinus* Desmaret) et le hérisson (*Erinaceus europaeus* Linnaeus). *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**, 105-22.
- Girod C., Trouillas J. & Dubois M.P. (1985). Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the anterior lobe of the normal human pituitary. *Cell Tissue Res* **241** (3), 505-11.
- Girod C., Trouillas J., Raccurt M. & Dubois M.P. (1986). Immunocytochemical localization of S-100 protein in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the adenohypophysis in the monkeys *Macaca irus* and *Cercopithecus aethiops*. *Cell Tissue Res* **246** (2), 237-42.
- Gloddek J., Pagotto U., Paez Pereda M., Arzt E., Stalla G.K. & Renner U. (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol* **160** (3), 483-90.
- Golenbock D.T., Bach R.R., Lichenstein H., Juan T.S., Tadavarthy A. & Moldow C.F. (1995). Soluble CD14 promotes LPS activation of CD14-deficient PNH monocytes and endothelial cells. *J Lab Clin Med* **125** (5), 662-71.
- Gonzalez L.C., Pinilla L., Tena-Sempere M., Dieguez C., Casanueva F.F. & Aguilar E. (2000). Effect of acute immunoneutralization of endogenous leptin on prolactin and LH secretion during the afternoon of pro-oestrus or in steroid-treated ovariectomized female rats. *J Reprod Fertil* **118** (1), 39-45.
- Gospodarowicz D. & Lau K. (1989). Pituitary follicular cells secrete both vascular endothelial growth factor and follistatin. *Biochem Biophys Res Commun* **165** (1), 292-8.
- Gracia-Navarro F., Porter D., Garcia-Navarro S. & Licht P. (1989). Immunocytochemical and ultrastructural study of the frog (*Rana pipiens*) pars distalis with special reference to folliculo-stellate cell function during *in vitro* superfusion. *Cell Tissue Res* **256** (3), 623-30.
- Gray C.M. & McCormick D.A. (1996). Chattering cells: superficial pyramidal neurons contributing to the generation of synchronous oscillations in the visual cortex. *Science* **274** (5284), 109-13.
- Guérineau N.C., Bonnefont X., Stoeckel L. & Mollard P. (1998). Synchronized spontaneous Ca²⁺ transients in acute anterior pituitary slices. *J Biol Chem* **273** (17), 10389-95.

- Gunzl H.J. & Saeger W. (1988). Immunogenic functions of folliculo-stellate cells of the normal human pituitary? *Pathol Res Pract* **183** (5), 634-5.
- Haimoto H., Hosada Y. & Kato K. (1987). Differential distribution of immunoreactive S-100- α and S-100- β proteins in normal non-nervous human tissues. *Lab. Invest.* **57**, 489-98.
- Halliday W.C., Asa S.L., Kovacs K. & Scheithauer B.W. (1990). Intermediate filaments in the human pituitary gland: an immunohistochemical study. *Can J Neurol Sci* **17** (2), 131-6.
- Hanna F.W., Smith D.M., Johnston C.F., Akinsanya K.O., Jackson M.L., Morgan D.G., Bhogal R., Buchanan K.D. & Bloom S.R. (1995). Expression of a novel receptor for the calcitonin peptide family and a salmon calcitonin-like peptide in the alpha-thyrotrophin thyrotroph cell line. *Endocrinology* **136** (6), 2377-82.
- Harrisson F., Van Hoof J. & Vakaet L. (1982). The relationship between the folliculo-stellate network and the thyrotropic cells of the avian adenohypophysis. *Cell Tissue Res* **226** (1), 97-111.
- Hart G.R., Gowing H. & Burrin J.M. (1992). Effects of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, on pituitary hormone release in rats. *J Endocrinol* **134** (1), 33-41.
- Hentges S., Boyadjieva N. & Sarkar D.K. (2000a). Transforming growth factor-beta3 stimulates lactotrope cell growth by increasing basic fibroblast growth factor from folliculo-stellate cells. *Endocrinology* **141** (3), 859-67.
- Hentges S., Pastorcic M., De A., Boyadjieva N. & Sarkar D.K. (2000b). Opposing actions of two transforming growth factor-beta isoforms on pituitary lactotropic cell proliferation. *Endocrinology* **141** (4), 1528-35.
- Hilton J.M., Mitchelhill K.I., Pozvek G., Dowton M., Quiza M. & Sexton P.M. (1998). Purification of calcitonin-like peptides from rat brain and pituitary. *Endocrinology* **139** (3), 982-92.
- Hofler H., Walter G.F. & Denk H. (1984a). Immunohistochemistry of folliculo-stellate cells in normal human adenohypophyses and in pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* **65** (1), 35-40.
- Hofler H., Denk H. & Walter G.F. (1984b). Immunohistochemical demonstration of cytokeratins in endocrine cells of the human pituitary gland and in pituitary adenomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **404** (4), 359-68.
- Hopkins C.R. & Farquhar M.G. (1973). Hormone secretion by cells dissociated from rat anterior pituitaries. *J. Cell. Biol.* **59**, 276-303.
- Horvath E., Kovacs K., Penz G. & Ezrin C. (1974). Origin, possible function and fate of "follicular cells" in the anterior lobe of the human pituitary. An electron microscopic study. *Am. J. Pathol.* **77**, 199-212.
- Horvath E. & Kovacs K. (1988). Fine structural cytology of the adenohypophysis in rat and man. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)* **8**, 401-32.

- Inoue K., Matsumoto H., Koyama C., Shibata K., Nakazato Y. & Ito A. (1992). Establishment of a folliculo-stellate-like cell line from a murine thyrotropic pituitary tumor. *Endocrinology* **131** (6), 3110-6.
- Inoue K., Couch E.F., Takano K. & Ogawa S. (1999). The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Arch Histol Cytol* **62** (3), 205-18.
- Ishikawa H., Nogami H. & Shirasawa N. (1983). Novel clonal strains from adult rat anterior pituitary producing S-100 protein. *Nature* **303** (5919), 711-3.
- Iwaki T., Kondo A., Takeshita I., Nakagaki H., Kitamura K. & Tateishi J. (1986). Proliferating potential of folliculo-stellate cells in human pituitary adenomas. Immunohistochemical and electron microscopic analysis. *Acta Neuropathol* **71** (3-4), 233-42.
- Jabbour H.N., Boddy S.C. & Lincoln G.A. (1997). Pattern and localisation of expression of vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1 in the ovine pituitary gland: expression is independent of hypothalamic control. *Mol Cell Endocrinol* **134** (2), 91-100.
- Jamen F., Persson K., Bertrand G., Rodriguez-Henche N., Puech R., Bockaert J., Ahren B. & Brabet P. (2000). PAC1 receptor-deficient mice display impaired insulinotropic response to glucose and reduced glucose tolerance. *J Clin Invest* **105** (9), 1307-15.
- Jarry H., Leonhardt S., Schmidt W.E., Creutzfeldt W. & Wuttke W. (1992). Contrasting effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on in vivo and in vitro prolactin and growth hormone release in male rats. *Life Sci* **51** (11), 823-30.
- Jin L., Zhang S., Burguera B.G., Couce M.E., Osamura R.Y., Kulig E. & Lloyd R.V. (2000). Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* **141** (1), 333-9.
- Jin L., Tsumanuma I., Ruebel K.H., Bayliss J.M. & Lloyd R.V. (2001). Analysis of homogeneous populations of anterior pituitary folliculostellate cells by laser capture microdissection and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrinology* **142** (5), 1703-9.
- Jones T.H., Justice S., Price A. & Chapman K. (1991). Interleukin-6 secreting human pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* **73** (1), 207-9.
- Jones T.H., Daniels M., James R.A., Justice S.K., McCorkle R., Price A., Kendall-Taylor P. & Weetman A.P. (1994). Production of bioactive and immunoreactive interleukin-6 (IL-6) and expression of IL-6 messenger ribonucleic acid by human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **78** (1), 180-7.
- Jover Moyano A. & Rivera Pomar J.M. (1970). Ultraestructura de las cavidades y celulas foliculares en la hipofisis del pollo (*Gallus domesticus*). *Anales de anatomia (Zaragoza)* **19**, 61-73.
- Kagayama M. (1965). The follicular in the pars distalis of dog pituitary: an electron microscope study. *Endocrinology* **77**, 1053-60.

- Kaiser U.B., Lee B.L., Carroll R.S., Unabia G., Chin W.W. & Childs G.V. (1992). Follistatin gene expression in the pituitary: localization in gonadotropes and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinology* **130** (5), 3048-56.
- Kameda Y. (1990). Occurrence of colloid-containing follicles and ciliated cysts in the hypophysial pars tuberalis from guinea pigs of various ages. *Am J Anat* **188** (2), 185-98.
- Katayama T., Shiota K., Sugino H. & Takahashi M. (1992). Paracrine effect of folliculostellate cells on the growth factor-like action of activin A in anterior pituitary cultures. *Endocrinol Jpn* **39** (3), 289-97.
- Katayama T., Nakashima M., Kyan H., Murakami N. & Kuroda H. (2000). A role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) as a regulator of paracrine interactions between folliculo-stellate cells and gonadotropes through the control of activin-follistatin interactions. *J Vet Med Sci* **62** (7), 731-6.
- Kato M. (1992). Involvement of nitric oxide in growth hormone (GH)-releasing hormone-induced GH secretion in rat pituitary cells. *Endocrinology* **131** (5), 2133-8.
- Kiriyama Y., Tsuchiya H., Murakami T., Satoh K. & Tokumitsu Y. (2001). Calcitonin induces IL-6 production via both PKA and PKC pathways in the pituitary folliculo-stellate cell line. *Endocrinology* **142** (8), 3563-9.
- Kishimoto T. (1994). Signal transduction through homo- or heterodimers of gp130. *Stem Cells* **12** (Suppl 1), 37-44; discussion -5.
- Kobayashi H., Fukata J., Murakami N., Usui T., Ebisui O., Muro S., Hanaoka I., Inoue K., Imura H. & Nakao K. (1997). Tumor necrosis factor receptors in the pituitary cells. *Brain Res* **758** (1-2), 45-50.
- Koike K., Sakamoto Y., Sawada T., Ohmichi M., Kanda Y., Nohara A., Hirota K., Kiyama H. & Miyake A. (1994). The production of CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, in rat anterior pituitary gland. *Biochem Biophys Res Commun* **202** (1), 161-7.
- Koike K., Zhang Z.X., Sakamoto Y., Kanda Y., Murakami K., Miyake A. & Inoue M. (1997). The pituitary folliculo-stellate cell line TtT/GF augments basal and TRH-induced prolactin secretion by GH3 cell. *Life Sci* **61** (25), 2491-7.
- Koike K., Zhang Z.X., Sakamoto Y., Jikihara H., Masuhara K., Murakami K., Miyake A. & Inoue M. (1998a). The herbal medicine unkei-to stimulates cytokine-induced neutrophil chemoattractant production in the pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF). *Am J Reprod Immunol* **39** (4), 249-55.
- Koike K., Zhang Z.X., Sakamoto Y., Miyake A. & Inoue M. (1998b). Evidence that folliculostellate cells mediate the inhibitory effect of Japanese kampo medicine, unkei-to, on growth hormone secretion in rat anterior pituitary cell cultures. *Am J Reprod Immunol* **39** (3), 217-22.
- Koyama T., Ohara M., Ichimura M. & Saito M. (1988). Effect of Japanese kampo medicine on hypothalamic-pituitary-ovarian function in women with ovarian insufficiency. *Am J Chin Med* **16** (1-2), 47-55.

- Koyama T., Shimoji Y., Ohara M., Yaguchi T. & Aso T. (1991). Effect of unkeito on hypothalamic LH-RH, pituitary LH and FSH in immature female rats. *Jpn J Fertil Steril* **36**, 621-5.
- Kunzelmann P., Creff A., Bauer K. & Mollard P. (2000). PACAP and VIP induce changes in cytosolic calcium in putative folliculostellate cells of the mouse pituitary. *Ann N Y Acad Sci* **921**, 410-4.
- Kurono C. (1996). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: VI. Development of gap junctions between folliculo-stellate cells under the influence of ovariectomy and sex steroids in the female rat. *Anat Rec* **244** (3), 366-73.
- Kurotani R., Tahara S., Sanno N., Teramoto A., Mellon P.L., Inoue K., Yoshimura S. & Osamura R.Y. (1999). Expression of ptx1 in the adult rat pituitary glands and pituitary cell lines: hormone-secreting cells and folliculo-stellate cells. *Cell Tissue Res* **298** (1), 55-61.
- Ladram A., Bulant M., Delfour A., Montagne J.J., Vaudry H. & Nicolas P. (1994). Modulation of the biological activity of thyrotropin-releasing hormone by alternate processing of pro-TRH. *Biochimie* **76** (3-4), 320-8.
- Lanctôt C., Lamolet B. & Drouin J. (1997). The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm. *Development* **124** (14), 2807-17.
- Leung D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D.V. & Ferrara N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246** (4935), 1306-9.
- Levitan I., Almonte C., Mollard P. & Garber S.S. (1995). Modulation of a volume-regulated chloride current by F-actin. *J Membr Biol* **147** (3), 283-94.
- Li J.Y. (1980). L'antéhypophyse foetale humaine in vitro. Univ Claude Bernard, Lyon 1, France.
- Ling N., Ying S.Y., Ueno N., Shimasaki S., Esch F., Hotta M. & Guillemin R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* **321** (6072), 779-82.
- Lohrer P., Gloddek J., Nagashima A.C., Korali Z., Hopfner U., Pereda M.P., Arzt E., Stalla G.K. & Renner U. (2000). Lipopolysaccharide directly stimulates the intrapituitary interleukin-6 production by folliculostellate cells via specific receptors and the p38alpha mitogen-activated protein kinase/nuclear factor-kappaB pathway. *Endocrinology* **141** (12), 4457-65.
- Lohrer P., Gloddek J., Hopfner U., Losa M., Uhl E., Pagotto U., Stalla G.K. & Renner U. (2001). Vascular Endothelial Growth Factor Production and Regulation in Rodent and Human Pituitary Tumor Cells in vitro. *Neuroendocrinology* **74** (2), 95-105.
- Lyson K. & McCann S.M. (1992). Induction of adrenocorticotrophic hormone release by interleukin-6 in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* **650**, 182-5.

- Magoulas C., McGuinness L., Balthasar N., Carmignac D.F., Sesay A.K., Mathers K.E., Christian H., Candeil L., Bonnefont X., Mollard P. & Robinson I.C. (2000). A secreted fluorescent reporter targeted to pituitary growth hormone cells in transgenic mice. *Endocrinology* **141** (12), 4681-9.
- Marin F., Boya J., Lopez-Carbonell A. & Borregon A. (1989a). Immunohistochemical localization of intermediate filament and S-100 proteins in several non-endocrine cells of the human pituitary gland. *Arch Histol Cytol* **52** (3), 241-8.
- Marin F., Boya J. & Lopez-Carbonell A. (1989b). Immunocytochemical localization of vimentin in stellate cells (folliculo-stellate cells) of the rat, cat and rabbit pituitary pars distalis. *Anat Embryol* **179** (5), 491-5.
- Marin F., Stefaneanu L. & Kovacs K. (1991). Folliculostellate cells of the pituitary. *Endocr. Pathol.* **2** (4), 180-92.
- Marin F., Kovacs K., Stefaneanu L., Horvath E. & Z. C. (1992). S-100 protein immunopositivity in human nontumorous hypophyses and pituitary adenomas. *Endocr Pathol* **3**, 28-38.
- Marshall J.M. (1951). Localization of adrenocorticotrophic hormone by histochemical and immunochemical methods. *J Exp Med.* **94**, 21-31.
- Martin A.O., Mathieu M.N., Chevillard C. & Guérineau N.C. (2001). Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca²⁺ increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci* **21** (15), 5397-405.
- Massague J. (1996). TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* **85** (7), 947-50.
- Massague J. (2000a). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1** (3), 169-78.
- Massague J. & Wotton D. (2000b). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* **19** (8), 1745-54.
- Masumoto N., Tasaka K., Kasahara K., Miyake A. & Tanizawa O. (1991). Purification of gonadotropes and intracellular free calcium oscillation. Effects of gonadotropin-releasing hormone and interleukin 6. *J Biol Chem* **266** (10), 6485-8.
- Matsumoto H., Koyama C., Sawada T., Koike K., Hirota K., Miyake A., Arimura A. & Inoue K. (1993a). Pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) responds to novel hypophysiotropic peptide (pituitary adenylate cyclase-activating peptide), showing increased adenosine 3',5'-monophosphate and interleukin-6 secretion and cell proliferation. *Endocrinology* **133** (5), 2150-5.
- Matsumoto H., Ishibashi Y., Ohtaki T., Hasegawa Y., Koyama C. & Inoue K. (1993b). Newly established murine pituitary folliculo-stellate-like cell line (TtT/GF) secretes potent pituitary glandular cell survival factors, one of which corresponds to metalloproteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **194** (2), 909-15.

- McConnell D.S., Wang Q., Sluss P.M., Bolf N., Khoury R.H., Schneyer A.L., Midgley A.R., Jr., Reame N.E., Crowley W.F., Jr. & Padmanabhan V. (1998). A two-site chemiluminescent assay for activin-free follistatin reveals that most follistatin circulating in men and normal cycling women is in an activin-bound state. *J Clin Endocrinol Metab* **83** (3), 851-8.
- McKay L.I. & Cidlowski J.A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* **20** (4), 435-59.
- McLatchie L.M., Fraser N.J., Main M.J., Wise A., Brown J., Thompson N., Solari R., Lee M.G. & Foord S.M. (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin- receptor-like receptor. *Nature* **393** (6683), 333-9.
- Meda P., Pepper M.S., Traub O., Willecke K., Gros D., Beyer E., Nicholson B., Paul D. & Orci L. (1993). Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* **133** (5), 2371-8.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P. & Janeway C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388** (6640), 394-7.
- Meunier H., Rivier C., Evans R.M. & Vale W. (1988). Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (1), 247-51.
- Mira-Moser F., Schofield J. & Orci L. (1975). Tight junction between follicular cells of the anterior pituitary gland : a freeze-facture study. *J. Microscopie Biol. Cell.* **22**, 117-20.
- Mitchner N.A., Garlick C. & Ben-Jonathan N. (1998). Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* **139** (9), 3976-83.
- Mollenhauer J. (1997). Annexins: what are they good for? *Cell Mol Life Sci* **53** (6), 506-7.
- Morand I., Fonlupt P., Guerrier A., Trouillas J., Calle A., Remy C., Rousset B. & Munari-Silem Y. (1996). Cell-to-cell communication in the anterior pituitary: evidence for gap junction-mediated exchanges between endocrine cells and folliculostellate cells. *Endocrinology* **137** (8), 3356-67.
- Mormede P. & Baird A. (1988). Estrogens, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, and phorbol esters modulate the prolactin response of GH3 cells to basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* **122** (5), 2265-71.
- Morris C.S. & Hitchcock E. (1985). Immunocytochemistry of folliculo-stellate cells of normal and neoplastic human pituitary gland. *J Clin Pathol* **38** (5), 481-8.
- Mudrick-Donnon L.A., Williams P.J., Pittman Q.J. & MacVicar B.A. (1993). Postsynaptic potentials mediated by GABA and dopamine evoked in stellate glial cells of the pituitary pars intermedia. *J Neurosci* **13** (11), 4660-8.
- Munari-Silem Y. & Rousset B. (1996). Gap junction-mediated cell-to-cell communication in endocrine glands-- molecular and functional aspects: a review. *Eur J Endocrinol* **135** (3), 251-64.

- Muramami N., Fukata J., Tsukada T., Kobayashi H., Ebisui O., Segawa H., Muro S., Imura H. & Nakao K. (1993). Bacterial lipopolysaccharide-induced expression of interleukin-6 messenger ribonucleic acid in the rat hypothalamus, pituitary, adrenal gland, and spleen. *Endocrinology* **133** (6), 2574-8.
- Nakajima Y., Uchiyama M., Shirai Y., Sakuma Y. & Kato M. (2001). Acetylcholine increases intracellular Ca²⁺ in the rat pituitary folliculostellate cells in primary culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280** (4), E608-15.
- Nakamura T., Takio K., Eto Y., Shibai H., Titani K. & Sugino H. (1990). Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science* **247** (4944), 836-8.
- Nakane P.K. (1970). Classifications of anterior pituitary cell types with immuno-enzyme chemistry. *J Histochem Cytochem.* **18**, 9-20.
- Nathan C. & Xie Q.W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78** (6), 915-8.
- Newman E.A. & Zahs K.R. (1997). Calcium waves in retinal glial cells. *Science* **275** (5301), 844-7.
- Nickerson P.N. (1974). Filament containing chromophores in anterior pituitary. *Tiss and Cell* **6**, 663-8.
- Nishizono H., Soji T. & Herbert D.C. (1993). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: V. Changes in cell-to-cell communications as a function of the timing of castration in male rats. *Anat Rec* **235** (4), 577-82.
- Nolan, L. A., Kavanagh, E., Lightman, S. L. & Levy, A. (1998). Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *J Neuroendocrinol* **10**, 207-15.
- Nunez E.A. & Gershon M.D. (1981). Specific paracrystalline structures of rough endoplasmic reticulum in the follicular (stellate) cells of the dog adenohypophysis. *Cell Tissue Res.* **215**, 215-21.
- Nunez L., Villalobos C. & Frawley L.S. (1997). Extracellular ATP as an autocrine/paracrine regulator of prolactin release. *Am J Physiol* **272** (6 Pt 1), E1117-23.
- Ogawa A., Sugihara S., Nakanishi Y., Suzuki S., Sasaki A., Hirato J. & Nakazato Y. (1990). Intermediate filament expression in non-neoplastic pituitary cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **58** (5), 331-40.
- Ogawa S., Couch E.F., Kubo M., Sakai T. & Inoue K. (1996). Histochemical study of follicles in the senescent porcine pituitary gland. *Arch Histol Cytol* **59** (5), 467-78.
- Ogawa S., Ishibashi Y., Sakamoto Y., Kitamura K., Kubo M., Sakai T. & Inoue K. (1997). The glycoproteins that occur in the colloids of senescent porcine pituitary glands are clusterin and glycosylated albumin fragments. *Biochem Biophys Res Commun* **234** (3), 712-8.

- Ohmichi M., Hirota K., Koike K., Kurachi H., Ohtsuka S., Matsuzaki N., Yamaguchi M., Miyake A. & Tanizawa O. (1992). Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology* **55** (2), 199-203.
- Olivier L., Vila-Porcile E., de Brye C. & Nouet J.C. (1971). Les cellules folliculaires du lobe antérieur de l'hypophyse de chat adulte. *Bull. Ass. Anat. (Nancy)* **152**, 814-5.
- Olivier L., Vila-Porcile E., Racadot O., Peillon F. & Racadot J. (1975) Ultrastructure of pituitary tumor cells: a critical study. Dans *The anterior pituitary gland*, ed. Tixier-Vidal A. F., M.G. (Academic Press, New-york), pp. 231-76.
- Opper L. (1940). Incidence and morphology of epithelial cysts in the anterior lobe of the hypophysis of the rat. *Anat. Rec.* **76**, 135-41.
- Otto C., tom Dieck S. & Bauer K. (1996). Dipeptide uptake by adenohipophysial folliculostellate cells. *Am J Physiol* **271** (1 Pt 1), C210-7.
- Oviedo-Orta E., Gasque P. & Evans W.H. (2001). Immunoglobulin and cytokine expression in mixed lymphocyte cultures is reduced by disruption of gap junction intercellular communication. *Faseb J* **15** (3), 768-74.
- Ozawa H., Ito T., Ochiai I. & Kawata M. (1999). Cellular localization and distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and the expression of glucocorticoid receptor messenger RNA in rat pituitary gland. A combined double immunohistochemistry study and in situ hybridization histochemical analysis. *Cell Tissue Res* **295** (2), 207-14.
- Paez Pereda M., Ledda M.F., Goldberg V., Chervin A., Carrizo G., Molina H., Muller A., Renner U., Podhajcer O., Arzt E. & Stalla G.K. (2000). High levels of matrix metalloproteinases regulate proliferation and hormone secretion in pituitary cells. *J Clin Endocrinol Metab* **85** (1), 263-9.
- Pagotto U., Marsicano G., Fezza F., Theodoropoulou M., Grubler Y., Stalla J., Arzberger T., Milone A., Losa M., Di Marzo V., Lutz B. & Stalla G.K. (2001). Normal human pituitary gland and pituitary adenomas express cannabinoid receptor type 1 and synthesize endogenous cannabinoids: first evidence for a direct role of cannabinoids on hormone modulation at the human pituitary level. *J Clin Endocrinol Metab* **86** (6), 2687-96.
- Paiz C. & Hennigar G.R. (1970). Electron microscopy study and histochemical correlation of human anterior pituitary cells. *Am. J. Pathol.* **59**, 43-52.
- Perez Castro C., Nagashima A.C., Pereda M.P., Goldberg V., Chervin A., Largen P., Renner U., Stalla G.K. & Arzt E. (2000). The gp130 cytokines interleukin-11 and ciliary neurotropic factor regulate through specific receptors the function and growth of lactosomatotropic and folliculostellate pituitary cell lines. *Endocrinology* **141** (5), 1746-53.
- Perrin D., Soling H.D., Wuttke W. & Jarry H. (1993). The stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on LH release from rat pituitary cells in vitro does not involve calcium mobilization. *Exp Clin Endocrinol* **101** (5), 290-6.
- Perryman E.K. (1975). Ultrastructure of the stellate cell in the pars intermedia in the frog, *Rana pipiens*. *Cell Tissue Res.* **164**, 387-99.

- Perryman E.K. & Bagnara J.T. (1978). Extravascular transfer within the anuran pars intermedia. *Cell Tissue Res.* **193**, 297-313.
- Perryman E.K., deVellis J. & Bagnara J.T. (1980). Phagocytic activity of the stellate cells in the anuran pars intermedia. *Cell Tissue Res.* **208**, 85-98.
- Perryman E. (1989). Folliculo-stellate cells of the pituitary gland. What role do these star-shaped cells play? *Bioscience* **39** (2), 81-8.
- Philip J.G., Flower R.J. & Buckingham J.C. (1997). Glucocorticoids modulate the cellular disposition of lipocortin 1 in the rat brain in vivo and in vitro. *Neuroreport* **8** (8), 1871-6.
- Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Huffel C.V., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B. & Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282** (5396), 2085-8.
- Pow D.V. (2001). Visualising the activity of the cystine-glutamate antiporter in glial cells using antibodies to amino adipic acid, a selectively transported substrate. *Glia* **34** (1), 27-38.
- Prummel M.F., Brokken L.J., Meduri G., Misrahi M., Bakker O. & Wiersinga W.M. (2000). Expression of the thyroid-stimulating hormone receptor in the folliculo-stellate cells of the human anterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* **85** (11), 4347-53.
- Qian X., Jin L., Grande J.P. & Lloyd R.V. (1996). Transforming growth factor-beta and p27 expression in pituitary cells. *Endocrinology* **137** (7), 3051-60.
- Rasband M.N., Peles E., Trimmer J.S., Levinson S.R., Lux S.E. & Shrager P. (1999). Dependence of nodal sodium channel clustering on paranodal axoglial contact in the developing CNS. *J Neurosci* **19** (17), 7516-28.
- Rasband M.N. & Trimmer J.S. (2001). Developmental clustering of ion channels at and near the node of Ranvier. *Dev Biol* **236** (1), 5-16.
- Ray D.W., Ren S.G. & Melmed S. (1996). Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. *J Clin Invest* **97** (8), 1852-9.
- Ray D. & Melmed S. (1997). Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* **18** (2), 206-28.
- Redecker P. & Morgenroth C. (1989). Comparative immunohistochemical study of the presence of glial fibrillary acidic protein in the pituitary of several vertebrates. *Anat Anz* **168** (1), 37-47.
- Redecker P. & Fechner J. (1989). Immunohistochemical study of cells positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the human pituitary gland, with special reference to folliculo-stellate cells. *Histochemistry* **91** (3), 227-34.
- Rennels E.G. (1964). Electron microscopic alterations in the rat hypophysis after scalding. *Amer. J. Anat.* **144** (71-91),

- Renner U., Gloddek J., Arzt E., Inoue K. & Stalla G.K. (1997). Interleukin-6 is an autocrine growth factor for folliculostellate-like TtT/GF mouse pituitary tumor cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **105** (6), 345-52.
- Renner U., Gloddek J., Pereda M.P., Arzt E. & Stalla G.K. (1998). Regulation and role of intrapituitary IL-6 production by folliculostellate cells. *Domest Anim Endocrinol* **15** (5), 353-62.
- Rinehart J. & Farquhar M. (1953). Electron microscopic studies of the anterior pituitary gland. *J. Histochem. Cytochem.* **1** (2), 93-113.
- Rinehart J.F. & Farquhar M.G. (1955). The fine vascular organization of the anterior pituitary gland. An electron microscopic study with histochemical correlation. *Anat. Rec.* **196**, 207-40.
- Ritchie P.K., Spangelo B.L., Krzymowski D.K., Rossiter T.B., Kurth E. & Judd A.M. (1997). Adenosine increases interleukin 6 release and decreases tumour necrosis factor release from rat adrenal zona glomerulosa cells, ovarian cells, anterior pituitary cells, and peritoneal macrophages. *Cytokine* **9** (3), 187-98.
- Robb-Gaspers L.D. & Thomas A.P. (1995). Coordination of Ca²⁺ signaling by intercellular propagation of Ca²⁺ waves in the intact liver. *J Biol Chem* **270** (14), 8102-7.
- Roberts V., Meunier H., Vaughan J., Rivier J., Rivier C., Vale W. & Sawchenko P. (1989). Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology* **124** (1), 552-4.
- Romeis B. (1940) Hypophyse, innersekretorische drüsen. Dans *Handbuch der mikroskopischen anatomie des Menschen*, ed. Mollendoff v. (Springer-Verlag, Berlin), Vol. 6, Pt. 3.
- Rosenmund C. & Westbrook G.L. (1993). Calcium-induced actin depolymerization reduces NMDA channel activity. *Neuron* **10** (5), 805-14.
- Salazar H. (1963). The pars distalis of the female rabbit hypophysis. An electron microscopic study. *Anat. Rec.* **147**, 469-97.
- Salazar H., Macaulay M.A., Charles D. & Pardo M. (1969). The human hypophysis in anencephaly: I. Ultrastructure of the Pars Distalis. *Arch. Pathol.* **88**, 201-11.
- Salazar H., Macaulay M.A., Charles D. & Pardo M. (1969). The human hypophysis in anencephaly: II. Ultrastructure of the Pars Intermedia. *Arch. Pathol.* **88**, 377-89.
- Sato T. & Inoue K. (2000). Dendritic cells in the rat pituitary gland evaluated by the use of monoclonal antibodies and electron microscopy. *Arch Histol Cytol* **63** (4), 291-303.
- Sawada T., Koike K., Kanda Y., Sakamoto Y., Nohara A., Ohmichi M., Hirota K. & Miyake A. (1994). In vitro effects of CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, on hormone secretion by rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **202** (1), 155-60.
- Sawada T., Koike K., Kanda Y., Ikegami H., Jikihara H., Maeda T., Osako Y., Hirota K. & Miyake A. (1995). Interleukin-6 stimulates cell proliferation of rat pituitary clonal cell lines in vitro. *J Endocrinol Invest* **18** (2), 83-90.

- Schall T.J., Lewis M., Koller K.J., Lee A., Rice G.C., Wong G.H., Gatanaga T., Granger G.A., Lentz R., Raab H. & et al. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* **61** (2), 361-70.
- Schechter J. (1969). The ultrastructure of the stellate cell in the rabbit pars distalis. *Am. J. Anat.* **126**, 477-88.
- Schechter J., Ahmad N. & Weiner R. (1988). Activation of anterior pituitary folliculo-stellate cells in the formation of estrogen-induced prolactin-secreting tumors. *Neuroendocrinology* **48** (5), 569-76.
- Schechter J.E., Pattison A. & Pattison T. (1993). Development of the vasculature of the anterior pituitary: ontogeny of basic fibroblast growth factor. *Dev Dyn* **197** (2), 81-93.
- Schultz H.J., Patzner R.A. & Adam H. (1979). Fine structure of the agranular adenohypophysial cells in the Hagfish, *Myxine glutinosa* (Cyclostomata). *Cell Tissue Res* **204** (1), 67-75.
- Schwartz J. (2000). Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr Rev* **21** (5), 488-513.
- Selye H. (1943a). Experiments concerning the mechanism of pituitary colloid secretion. *Anat. Rec.* **86**, 109-19.
- Selye H. & Hall C.E. (1943b). Further studies concerning the action of sodium chloride on the pituitary. *Anat. Rec.* **86**, 579-83.
- Semoff S. & Hadley M.E. (1978). Localisation of ATPase activity to the Glial-like cells in the Pars Intermedia. *Gen. Comp. Endocrinol* **35**, 329-41.
- Sheng H.Z., Zhadanov A.B., Mosinger B., Jr., Fujii T., Bertuzzi S., Grinberg A., Lee E.J., Huang S.P., Mahon K.A. & Westphal H. (1996). Specification of pituitary cell lineages by the LIM homeobox gene *Lhx3*. *Science* **272** (5264), 1004-7.
- Sheng M. (2001). Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (13), 7058-61.
- Shimada T. & Nakamura F. (1988). Dome formation of keratin-containing agranular cells from rat anterior pituitary gland in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol* **24** (12), 1193-200.
- Shimada O. & Tosaka-Shimada H. (1989). Morphological analysis of growth hormone release from rat somatotrophs into blood vessels by immunogold electron microscopy. *Endocrinology* **125** (5), 2677-82.
- Shioda T. (1975). Proc. 10th Intern. Congr. of anatomists (Tokyo). p129.
- Shiotani Y. (1980). An electron microscopic study on stellate cells in the rabbit adenohypophysis under various endocrine conditions. *Cell Tissue Res* **213** (2), 237-46.
- Shirasawa N., Kihara H., Yamaguchi S. & Yoshimura F. (1983). Pituitary folliculo-stellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cell Tissue Res* **231** (2), 235-49.

- Shirasawa N., Yamaguchi S. & Yoshimura F. (1984). Granulated folliculo-stellate cells and growth hormone cells immunostained with anti-S 100 protein serum in the pituitary glands of the goat. *Cell Tissue Res* **237** (1), 7-14.
- Shirasawa N. & Yamanouchi H. (1999). Glucocorticoids induce glutamine synthetase in folliculostellate cells of rat pituitary glands in vivo and in vitro. *J Anat* **194** (Pt 4), 567-77.
- Siperstein E.R. (1963). Identification of the adrenocorticotrophin producing cells in the rat hypophysis by autoradiography. *J. Cell. Biol.* **17**, 521-46.
- Smith R.E. (1963). An electron microscopic study of the adenohypophysis of the guinea pig (Abstr.). *Anat. Rec.* **145**, 352.
- Smith C.A., Davis T., Anderson D., Solam L., Beckmann M.P., Jerzy R., Dower S.K., Cosman D. & Goodwin R.G. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248** (4958), 1019-23.
- Soji T. & Herbert D.C. (1989). Intercellular communication between rat anterior pituitary cells. *Anat Rec* **224** (4), 523-33.
- Soji T., Yashiro T. & Herbert D.C. (1990). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. I. Postnatal development and changes after injection of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) or testosterone. *Anat Rec* **226** (3), 337-41.
- Soji T., Nishizono H., Yashiro T. & Herbert D.C. (1991a). Cytochemistry of Ca⁺⁺-dependent adenosine triphosphatase (Ca-ATPase) in rat anterior pituitary cells. *Tissue Cell* **23** (1), 1-6.
- Soji T., Nishizono H., Yashiro T. & Herbert D.C. (1991b). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland. III. Postnatal development and periodic changes of cell-to-cell communications in female rats. *Anat Rec* **231** (3), 351-7.
- Soji T., Yashiro T. & Herbert D.C. (1992). Intercellular communication within the rat anterior pituitary gland: IV. Changes in cell-to-cell communications during pregnancy. *Anat Rec* **233** (1), 97-102.
- Spangelo B.L., Judd A.M., Isakson P.C. & MacLeod R.M. (1989). Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology* **125** (1), 575-7.
- Spangelo B.L., Isakson P.C. & MacLeod R.M. (1990a). Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* **127** (1), 403-9.
- Spangelo B.L., MacLeod R.M. & Isakson P.C. (1990b). Production of interleukin-6 by anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* **126** (1), 582-6.
- Spangelo B.L., Judd A.M., Isakson P.C. & MacLeod R.M. (1991a). Interleukin-1 stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* **128** (6), 2685-92.

- Spangelo B.L., Jarvis W.D., Judd A.M. & MacLeod R.M. (1991b). Induction of interleukin-6 release by interleukin-1 in rat anterior pituitary cells in vitro: evidence for an eicosanoid-dependent mechanism. *Endocrinology* **129** (6), 2886-94.
- Spangelo B.L. & Jarvis W.D. (1996). Lysophosphatidylcholine stimulates interleukin-6 release from rat anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* **137** (10), 4419-26.
- Steele M.K., Negro-Vilar A. & McCann S.M. (1981). Effect of angiotensin II on in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology* **109** (3), 893-9.
- Stefana B., Ray D.W. & Melmed S. (1996). Leukemia inhibitory factor induces differentiation of pituitary corticotroph function: an immuno-neuroendocrine phenotypic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93** (22), 12502-6.
- Stoeckel M.E., Hindelang-Gertner H.D., Deilmann A., Porte A. & Stutinsky F. (1975). Subcellular localization of calcium in the mouse hypophysis. I. Calcium distribution in the adeno and neurohypophysis under normal conditions. *Cell Tissue Res.* **157** (307-322),
- Stoeckel M.E., Schmitt G. & Porte A. (1981). Fine structure and cytochemistry of the mammalian pars intermedia. *Ciba Found Symp* **81**, 101-27.
- Stojilkovic S.S. & Koshimizu T. (2001). Signaling by extracellular nucleotides in anterior pituitary cells. *Trends Endocrinol Metab* **12** (5), 218-25.
- Stratmann I.E., Ezrin C., Sellers E.A. & Simon G.T. (1972). The origin of thyroidectomy cells as revealed by high resolution radioautography. *Endocrinology* **90**, 728-34.
- Svalander C. (1974). Ultrastructure of the rat adenohypophysis. *Acta Endocrinol.* **76: Suppl 188**, 1-113.
- Swennen L., Baes M., Schramme C. & Deneff C. (1985). Beta-adrenergic stimulation of adenosine-3',5'-monophosphate (c-AMP) in primary cultures of rat anterior pituitary cell populations separated by unit gravity sedimentation. Relationship to growth hormone and prolactin release and to nonsecreting cells. *Neuroendocrinology* **40** (1), 78-83.
- Tachibana O. & Yamashima T. (1988). Immunohistochemical study of folliculo-stellate cells in human pituitary adenomas. *Acta Neuropathol* **76** (5), 458-64.
- Talavera D., Ponce A., Fiorentino R., Gonzalez-Mariscal L., Contreras R.G., Sanchez S.H., Garcia-Villegas M.R., Valdes J. & Cerejido M. (1995). Expression of potassium channels in epithelial cells depends on calcium- activated cell-cell contacts. *J Membr Biol* **143** (3), 219-26.
- Tatsuno I., Somogyvari-Vigh A., Mizuno K., Gottschall P.E., Hidaka H. & Arimura A. (1991). Neuropeptide regulation of interleukin-6 production from the pituitary: stimulation by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and calcitonin gene-related peptide. *Endocrinology* **129** (4), 1797-804.
- Taylor A.D., Cowell A.M., Flower J. & Buckingham J.C. (1993). Lipocortin 1 mediates an early inhibitory action of glucocorticoids on the secretion of ACTH by the rat anterior pituitary gland in vitro. *Neuroendocrinology* **58** (4), 430-9.

- Taylor A.D., Cowell A.M., Flower R.J. & Buckingham J.C. (1995a). Dexamethasone suppresses the release of prolactin from the rat anterior pituitary gland by lipocortin 1 dependent and independent mechanisms. *Neuroendocrinology* **62** (5), 530-42.
- Taylor A.D., Flower R.J. & Buckingham J.C. (1995b). Dexamethasone inhibits the release of TSH from the rat anterior pituitary gland in vitro by mechanisms dependent on de novo protein synthesis and lipocortin 1. *J Endocrinol* **147** (3), 533-44.
- Taylor A.D., Christian H.C., Morris J.F., Flower R.J. & Buckingham J.C. (1997). An antisense oligodeoxynucleotide to lipocortin 1 reverses the inhibitory actions of dexamethasone on the release of adrenocorticotropin from rat pituitary tissue in vitro. *Endocrinology* **138** (7), 2909-18.
- Taylor A.D., Philip J.G., John C.D., Cover P.O., Morris J.F., Flower R.J. & Buckingham J.C. (2000a). Annexin 1 (lipocortin 1) mediates the glucocorticoid inhibition of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated prolactin secretion. *Endocrinology* **141** (6), 2209-19.
- Taylor A.D., Christian H.C., Morris J.F., Flower R.J. & Buckingham J.C. (2000b). Evidence from immunoneutralization and antisense studies that the inhibitory actions of glucocorticoids on growth hormone release in vitro require annexin 1 (lipocortin 1). *Br J Pharmacol* **131** (7), 1309-16.
- Theas S., De Laurentiis A., Candolfi M., Lopez S.L., Carrasco A.E., Zaldivar V. & Seilicovich A. (2001). Nitric oxide mediates the inhibitory effect of tumor necrosis factor- α on prolactin release. *Neuroendocrinology* **74** (2), 82-6.
- Theodoropoulou M., Arzberger T., Gruebler Y., Korali Z., Mortini P., Joba W., Heufelder A.E., Stalla G.K. & Schaaf L. (2000). Thyrotrophin receptor protein expression in normal and adenomatous human pituitary. *J Endocrinol* **167** (1), 7-13.
- Tilakaratne N., Christopoulos G., Zumpe E.T., Foord S.M. & Sexton P.M. (2000). Amylin receptor phenotypes derived from human calcitonin receptor/RAMP coexpression exhibit pharmacological differences dependent on receptor isoform and host cell environment. *J Pharmacol Exp Ther* **294** (1), 61-72.
- Tixier-Vidal A. (1975) Ultrastructure of anterior pituitary cells in culture. Dans *The anterior pituitary gland*, ed. Tixier-Vidal A. F., M.G. (Academic Press, New-york), pp. 181-229.
- Traverso V., Christian H.C., Morris J.F. & Buckingham J.C. (1999). Lipocortin 1 (annexin 1): a candidate paracrine agent localized in pituitary folliculo-stellate cells. *Endocrinology* **140** (9), 4311-9.
- Tsagarakis S., Kontogeorgos G., Giannou P., Thalassinos N., Woolley J., Besser G.M. & Grossman A. (1992). Interleukin-6, a growth promoting cytokine, is present in human pituitary adenomas: an immunocytochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **37** (2), 163-7.
- Tsujii T., Ishizaka K. & Winters S.J. (1994). Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on gonadotropin secretion and subunit messenger ribonucleic acids in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology* **135** (3), 826-33.
- Turnbull A.V., Lee S. & Rivier C. (1998). Mechanisms of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. *Ann N Y Acad Sci* **840**, 434-43.

- Turpin G., Heshmati H.M., Kujas M., Gremain J., Jacque C.M. & Racadot J. (1988). Immunocytochemical study of S-100 protein in human pituitary adenomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **55** (2), 107-9.
- Uchiyama M., Nakajima Y., Sakuma Y. & Kato M. (2001). Purinergic regulation of intracellular Ca²⁺ concentration of rat pituitary folliculo-stellate cells in primary culture. *J Neuroendocrinol* **13** (4), 378-85.
- Ueno N., Ling N., Ying S.Y., Esch F., Shimasaki S. & Guillemin R. (1987). Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (23), 8282-6.
- Ueta Y., Levy A., Chowdrey H.S. & Lightman S.L. (1995). S-100 antigen-positive folliculostellate cells are not the source of IL-6 gene expression in human pituitary adenomas. *J Neuroendocrinol* **7** (6), 467-74.
- Ulevitch R.J. & Tobias P.S. (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13**, 437-57.
- Vale W., Rivier J., Vaughan J., McClintock R., Corrigan A., Woo W., Karr D. & Spiess J. (1986). Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* **321** (6072), 776-9.
- Valentijn K., Bunel D.T., Liao N., Pelletier G. & Vaudry H. (1991). Release of prothyrotropin-releasing hormone connecting peptides PS4 and PS5 from perfused rat hypothalamic slices. *Neuroscience* **44** (1), 223-33.
- Valentijn K., Tranchand Bunel D. & Vaudry H. (1992). Omega-conotoxin- and nifedipine-insensitive voltage-operated calcium channels mediate K(+)-induced release of prothyrotropin-releasing hormone-connecting peptides Ps4 and Ps5 from perfused rat hypothalamic slices. *Brain Res Mol Brain Res* **14** (3), 221-30.
- Valentijn K., Vandenbulcke F., Piek E., Beauvillain J.C. & Vaudry H. (1998). Distribution, cellular localization, and ontogeny of prethyrotropin-releasing hormone-(160-169) (Ps4)-binding sites in the rat pituitary. *Endocrinology* **139** (3), 1306-13.
- Van der Schueren B., Denef C. & Cassiman J.J. (1982). Ultrastructural and functional characteristics of rat pituitary cell aggregates. *Endocrinology* **110** (2), 513-23.
- Van Nassauw L., Harisson F., Cras P. & Callebaut M. (1987). Immunohistochemical localization of S-100 protein, glial fibrillary acidic protein, and neuron-specific enolase in the pars distalis of quail, rat, and human hypophyses. *Histochemistry* **86** (4), 353-8.
- Vankelecom H., Carmeliet P., Van Damme J., Billiau A. & Denef C. (1989). Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* **49** (1), 102-6.
- Vankelecom H., Carmeliet P., Heremans H., Van Damme J., Dijkmans R., Billiau A. & Denef C. (1990). Interferon-gamma inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* **126** (6), 2919-

Vankelecom H., Andries M., Billiau A. & Denef C. (1992). Evidence that folliculo-stellate cells mediate the inhibitory effect of interferon-gamma on hormone secretion in rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* **130** (6), 3537-46.

Vankelecom H., Matthys P., Van Damme J., Heremans H., Billiau A. & Denef C. (1993). Immunocytochemical evidence that S-100-positive cells of the mouse anterior pituitary contain interleukin-6 immunoreactivity. *J Histochem Cytochem* **41** (2), 151-6.

Vankelecom H. & Denef C. (1997a). Paracrine communication in the anterior pituitary as studied in reaggregate cell cultures. *Microsc Res Tech* **39** (2), 150-6.

Vankelecom H., Matthys P. & Denef C. (1997b). Inducible nitric oxide synthase in the anterior pituitary gland: induction by interferon-gamma in a subpopulation of folliculostellate cells and in an unidentifiable population of non-hormone-secreting cells. *J Histochem Cytochem* **45** (6), 847-57.

Vankelecom H., Matthys P. & Denef C. (1997c). Involvement of nitric oxide in the interferon-gamma-induced inhibition of growth hormone and prolactin secretion in anterior pituitary cell culture
s. *Mol Cell Endocrinol* **129** (2), 157-67.

Velasco M.E., Roessmann U. & Gambetti P. (1982). The presence of glial fibrillary acidic protein in the human pituitary gland. *J Neuropathol Exp Neurol* **41** (2), 150-63.

Velkeniers B., Zheng L., Kazemzadeh M., Robberecht P., Vanhaelst L. & Hooghe-Peters E.L. (1994). Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38 on growth hormone and prolactin expression. *J Endocrinol* **143** (1), 1-11.

Venance L., Rozov A., Blatow M., Burnashev N., Feldmeyer D. & Monyer H. (2000). Connexin expression in electrically coupled postnatal rat brain neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** (18), 10260-5.

Vidal S., Oliveira M.C., Kovacs K., Scheithauer B.W. & Lloyd R. (2000). Immunolocalization of vascular endothelial growth factor in the GH3 cell line. *Cell Tissue Res* **300** (1), 83-8.

Vigh S., Arimura A., Gottschall P.E., Kitada C., Somogyvari-Vigh A. & Childs G.V. (1993). Cytochemical characterization of anterior pituitary target cells for the neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), using biotinylated ligands. *Peptides* **14** (1), 59-65.

Vila-Porcile E. (1972). The network of the folliculo-stellate cells and the follicles of the adenohypophysis in the rat (pars distalis). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **129** (3), 328-69.

Vila-Porcile E. (1973). La pars distalis de l'hypophyse chez le Rat. Contribution à son étude histologique et cytologique en microscopie électronique. *Annales des sciences naturelles* **12** (15.1), 61-138.

Vila-Porcile E. & Olivier L. (1984). The problem of the folliculo-stellate cells in the pituitary gland.

- Villalobos C., Nunez L. & Garcia-Sancho J. (1996). Functional glutamate receptors in a subpopulation of anterior pituitary cells. *Faseb J* **10** (5), 654-60.
- Vitale M.L., Cardin J., Gilula N.B., Carbajal M.E. & Pelletier R.M. (2001). Dynamics of connexin 43 levels and distribution in the mink (*Mustela vison*) anterior pituitary are associated with seasonal changes in anterior pituitary prolactin content. *Biol Reprod* **64** (2), 625-33.
- Wang Z., Ren S.G. & Melmed S. (1996). Hypothalamic and pituitary leukemia inhibitory factor gene expression in vivo: a novel endotoxin-inducible neuro-endocrine interface. *Endocrinology* **137** (7), 2947-53.
- Watanabe K., Kinoshita S. & Nakagawa H. (1989). Purification and characterization of cytokine-induced neutrophil chemoattractant produced by epithelioid cell line of normal rat kidney (NRK-52E cell). *Biochem Biophys Res Commun* **161** (3), 1093-9.
- Watanabe K., Konishi K., Fujioka M., Kinoshita S. & Nakagawa H. (1989). The neutrophil chemoattractant produced by the rat kidney epithelioid cell line NRK-52E is a protein related to the KC/gro protein. *J Biol Chem* **264** (33), 19559-63.
- White T.W. & Bruzzone R. (1996). Multiple connexin proteins in single intercellular channels: connexin compatibility and functional consequences. *J Bioenerg Biomembr* **28** (4), 339-50.
- White B.H., Osterwalder T.P., Yoon K.S., Joiner W.J., Whim M.D., Kaczmarek L.K. & Keshishian H. (2001). Targeted attenuation of electrical activity in *Drosophila* using a genetically modified K(+) channel. *Neuron* **31** (5), 699-711.
- Winters S.J., Dalkin A.C. & Tsujii T. (1997). Evidence that pituitary adenylate cyclase activating polypeptide suppresses follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels by stimulating follistatin gene transcription. *Endocrinology* **138** (10), 4324-9.
- Wittkowski W., Bockmann J., Kreutz M.R. & Bockers T.M. (1999). Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol* **185**, 157-94.
- Yada T., Vigh S. & Arimura A. (1993). Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) increases cytosolic-free calcium concentration in folliculo-stellate cells and somatotropes of rat pituitary. *Peptides* **14** (2), 235-9.
- Yamaguchi M., Matsuzaki N., Hirota K., Miyake A. & Tanizawa O. (1990). Interleukin 6 possibly induced by interleukin 1 beta in the pituitary gland stimulates the release of gonadotropins and prolactin. *Acta Endocrinol (Copenh)* **122** (2), 201-5.
- Yamamoto T., Hossain M.Z., Hertzberg E.L., Uemura H., Murphy L.J. & Nagy J.I. (1993). Connexin43 in rat pituitary: localization at pituicyte and stellate cell gap junctions and within gonadotrophs. *Histochemistry* **100** (1), 53-64.
- Yamasaki T., Fujita H., Inoue K., Fujita T. & Yamashita N. (1997). Regulation of K⁺ channels by cell contact in a cloned folliculo-stellate cell (TtT/GF). *Endocrinology* **138** (10), 4346-50.

- Yamashita K. (1972). Fine structure of the mouse anterior pituitary maintained in a short-term incubation system. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **124** (4), 465-78.
- Yano H., Readhead C., Nakashima M., Ren S.G. & Melmed S. (1998). Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol* **12** (11), 1708-20.
- Yoshida Y. (1966). Electron microscopy of the anterior pituitary gland under normal and different experimental conditions. *Meth. Achievm. exp. Path.* **1**, 439-54.
- Yoshimura F., Soji T., Sato S. & Yokoyama M. (1977). Development and differentiation of rat pituitary follicular cells under normal and some experimental conditions with special reference to an interpretation of renewal cell system. *Endocrinol Jpn* **24** (5), 435-49.
- Young B.A., Foster C.L. & Cameron E. (1965). Some observations on the ultrastructure of the adenohypophysis of the rabbit. *J. Endocrinol.* **31**, 279-287.
- Young B.A. (1977). Some observations on the ultrastructure of the stellate cells of the pars distalis of the guinea pig. *J. Anat (London)* **124**, 153-6.
- Yu W.H., Kimura M., Walczewska A., Karanth S. & McCann S.M. (1997a). Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (3), 1023-8.
- Yu W.H., Walczewska A., Karanth S. & McCann S.M. (1997b). Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* **138** (11), 5055-8.
- Yu W.H., Kimura M., Walczewska A., Porter J.C. & McCann S.M. (1998). Adenosine acts by A1 receptors to stimulate release of prolactin from anterior-pituitaries in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (13), 7795-8.
- Yuste R., Nelson D.A., Rubin W.W. & Katz L.C. (1995). Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. *Neuron* **14** (1), 7-17.
- Zeid N.A. & Muller H.K. (1993). S100 positive dendritic cells in human lung tumors associated with cell differentiation and enhanced survival. *Pathology* **25**, 338-43.
- Zhang Z.X., Koike K., Sakamoto Y., Jikihara H., Kanda Y., Inoue K., Hirota K. & Miyake A. (1997). Pituitary folliculo-stellate-like cell line produces a cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Neuropeptides* **31** (1), 46-51.

LISTE DE PUBLICATIONS

Publications internationales (avec comité de lecture)

- 2000** A. VALLENTIN, C. PREVOSTEL, T. FAUQUIER, X. BONNEFONT and D. JOUBERT.
Membrane targeting and cytoplasmic sequestration in the spatiotemporal localization of human protein kinase C α .
J. Biol. Chem., **275** (8), 6014-21.
- 2001** T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, R.A. MCKINNEY, K. BAUER and P. MOLLARD.
Folliculostellate cell network : a route for long-distance communication in the anterior pituitary.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98** (15), 8891-6.

Communications orales et affichés

- 1997** T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, K. BAUER and P. MOLLARD.
Pituitary folliculostellate cells: excitable cells?
27th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Louisiana (USA), October 25-30.
- 1998** T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, K. BAUER and P. MOLLARD.
Excitable glial-like cells in anterior pituitary.
European Meeting on Glial Cell Function in Health and Diseases (Dialogue between glia and neurons), Athens (Greece), May 6-10.
- T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, K. BAUER and P. MOLLARD.
Pituitary folliculostellate cells are excitable.
80th Annual Meeting of The Endocrine Society, New Orleans, Louisiana (USA), June 24-27.
- N.C. GUERINEAU, X. BONNEFONT, T. FAUQUIER, P. KUNZELMANN and P. MOLLARD.
Approche des signaux de transduction cellulaire dans des tranches d'hypophyse.
27^{me} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie Expérimentale, Lille (France), Septembre 2-5.
- 1999** T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, K. BAUER et P. MOLLARD.
Cellules folliculostellaires et vagues calciques à longue distance dans l'hypophyse antérieure.
4^{me} Colloque de la Société des Neurosciences, Marseille (France), Mai 25-28.
- T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, K. BAUER and P. MOLLARD.
Extraendocrine calcium waves in the anterior pituitary.
81st Annual Meeting of The Endocrine Society, San Diego, California (USA), June 12-15.
- T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, K. BAUER and P. MOLLARD.
Extraendocrine calcium waves in the anterior pituitary.
The 1999 Gordon research conference on calcium signalling, Henniker, New Hampshire (USA), August 8-13.

T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, K. BAUER and P. MOLLARD.
Gap junctions and extraendocrine calcium waves in the anterior pituitary.
International Gap Junction Conference, Gwatt (Switzerland), August 28-September 2.

- 2000** T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, R.A. McKINNEY, K. BAUER and P. MOLLARD.
A new route for long distance communication in the anterior pituitary.
FASEB Summer Research Conferences, "Calcium and Cell Signalling", Copper Mountain, Colorado (USA), July 9-14.

T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, R.A. McKINNEY, K. BAUER and P. MOLLARD.
A new route for long distance communication in the anterior pituitary.
30th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, Louisiana (USA), November 4-9.

- 2001** T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, R.A. McKINNEY, K. BAUER and P. MOLLARD.
Une nouvelle route de communication à longue distance dans l'hypophyse antérieure.
5^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences, Toulouse (France), Mai 28-31.

T. FAUQUIER, N.C. GUERINEAU, R.A. McKINNEY, K. BAUER and P. MOLLARD.
Folliculostellate cells: functional units of a new form of large-scale intrapituitary communication.
7th International Pituitary Congress, Phoenix, Arizona (USA), June 23-25.

FOLLICULOSTELLATE CELLS : FUNCTIONAL UNITS OF A LARGE-SCALE COMMUNICATION SYSTEM WITHIN THE ANTERIOR PITUITARY.

The anterior pituitary is an endocrine interface between the brain and peripheral organs. This gland secretes hormones periodically, under the control of hypothalamic factors episodically released into the portal blood vessels of median eminence. However, the hypothalamic influence does not fully explain the harmonisation of secretory activities of the distinct endocrine cell types scattered throughout the tissue. This indicates that a large-scale communication system exists *within* the anterior pituitary.

We provide evidence for a new intrapituitary communication system by which information is rapidly transferred via the network of non-endocrine folliculostellate (FS) cells. In acute rat pituitary slices, preparation that keeps intact the tissue architecture, we discovered the hitherto unknown membrane excitability of FS cells. Excitability is one of the means to trigger long-range calcium waves in FS cells, which propagate to other FS cells by signaling through gap-junctions and can relay information between opposite regions of the gland.

We also studied the *in situ* release by FS cells of interleukin-6, a cytokine known to stimulate the release of all pituitary hormones. PACAP stimulated IL-6 release from acute pituitary slices, most likely by acting at the IL-6 gene level. Strikingly, alteration of gap junction coupling alter the pattern of PACAP-induced IL-6 release.

Because FS cells respond to central and peripheral stimuli and dialogue with endocrine cells, the form of large-scale intrapituitary communication described here may provide an efficient mechanism that orchestrates anterior pituitary functioning in response to physiological needs.

RESUME

L'hypophyse antérieure assure une interface endocrine entre le cerveau et les organes périphériques. En effet, cette glande sécrète de manière pulsatile ses différentes hormones dans la circulation générale sous l'influence de facteurs hypothalamiques déversés épisodiquement dans le système porte de l'éminence médiane. Toutefois, l'influence hypothalamique ne saurait à elle seule expliquer l'harmonisation des sécrétions des cellules d'un même type endocrine, qui sont distribuées de manière hétérogène au sein du parenchyme. Il existe sans doute des mécanismes permettant de coordonner l'activité des cellules endocrines à l'échelle de la glande entière.

Au cours de cette thèse, nous avons montré la présence d'un mécanisme de communication intra-hypophysaire permettant un transfert rapide d'information au sein d'un réseau de cellules non-endocrines, les cellules folliculostellaires (FS). Ce travail réalisé sur des tranches épaisses d'hypophyse de rat, modèle qui maintient intacte l'architecture cordonale du tissu, a permis de mettre en évidence l'excitabilité membranaire des cellules FS, propriété jusqu'alors inconnue. Cette excitabilité sert de base à l'initiation de vagues calciques, qui peuvent se propager rapidement *via* des jonctions gap à des régions éloignées de la glande.

Nous avons également étudié la libération d'interleukine-6 (IL-6) par les cellules FS. Cette cytokine est connue pour stimuler l'ensemble des sécrétions hormonales hypophysaires. La production d'IL-6 est stimulée par le PACAP. Ce neuropeptide semble agir directement au niveau du gène, et son effet dépend de l'état des communications intercellulaires au sein du réseau.

Les cellules FS pouvant répondre à des stimuli d'origine centrale et périphérique, ainsi que dialoguer avec les cellules endocrines, l'ensemble de ces résultats montre que le réseau de cellules FS pourrait fournir un mécanisme efficace qui coordonnerait le fonctionnement de la glande en fonction des différents états physiologiques.

Discipline : Neurosciences

Mots clés : hypophyse antérieure, vagues calciques, communications intercellulaires, excitabilité membranaire.

INSERM U469

"Endocrinologie moléculaire. Signalisation cellulaire et pathologie"

CCIPE, 141 Rue de la Cardonille

34094 Montpellier Cedex 5