

## L'ÉVOLUTION DES MICROTOMES et l'histoire de quelques inventeurs

### *II-Les microtomes à porte-objet mobile*

C. GUILLERMO

*Pfizer Global R & D*

*Centre de Recherche- BP 159, 37401 AMBOISE CEDEX*

*C'est plus d'un siècle après la création des premières machines à sectionner qu'apparaît un nouveau type de microtome basé sur la mobilité du porte-objet. Constitués d'un mécanisme simple, efficace et précis, ces nouveaux appareils font leur entrée en scène dans un contexte qui leur est favorable : celui de l'expansion des sciences et des techniques nouvelles.*

*Alors que de nombreux laboratoires utilisent encore des microtomes de factures artisanales, voire même des microtomes à main (encore en usage au Collège de France, laboratoire de Louis Ranvier, été 1874) ces nouveaux appareils vont rapidement répondre aux nouvelles exigences de l'histologie (production de coupes sériées, d'épaisseur fine et ce de manière reproductible) et s'orienter vers de nouvelles applications comme la microscopie électronique (obtention de coupes ultra-fines).*

*Autre atout, la fabrication de ces appareils au compte de grandes sociétés, ce qui va leur permettre d'être diffusés, d'évoluer en fonction des besoins mais surtout de perdurer.*

### **Les microtomes à porte-objet mobile**

Apparus dans le dernier tiers du XIX<sup>e</sup> siècle, ces appareils sont munis d'un porte-objet mobile qui selon les modèles est animé d'un mouvement vertical, horizontal ou encore circulaire. Ce nouveau principe de fonctionnement diminue la complexité du système d'avance de l'objet, tout en augmentant sa précision, mais facilite également l'obtention des coupes en série puisqu'elles sont "disponibles" sur le rasoir stationnaire.

Dès leur apparition, ces microtomes sont presque tous dotés d'une avance automatique de l'objet, d'un porte-objet orientable et/ou interchangeable et de la possibilité d'adapter divers rasoirs selon la nature du tissu.

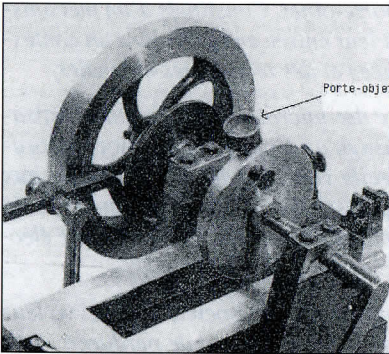
Le principe du fonctionnement de ces appareils constitue encore la base des microtomes actuels. C'est pourquoi, il m'a paru pertinent dans cette seconde partie d'ajouter à leur histoire un bref aperçu du mécanisme de coupe pour chacune des classes de microtomes, classe définie par le mouvement du porte-objet.

## ***1. Porte-objet animé d'un mouvement vertical***

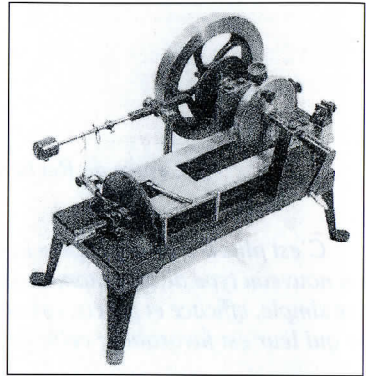
Insidieusement, ces appareils ont été appelés microtomes rotatifs en raison du mouvement du volant. Ils ont indépendamment été inventés par 2 Américains; ADAM PFEIFER et CHARLES SEDGWICK MINOT.

### **Le microtome de PFEIFER**

Mis au point par Pfeifer, mécanicien à l'université Johns Hopkins, Baltimore, USA, cet appareil ne présente pas réellement un mouvement vertical de l'objet, mais par son principe, il est considéré comme le premier microtome rotatif. Daté de 1883 dans la plupart des écrits, Cowles R. et Richards O. ont pu démontrer la création d'un premier prototype en 1879.



En dépit des éloges, il n'a été fabriqué qu'à peu d'exemplaires dont aucun ne subsiste aujourd'hui.



◀ Il est constitué d'une base solide avec deux supports verticaux portant un axe horizontal auquel sont rattachés : une roue excentrée, un large volant et une petite roue. Cette dernière porte à sa périphérie l'objet à couper (voir photo ci-contre). Particularité de ce microtome : l'avance du rasoir détermine l'épaisseur des coupes.

Créé en 1886, **le microtome de CHARLES SEDGWICK MINOT** peut-être considéré comme le point de départ de toute l'évolution des microtomes rotatifs.

D'utilisation simple cet appareil connaît un vif et rapide engouement.

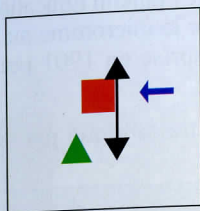
Sa lourde ossature d'acier le rend très stable et permet d'obtenir plus facilement des coupes sériées et des coupes de tissus durs exempts de vibration.

Les modèles se succèdent avec pour premier objectif des fabricants, celui de diminuer l'épaisseur des coupes. Le prototype créé par Charles Minot, ne produit que des sections de 30µm, épaisseur qui va dès le modèle suivant être réduite à 3µm, puis à 1µm en 1892.

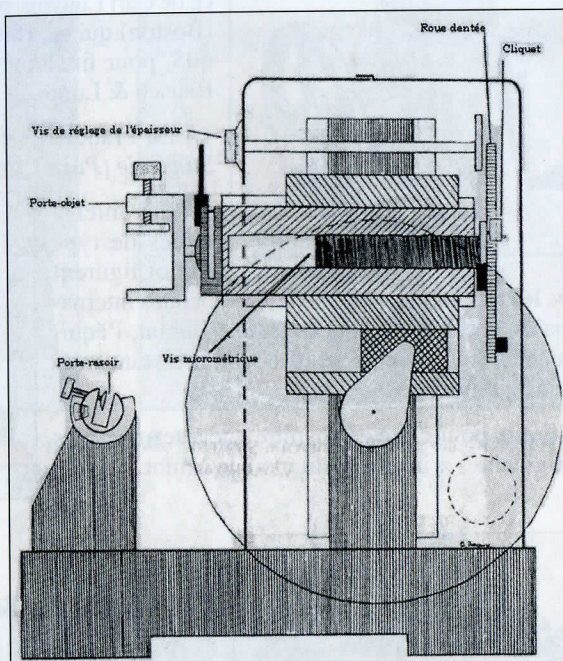
Une autre préoccupation caractéristique de cette époque est l'obtention de sections d'or-



## Mouvement rectiligne et vertical du porte-objet.



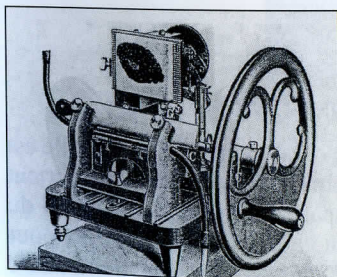
*Descriptif du mécanisme :* Le porte-objet est fixé sur un chariot en acier guidé par une glissière. Le volant entraîne le mouvement du chariot selon un axe vertical. L'avance horizontale de l'objet s'effectue grâce à une vis micrométrique activée automatiquement par une roue dentée et un cliquet lors du mouvement ascendant du porte-objet. Le point mort du porte-objet se situe en position supérieure.



Ci-contre, vue latérale du mécanisme

Epaisseur de coupe des premiers modèles :  $3\mu\text{m}$ .

Utilisation préconisée pour obtention de coupes de  $5\mu\text{m}$ .

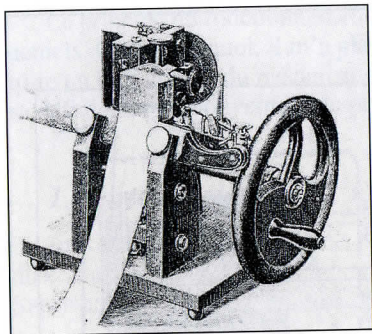


gane entier. En 1898, paraît donc une adaptation du microtome de Minot pour la section d'hémisphères cérébraux humains entiers (voir ci-contre). L'appareil pèse 33 kg, il est d'utilisation aisé et dispose d'un intéressant dispositif qui en réduisant le trajet du porte-objet, autorise également la coupe d'objet de moindres dimensions.

Le microtome de Minot sera le premier microtome à faire l'objet d'une adaptation pour produire des coupes de sections fines pour la microscopie électronique.

*Légende des symboles accompagnant les descriptifs des mécanismes de coupe :*

■ : Objet    ▲ : rasoir    ← : sens d'avance du porte-objet.

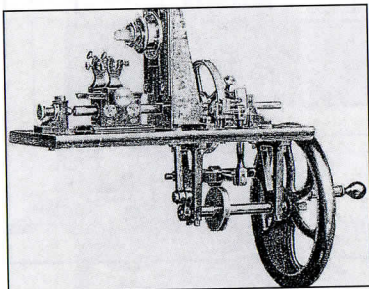
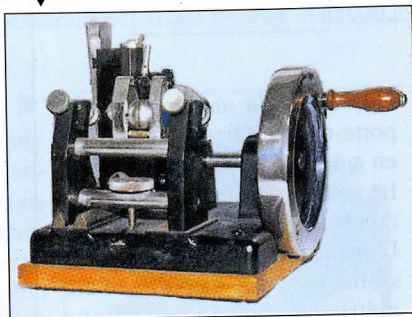


◀ Minot confie la manufacture de son appareil à **G. Baltzer (Leipzig)**, (voir ci-contre) le fabricant de confiance de Carl Ludwig, puis à la Sté Franklin Educational Co. (Boston) qui en 1895 propose le microtome au prix de 60\$, pour finalement être reprise en 1901 par la Sté Bausch & Lomb.

En France il est entre autre fabriqué par **Maxime Stiassnie (Paris)**. ▼

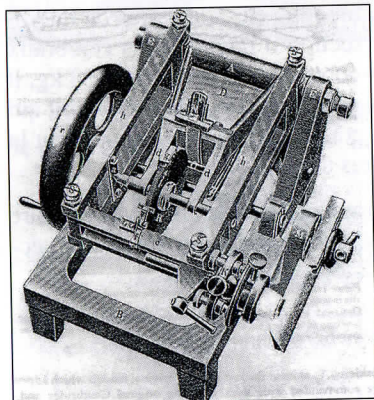
dans les catalogues de nombreuses sociétés internationales et constitueront des années durant, l'équipement de base de nombreux laboratoires, tant américains qu'européens.

Enfin, pour clore ce chapitre quelques-unes des « originalités » inspirées du modèle Minot.



#### ◀ Le modèle de REINHOLD-GILTAY (1892)

Il a plus particulièrement été conçu pour sectionner de larges blocs, il dispose d'un volant situé sous le support du microtome. Il peut produire des coupes de  $0.5\ \mu\text{m}$  d'épaisseur pour des objets de grandes dimensions (environ  $4 \times 4\ \text{cm}$ ).

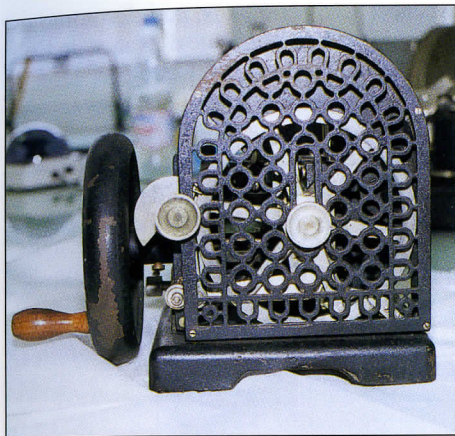


#### ◀ Le modèle de FROMME (1896)

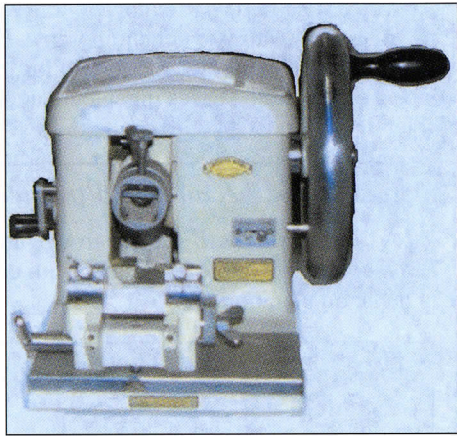
Il est constitué d'une ossature massive à laquelle est attaché un parallélogramme de bras de levier qui portent et avancent l'objet. Sa particularité est la position du rasoir parallèle à celle du volant. Chose étonnante pour l'époque, la fixation du rasoir est succincte; point faible auquel Reichert remédie un an plus tard.



Enfin des modèles plus récents mais aux allures insolites.



▲ Modèle de Bausch et Lomb au dos finement ouvragé, daté de 1903 ou 1908.



▲ Modèle Sartorius-Werke – Gottingen des années 1960.



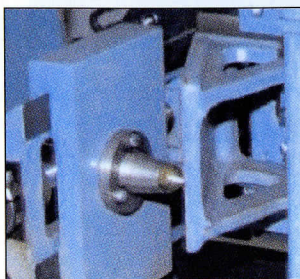
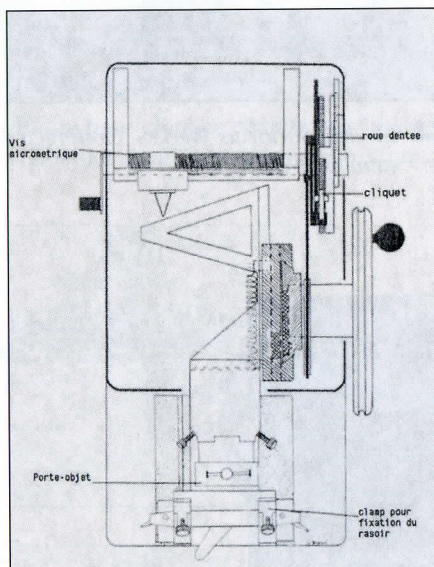
Charmant petit village de la Côte-d'Or (21).

## Le microtome de SPENCER

Fabriqué en 1910 par la société américaine Spencer Lens company, ce microtome est d'abord produit dans une taille imposante. Il doit sa notoriété à son système d'avance de l'objet particulièrement efficace et précis qui procure de très fines sections. Cette précision de coupe a été obtenue par les ingénieurs de la firme en désolidarisant le système d'avance de l'objet du système de coupe.

### *Descriptif du mécanisme d'avance*

A l'arrière du porte-objet se trouve un plan oblique contre lequel est poussé selon un angle obtus, une butée conique, ce qui démultiplie l'avance de l'objet en proportion de la pente du plan oblique.

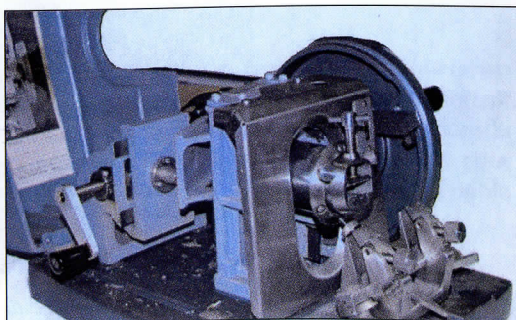


Ci-contre, vue supérieure du mécanisme.  
Epaisseur de coupe des premiers modèles : 0,5 m.

Utilisation préconisée pour obtention de coupes de 1 m.

Il est par la suite commercialisé par la Sté Bausch & Lomb Optical Cie, société acquéreuse de la Cie Lens.

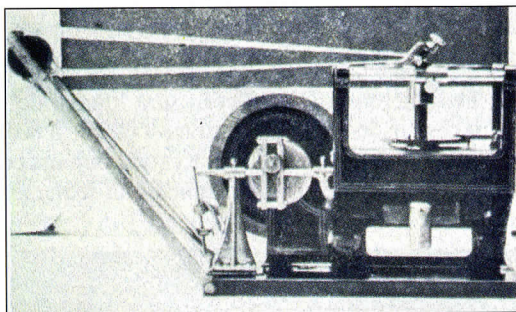
*Modèle de l'American Optical* ►





## 2. Porte-objet animé d'un mouvement horizontal

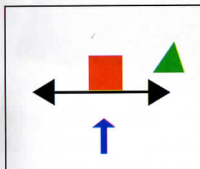
Le premier microtome de ce type, est le microtome de Caldwell, en réalité élaboré par SIR RICHARD THRELFALL en 1883. La rotation du volant entraîne le mouvement horizontal du chariot porte-objet. L'épaisseur des coupes atteint 1/4000 inch, soit environ 6µm. Cet appareil n'a pas été reproduit en raison de l'absence de support commercial mais également de l'apparition d'un modèle concurrent en Angleterre.



Le concept du microtome de Threlfall est repris dans les années 1910, avec un look légèrement différent, par quelques fabricants allemands donnant naissance aux appareils appelés microtomes à traîneau.

Le microtome à traîneau a été très populaire pour le travail de routine jusqu'à la seconde guerre mondiale, date à laquelle il périclité un peu au profit du microtome dit rotatif.

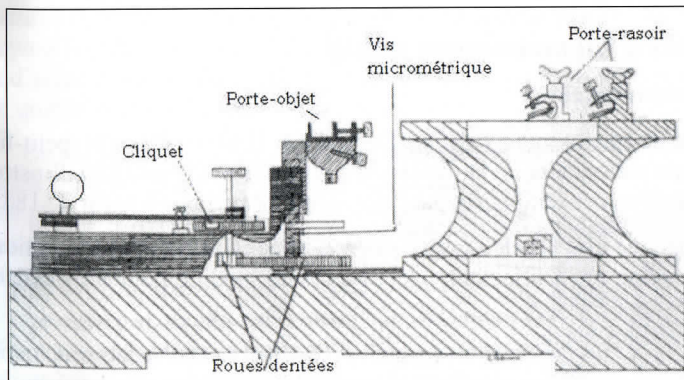
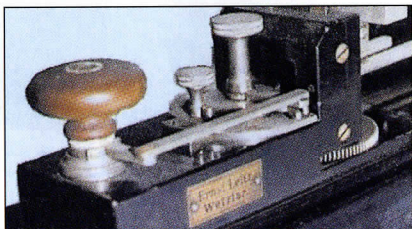
### Mouvement rectiligne et horizontal du porte-objet.



#### Descriptif du mécanisme :

Le porte-objet est fixé sur un chariot couissant en acier, déplacé par l'opérateur à l'aide d'une poignée selon un mouvement horizontal d'aller-retour.

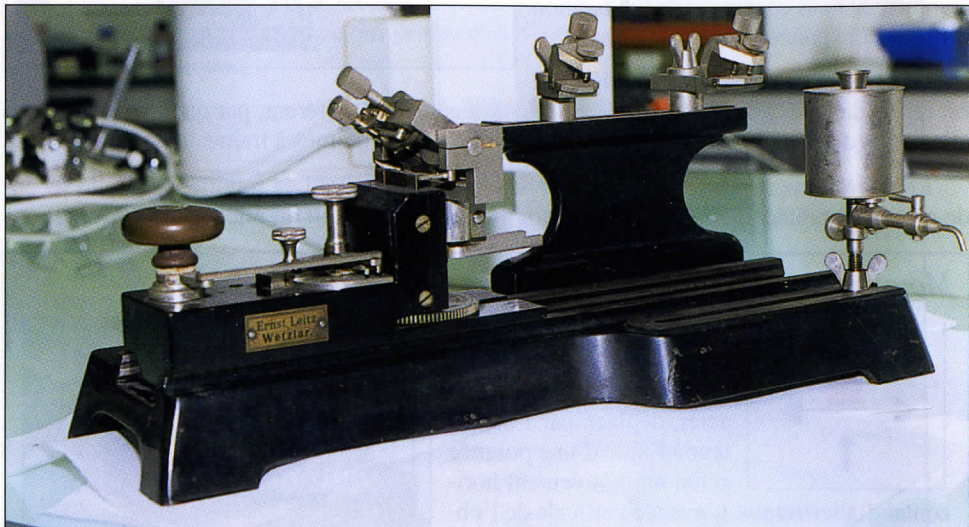
L'avance verticale de l'objet est réalisée par rotation de la poignée qui active une vis micrométrique mue par une roue dentée et un cliquet.



Ci-contre, vue latérale du mécanisme. Epaisseur de coupe des premiers modèles : 5µm. Utilisation préconisée pour obtention de coupes de 5 µm.

Les rasoirs utilisés pour ce type de microtome sont généralement longs, 24 cm, et les clamps du porte-rasoir ajustables, pour incliner le rasoir selon une assise oblique (coupe à la celloïdine) ou carrée (coupe à la paraffine). A noter que les premiers modèles sont parus sans avance automatique de l'objet.

Les microtomes à traîneau sont lourds, de forme basse et trapue et donc très stables. Pour ces raisons, leur utilisation est dédiée à la coupe de tissus durs, d'organes entiers ou de blocs de grandes dimensions. Ils sont toujours commercialisés avec cependant une distribution plus marquée en Allemagne où là seulement ils continuent à être utilisés pour les travaux de routine.



*Modèle Ernst Leitz –Wetlar*

### ***3. Porte objet animé d'un mouvement rotatif***

#### **3.1 Mouvement en arc de cercle.**

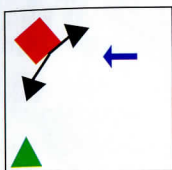
Le rocking microtome ou microtome à balance. Dessiné par HORACE DARWIN (petit-fils de Charles Darwin) devenu actionnaire de la *Cambridge instrument Cie* en 1880, l'instrument est fabriqué en de nombreux exemplaires par cette même compagnie à partir de 1885.

Au début, ce microtome est produit en 2 tailles selon la dimension des blocs à sectionner, et ne dispose pas de porte-objet orientable, détail qui sera modifié pour les modèles produits après 1900.

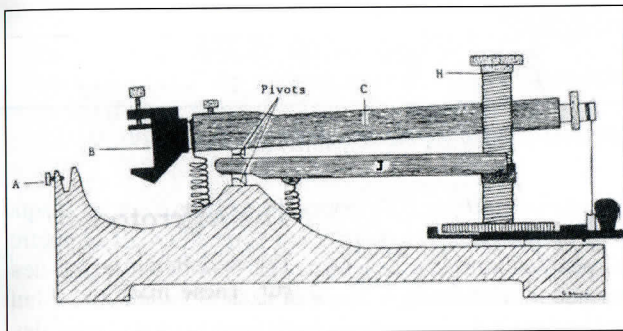
Son mécanisme simple, a permis d'obtenir un appareil avec peu d'inconvénients et de faible coût. Le tout est couronné par une bonne régularité et une excellente précision ce qui en jargon actuel signifie un appareil d'excellent rapport qualité/prix.



## Mouvement en arc de cercle du porte-objet.



**Descriptif du mécanisme :** Il est constitué d'un socle à l'extrémité duquel se situe le porte-rasoir (A). Le porte-objet (B) est fixé à l'extrémité du bras supérieur quelquefois appelé "bras pendule" (C). Un boyau, puis plus tard une corde de nylon relie l'autre extrémité de ce bras à une manivelle, en passant par une poulie. La traction de la corde par la manivelle, entraîne le mouvement de balancier du porte-objet vers le rasoir.



L'avance horizontale de l'objet est régi par le levier inférieur (J), qui repose d'une part sur un pivot et d'autre part sur une bague fixée à une vis micrométrique (H). La rehausse du bras inférieur, par la poignée, entraîne alors l'avancée du bras pendule vers le rasoir.

Ci-dessus, vue latérale du mécanisme.

Epaisseur de coupe des premiers modèle : 2 $\mu$ m.

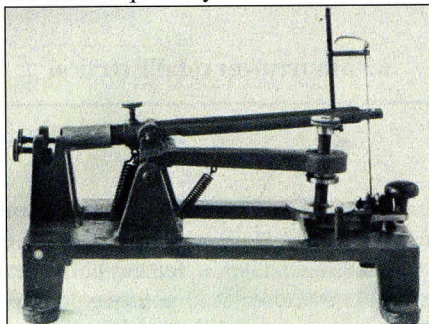
Utilisation préconisée pour obtention de coupes de 1 $\mu$ m.

Réputé pour durer une vie, il sera largement utilisé en Grande Bretagne, son pays natal. Pour preuve, le nombre des ventes qui en 1903 dépasse 900 appareils.

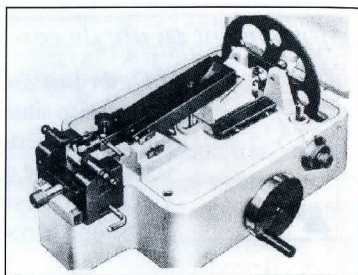
Ses détracteurs lui reconnaissent un problème majeur : celui de confectionner des coupes incurvées. Mauvaise réputation qui lui colle à la peau pendant de nombreux écrits et cela en dépit d'une part du modèle de UNICAM en 1894 (arc à angle droit devant le tranchant du rasoir) et d'autre part des travaux de E.W. MACBRIDE qui ont conclu qu'il n'y a aucune différence de qualité entre des coupes planes ou incurvées.

En fait le réel point faible de l'appareil est son poids "plume". Il est souvent nécessaire de visser une plaque au support ou de déposer le microtome sur un torchon humide, remède beaucoup plus pragmatique !

Ce microtome a plus particulièrement été affecté à la coupe de blocs de petite taille et de paraffine puisqu'une trop grande densité du tissu exerce une force contraire au mouvement du bras porte-objet.

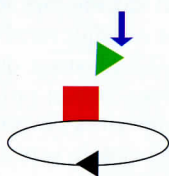


La grande précision de coupe, l'absence de vibration a permis une adaptation de l'appareil pour la microscopie électronique. Ce sont MM. DANON ET KELLENBERGER de l'Université de Genève qui ont mis au point ce modèle (photo ci-contre) en s'inspirant donc du principe du rocking microtome et en lui ajoutant le plan oblique selon Spencer pour démultiplier l'avance de l'objet. Ce microtome a été mis au point et fabriqué par la Société Trüb, Täuber & Cie de Zurich (Suisse).



Le rocking microtome n'est actuellement plus produit.

### 3.2 Mouvement rotatif horizontal

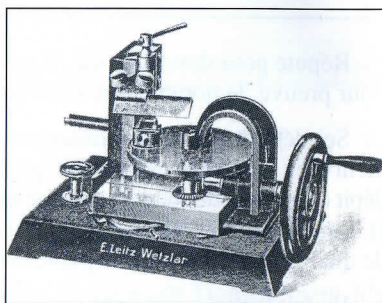


#### *Mouvement rotatif horizontal du porte-objet.*

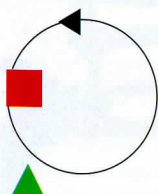
*Descriptif du mécanisme :* Le porte-objet est fixé sur un disque métallique d'environ 8 mm d'épaisseur et de 14 cm de diamètre. L'axe perpendiculaire est maintenu à la fois par-dessus et par-dessous, permettant une rotation facile et sans vibration. Le volant entraîne la rotation du disque mais également le mouvement descendant vertical du rasoir selon l'épaisseur de coupe sélectionnée.

Epaisseur de coupe : 1  $\mu\text{m}$ .

Le porte-objet est entièrement orientable et il est possible de réaliser des sections dont l'épaisseur varie de 1 à 20  $\mu\text{m}$ . Fabriqué par Leitz et décrit en 1914 dans un article de S. Becher, c'est le seul microtome répertorié fonctionnant selon ce principe. Ce modèle n'a pas connu le succès escompté, d'où sa fabrication limitée puis sa disparition.



### 3.3 Mouvement rotatif vertical



#### *Mouvement rotatif vertical du porte-objet.*

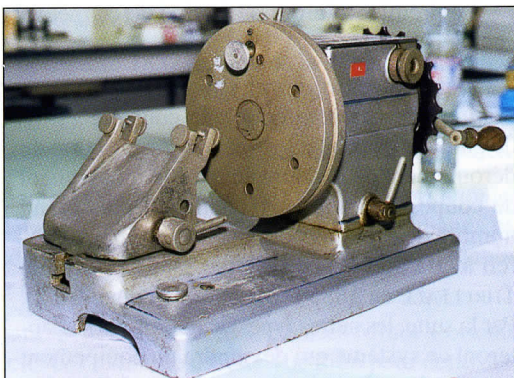
*Descriptif du mécanisme :* Le porte-objet est fixé sur un volant dont la rotation est transmise par un axe. Axe qui se déplace également horizontalement par l'intermédiaire d'un dispositif micro-métrique pour avancer l'objet vers le rasoir.



Un des rares exemples de ce type de microtome est l'appareil fabriqué en France par Leroux-Seguin est surnommé le PARVISEC (voir photo ci-contre).

Ce type de microtome a principalement été créé en réponse aux inconvénients des microtomes de type Minot à savoir : la difficulté de fabrication de glissières parfaitement rectilignes, leur usure rapide avec les vibrations qui en résultent.

Cet appareil fiable et régulier, aux dires du fabricant et des utilisateurs offre de plus la possibilité d'intervenir sur le porte-objet loin de la zone de coupe et donc du rasoir. Sécurité d'utilisation qui ne lui a pas pour autant permis de gagner sa place dans les laboratoires.



Une résurrection récente pour ce type d'appareil avec le dernier-né de la société Leica. Le mouvement circulaire offre en plus aujourd'hui l'avantage de dispenser l'appareil du traditionnel système de rétraction du bloc.



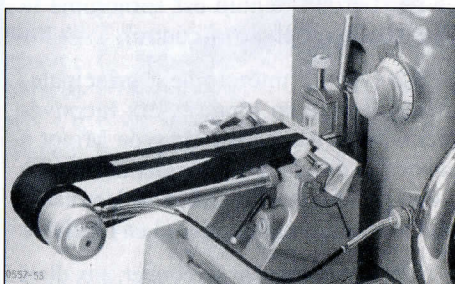
*Modèle LEICA DSC1 (Avec l'aimable autorisation de la sté LEICA).*

## ***Les dernières évolutions***

Parmi les améliorations apportées à la microtomie, il faut citer le système de rétraction du porte-objet qui a pour but de préserver le couteau et l'objet d'éventuels dommages générés par le frottement du bloc contre le rasoir lors du mouvement ascensionnel mais également d'éviter que la coupe réalisée reste solidaire du bloc. La valeur de la rétraction du bloc est proche de 80  $\mu\text{m}$ , elle varie selon les constructeurs et les modèles.

Le premier microtome équipé de ce mécanisme a été mis sur le marché en 1988, par la société Microm.

Autre accessoire qui simplifiera la pratique de la microtomie : la courroie de guidage des coupes, avec synchronisation du déroulement de la courroie avec le mouvement de coupe. Conçu pour recueillir le plus grand nombre de sections possibles, le premier appareil à être doté de ce système est le modèle de THRELFALL en 1885 (voir photo au chapitre 2). Par la suite, les autres types de microtomes adapteront ce système qui deviendra un équipement courant. Pour les microtomes de type Minot, la courroie est solidaire du porte-rasoir alors que pour les microtomes-traîneaux, elle repose sur le rasoir.



Enfin, dernière innovation dans le temps : l'entière automatisation du mouvement de coupe. La robotisation des microtomes a depuis longtemps été un des leitmotivs des fabricants et des utilisateurs pour des raisons pratiques mais aussi un peu par nature humaine. Elle a engendré quelques systèmes "maisons" jusqu'à devenir l'entière automatisation électrique connue aujourd'hui.

Parmi les pionniers de l'automatisation, semi-automatisation plus exactement, il faut citer CLAUDIUS REGAUD et son système mis au point et adapté vers 1901 à un modèle de Fromme, et applicable aux microtomes Rheinold-Giltay ou Minot. S'inspirant du principe de fonctionnement des machines à coudre, C. Regaud dote son microtome d'un bâti de machine à broder dont la roue est reliée au volant (creusé d'une gouge) du microtome par une courroie de cuir. La pédale transmet le mouvement de coupe au microtome libérant les 2 mains de l'opérateur pour la récupération des coupes.

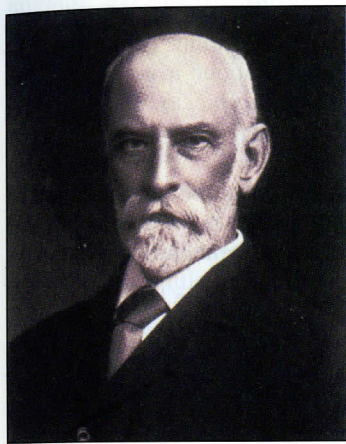
A noter, une autre innovation apportée par de C. Regaud sur cette même machine : celle du frein, assurant l'arrêt immédiat de l'appareil (bien utile lorsque l'on veut garder ses 2 mains !).

Le premier microtome entièrement automatique est une fois encore l'œuvre de SIR RICHARD THRELFALL. Pour ce faire, il équipe son modèle d'un moteur à eau qui assure au microtome une production d'environ 200 sections par minute. Dans les années 1970, ce sont de petits moteurs électriques annexes qui génèrent le mouvement mécanique de la coupe. Quant à la dernière étape de l'automatisation avec un moteur électrique intégré à l'appareil, elle apparaît vers les années 1990.

Voici donc venu la fin de cette petite chronique de l'évolution des microtomes. Trois siècles durant lesquels des hommes, souvent inconnus, se sont investis, ont dû faire preuve de détermination pour satisfaire à la science. Dans cette optique, il n'est pas rationnel de refermer cette page d'histoire sans évoquer Sir Richard Trelfall et surtout Charles Sedgwick Minot, personnages marquants de cette dernière étape de l'évolution des microtomes et par répercussion celle de l'histologie.



**CHARLES SEDGWICK MINOT. Anatomiste américain (1852-1914)**



Le 23 décembre 1852, naît dans la demeure familiale de Woodbourne, Massachusetts, USA, CHARLES SEDGWICK MINOT, quatrième des sept enfants de William Minot le second, homme de cour, et de Katharine Maria Sedgwick.

Les membres de la famille Minot, se sont principalement et depuis longtemps illustrés comme marchands ou hommes de loi dans la ville de Boston où ils sont établis depuis de nombreuses générations.

Contrairement à ses ancêtres, Charles Minot s'oriente vers les sciences naturelles. Cette vocation pour cette discipline de la vie lui vient très probablement de ses parents fervents admirateurs et défenseurs de la nature, et de son enfance qui a pour cadre les hauts et calmes plateaux de West Roxbury.

● *Un parcours scientifique précoce, riche en expériences sous d'illustres auras.*

Juillet 1868. Alors âgé de 15 ans, Charles Minot devient membre de la Société d'histoire naturelle de Boston et réalise une première publication remarquée concernant la description du mâle de *l'hesperia metea*, papillon d'Amérique du Nord.

En 1868, il passe brillamment le concours d'entrée à l'institut de technologie du Massachusetts. Il étudie alors la chimie et la physique avec le professeur Edward Pickering, futur astronome.

En 1872, il est le plus jeune Bachelor of Science (B.S) de cette école technique. Il entre alors au Collège de Harvard où il devient un des 3 candidats au diplôme de docteur en sciences naturelles.

Cette même année, il devient l'élève du professeur HENRY BOWDITCH, qui de retour d'Europe vient de créer un laboratoire de physiologie. Malgré la différence d'âge, maître et élève nouent une solide amitié et réalisent une première étude en commun traitant de l'influence des anesthésiants (*The influence of anaesthetics on the vaso-motor centres*, 1874).



Henry PICKERING BOWDITCH (1840-1911). Physiologiste ▲



1873. Charles Minot choisit alors de différer l'obtention de son diplôme pour se rendre en Europe, à Leipzig où il étudie avec le PR. CARL LUDWIG. Après un bref apprentissage de la langue allemande, il assiste le physiologiste allemand pour une étude concernant la formation du gaz carbonique lors du travail musculaire (publication de 1876).

◀ Carl Friedrich WILHELM LUDWIG (1816-1895). Physiologiste et anatomiste allemand.

Décembre 1873. Début de ses travaux avec RUDOLF LEUCKART, sur la structure et la classification des vers (*On the classification of some of the lower worms*, 1876).

Printemps 1875. Il se rend à Paris, où avec le Pr. Ranvier, il perfectionne sa connaissance des techniques histologiques qu'il met immédiatement en pratique avec l'étude des Dytiques (*Recherches histologiques sur les trachées de l'hydophilus piceus*, 1876).

1875-1876. De retour à Leipzig, il étudie avec le Pr. SEMPER à Würzburg.

Été 1876. Il quitte le Pr. Ludwig, qu'il considère comme le plus grand professeur dans l'art de la recherche scientifique, et retourne à Boston. Là il procède à la publication de ses investigations européennes et reprend son cursus scolaire précédemment interrompu.

1878. Charles Minot obtient le titre de Docteur en science de l'école de Harvard.

1880. Début de sa carrière professionnelle à l'école médicale de Harvard avec deux emplois : celui d'instructeur en chirurgie et pathologie orale à l'école dentaire et celui de maître de conférences en embryologie à l'école médicale.

1883. Il devient instructeur en histologie et embryologie.

1892. Alors âgé de 40 ans, Charles Minot acquiert le statut de professeur d'histologie et d'embryologie.

1903-1905. Il est élu président de l'*American Association of Anatomists*.

1912. Consécration de sa carrière avec le titre de directeur du laboratoire d'anatomie à Harvard.

1913. Echange avec les universités de Berlin où cette fois-ci il a le rôle d'instructeur en sciences naturelles.

Charles Minot sera gratifié en fin de carrière de nombreux titres honorifiques par d'illustres universités comme Yale (U.S.A) en 1899, Oxford (Grande-Bretagne) en 1902 ou Toronto (Canada) en 1904.

### ● *Un scientifique qui cherche sa voie.*

Depuis ses premiers travaux avec Bowditch, Charles Minot n'a cessé de démontrer ses talents dans des disciplines aussi variées que la zoologie, la physiologie, l'anatomie, la morphologie... et si au début de sa carrière, ce sont principalement les invertébrés qui font l'objet de ses travaux et de ses publications, Charles Minot s'intéressera également à l'Homme, jusque dans son comportement, puisque de 1884 à 1894, il versera dans la psychologie ; domaine qui le passionne avec comme thème fétiche, le vieillissement de l'individu (*Death and individuality*, 1884; *Growth & age*, 1888, *The psychological comedy*, 1895). Il abandonnera cependant cette voie en raison des différends qui l'opposent à ses confrères.

L'embryologie occupe une place très importante dans la carrière de Charles Minot, sous forme de lectures, avec les œuvres de Balfour, Baer, His... ou de recherches. En 1892, au terme de 10 années de labeur, il finalise son œuvre sur l'embryologie humaine (*Human Embryology*). Cet ouvrage conséquent (815 pages) et richement illustré (463 figures), sera considéré,



dans ce domaine, comme le plus important réalisé en Amérique, et le second écrit en langue anglaise après l'œuvre de Francis Balfour en 1881, sur l'embryologie comparative. En 1894, le livre est traduit et publié en Allemagne, avec une préface élogieuse de William His.

Cette œuvre lui vaudra la reconnaissance et les honneurs des scientifiques et le fera membre de nombreuses sociétés scientifiques américaines mais également européennes, anglaises...

Les spécimens réalisés lors de ses différents travaux constituent une remarquable collection de près de 200 pièces dont les méthodes de préparations et de conservations serviront longtemps de références pour les laboratoires d'embryologie américains. Son manuel d'embryologie porcine constituera également un parfait auxiliaire pour l'apprentissage de cette science. Enfin, Charles Minot est à l'origine de théories pertinentes mais aujourd'hui dépassées sur les cellules sexuelles.

Son opinion sur l'embryologie est sans concession, il considère et professe à ses étudiants que l'embryologie est la base incontournable des connaissances anatomiques : *" tant que l'étudiant s'écartera de l'embryologie, son anatomie ne sera pas meilleure qu'un stupide système de mnémotechnies "*. (Allocution de 1890)

Charles Minot est également un fervent défenseur de l'importance de l'observation microscopique dans la compréhension des faits. Outre sa participation financière à l'acquisition de microscopes dans les laboratoires d'histologie et d'embryologie de Havard, il met en place un système de location des microscopes pour les étudiants.

Là encore à l'aide de phrases acidulées, il tente de convaincre ses élèves du bien fondé de la microscopie : *" ce n'est pas la vue qui est mauvaise, c'est le cerveau qui fait défaut au piètre observateur "*.

### ● *Un caractère véhément et déterminé*

Charles Minot a toujours témoigné d'un profond respect et d'une grande admiration à l'égard des professeurs qu'il a côtoyé au cours de son existence. Mais affabilité et bienveillance ne sont pas les caractéristiques de son comportement envers ses collègues scientifiques ou professionnels. Ainsi, en 1885, son opposition aux méthodes utilisées en psychologie le pousse à abandonner les recherches dans ce domaine. En 1886, il s'insurge contre les nouveaux termes (dont mitose) proposés par FLEMMING et que Charles Minot qualifie de "fardeaux pour la science".

Ressentiments mais également convictions qu'il n'hésite pas à exprimer avec véhémence lors d'allocutions et qui ne faciliteront pas toujours son avancement.

En dépit de ce caractère impétueux, Charles Minot possède de remarquables qualités qui lui permettront de tracer sa voie et celle du département d'anatomie à Havard et ceci malgré la forte désapprobation des autres enseignants à son contrôle du département, car Charles Minot est sans qualification médicale.

Sa contribution et son engagement permanents vont faire de lui le premier professeur à impliquer les sciences naturelles et leurs travaux pratiques dans l'éducation médicale, et à promouvoir l'enseignement de l'embryologie et de l'histologie.

## ● *Un Homme de terrain*

Charles Minot accorde suffisamment d'importance aux techniques et appareils qu'il utilise durant ses travaux pour leur consacrer des écrits à part entière : *Some histological methods*, 1885, *The mounting of serial sections*, 1887, *American microscopes-a complaint*, 1887. *Microtome automatique nouveau*, 1895... Il tire bénéfice de ses visites en Europe pour rendre compte des appareils utilisés sur le vieux continent, comme le microtome de His (*The history of the microtome*, 1903 ).

Son intérêt et le souci d'efficacité de la technologie le poussent même à s'impliquer et élaborer les plans d'aménagement des nouveaux laboratoires de l'école médicale de Harvard lors de son extension en 1883. Sa participation dans ce projet va plus loin que quelques lignes tracées sur du papier ; il définit les conditions d'éclairage, de ventilation, la forme et la taille des bureaux des étudiants et bien entendu le choix des appareils.

Le travail précis et les considérations de C. Minot pour l'aménagement des laboratoires seront d'ailleurs repris par l'architecte en charge de l'extension des bâtiments en 1905. Dans ce domaine encore, C. Minot impose un nouveau concept : celui d'un enseignement où le laboratoire prédomine.

Enfin dépassant le stade de la simple observation ou analyse, C. Minot est également le créateur de quelques appareils. En 1869, alors âgé de 17 ans, il met au point un système pour réaliser des microphotographies. Suivra en 1886 la création du premier microtome rotatif dont les détails de son invention restent inconnus. La première référence à son appareil paraîtra dans la revue *Science* en 1897.

## ● *Un écrivain prolifique*

Charles Minot fut un auteur particulièrement prolifique puisque 6 pages dactylographiées (environ 132 articles) sont nécessaires à F. Lewis, pour lister l'ensemble de ses ouvrages, articles qu'il se plait également à rédiger en allemand.

Marié le 1<sup>er</sup> juin 1889 à Lucy Fosdick, fille de pasteur, il s'éteint le 19 novembre 1914 à l'âge de 62 ans, sans descendance. Considéré aux Etats-Unis comme le plus important anatomiste de cette époque, il reste cependant mal connu et c'est la partie accessoire de son œuvre : le microtome, qui a permis à son nom de perdurer dans le temps.

## **THRELFALL RICHARD.** Physicien et chimiste anglais (1861-1932)

Né le 14 août 1861 à Woodplumpton près de Preston, Lancashire, Angleterre, Threlfall est diplômé de Cambridge où il débutera également sa carrière professionnelle.

L'histoire du microtome de Threlfall commence en 1882 (mai-juin), lors d'une discussion entre l'étudiant et l'embryologiste W. H. CALDWELL. Ce dernier travaille sur des embryons d'animaux marins inclus en paraffine et sectionnés à l'aide d'un microtome à main. Caldwell expose alors à Threlfall les difficultés qu'il rencontre à obtenir des coupes d'égale épaisseur et surtout continues. Leur discussion s'achève sur un projet de "machine à produire des rubans".





Threlfall élabore les plans d'un microtome qu'il entreprend de faire dessiner, car il se dit piètre dessinateur, et fabrique à ses frais, Caldwell se désintéressant du projet. Dessiné par le professeur Stuart et produit par la société Michel, l'appareil voit le jour à Pâques 1883.

Le microtome à peine conçu, Threlfall essuie les critiques de Caldwell, qui renie l'appareil, et de Dew Smith, membre de la société *Cambridge instrument* qui déclare que le mouvement horizontal du porte-objet est une erreur.

Threlfall fait tester son microtome au laboratoire Cavendish à l'université de Cambridge où il donnera entière satisfaction et sera couramment utilisé pour la coupe d'embryons marins; coupes qui serviront d'ailleurs à l'illustration de la dernière édition de F.M. BALFOUR en 1885.

Malchanceux, tel peut être l'adjectif qualifiant ce scientifique car là ne s'arrêtent pas ses mésaventures. En 1883, dans le cadre de sa licence, il bénéficie d'une année supplémentaire pour travaux à l'étranger, qu'il voue à l'université de Strasbourg. Là il communique à un professeur les éléments de construction de son microtome et de sa technique de collage des coupes. Peu avant son retour en Angleterre, il découvre que tous ses dires ont été publiés sans aucune référence à sa personne, bien entendu !

Threlfall est également l'auteur de la technique dite au caoutchouc. Cette méthode de collage consiste à pulvériser sur les lames un mélange caoutchouc-solvant (naphta). Le solvant dissout la paraffine des coupes récupérées, tandis que le caoutchouc assure l'adhérence de la coupe à la lame, permettant ainsi de recueillir de 20 à 30 sections (d'embryons) sur une seule lame avec peu de perte. Cette technique ingénieuse sera pourtant facilement supplantée par la technique dite au "blanc d'œuf" en raison des nombreuses substances dénommées naphta mais dont l'action sur les coupes diffère considérablement.

En mars 1886 Threlfall se rend à l'université de Sidney, Australie, où il occupe le poste de professeur de physique. Hasard de la vie, il rencontre en ce pays un certain Ruffett, venu guérir de la tuberculose. Ce dernier, ancien employé du professeur Stuart en Angleterre, est l'auteur d'une copie secrète du microtome de Threlfall. Copie qu'il cède moyennant finance au physicien.

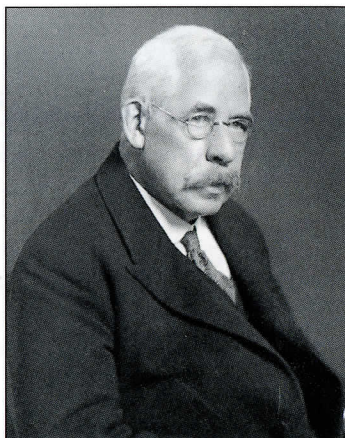
L'erreur de Threlfall, comme il le dira lui-même plus tard, est de ne pas avoir patenté cet appareil dont le principe de fonctionnement inspirera des firmes allemandes et dont Caldwell s'enorgueillira sans jamais avoir participé à son élaboration ou à son financement.

L'insuccès de ce microtome est également dû au manque de discernement et de reconnaissance entre les scientifiques des diverses disciplines scientifiques; que peut en effet, bien comprendre et apporter un chimiste aux techniques zoologiques ?

De retour en Angleterre, en 1898, la compagnie Albright & Wilson à Birmingham lui confie la fonction de directeur des recherches, poste qu'il occupera jusqu'à sa mort en 1932.

Chimiste avant tout, les travaux de sir Richard Threlfall ont principalement relevé de l'étude des gaz, de la dynamique des substances et des phénomènes d'explosion. Il travaillera à ses débuts avec Sir JOSEPH JOHN THOMSON (1856-1940), célèbre physicien anglais et inventeur du spectrographe de masse (prix Nobel, 1906), avec lequel il publiera quelques travaux.

Il s'éteint le 10 juillet 1932 à Edgbaston, Birmingham, Warwickshire, Angleterre après avoir été honoré par de nombreuses institutions dont la *Society of Chemical Industry*, qui lui décerne la médaille d'or des sciences en 1929.





## BIBLIOGRAPHIE

1. BECHER, S. Leitz's new rotary microtome. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1914, p.501-503.
2. BRACEGIRDLE, B. A *History of Microtechnique : the evolution of the microtome and the development of tissue preparations*. Science Heritage Ltd; 1978. ISBN: 0-9400-9500-9.
3. BROWN, G. *Introduction to Histo-technology : a manual for the student, practicing technologists and resident in pathology*. Appleton century crofts, New York, 1978, ASIN: 0838543405
4. COWLES, R.P. & RICHARDS, O.W. The Pfeifer and Minot automatic rotary microtome. *Tr. Am. Micro. Soc.*, 1947, 66, p. 379-382.
5. CULLING, C.F.A. *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*. Butterworths, 1972, ASIN: 0407729011.
6. ELIOT, C. Charles Sedgwick Minot. *Science*, 1915, 1063, p.701
7. GRAY, P. *Handbook of Basic Micro-technique*. Blakinson Company, New York, 1952.
8. HÄUSLER, F. Du microtome à main au microtome moderne pour coupes ultra-minces. *Microtechnic*. 1954, 8, p. 33-37.
9. HÄUSLER, F. Perfectionnements apportés au microtome de Danon et Kellenberger. *Microtechnic*. 1954, 8, p. 33-37.
10. HOME, R. W. : PHYSICS IN. AUSTRALIA TO. 1945. WWW edition prepared by Tim Sherratt and Victoria Young for Bright Sparcs, June 1995. <http://www.asap.unimelb.edu.au/bsparcs/physics/P000831p.htm> (Page consultée le 29.03.2001).
11. LANGERON, M. *Précis de microscopie*. Masson, Paris. 1942
12. LEWIS, F. Charles Sedgick Minot. *The Anatomical Record*. 1916, 10, 3, p. 133-164
13. REGAUD, C. L'Association des anatomistes. **Session de 1901**. p.5.
14. REGAUD, C. Titres et Travaux Scientifiques. **Concours pour l'agrégation**. Section d'anatomie et de physiologie. 1901. p.13.
15. RICHARDS, O. W. *The Effective use and proper care of the microtome*. New York, American Optical Company.1949.
16. ROBIN, M., GERRYLYNN R. The Open University (Departement of history of science): <http://www5.open.ac.uk/Arts/chemists/person.cfm?SearchID=5542>
17. THRELFALL, R. The Origin of the automatic microtome. *Biol. Reviews*, 1930, 5, p. 357-361.
18. WALTER, F. *Le Microtome : Manuel d'exécution de la confection et de la microtomisation des coupes. Manuel d'utilisation*, édité par Ernst Leitz GmbH Wetlar, 1961, 47p.

Sine nomine: *HTML created by GED2*  
HTML v3.5e-WIN95 (Sep 26 1998)  
<http://www.sedgwick.org/na/families/robert1611/ged/d0012/f0002571.html#I7108>

## Photos

Les photos en noir et blanc sont issues des articles ou monographies cités ci-dessus. Les photos en couleur ont été réalisées dans le service du Pr. Merlio à Bordeaux.

## Remerciements

Je tiens tout particulièrement, à faire part de ma gratitude à :

Monsieur le professeur James Edmonson conservateur du Museum d'histoire médicale de Dittrick, Cleveland, Ohio, USA, pour le

portrait et la biographie de Charles Sedgwick Minot.

Madame Rachel MacGregor responsable des archives de la bibliothèque de Birmingham, Grande Bretagne, pour les portraits de sir Richard Threlfall.

Monsieur le professeur Jean-Philippe Merlio, responsable du service d'histologie-embryologie à l'université Victor Segalen de Bordeaux pour m'avoir permis de réaliser les photographies des microtomes ainsi que les membres de son équipe qui m'ont si aimablement accueillie.

Pfizer Global R & D, pour les moyens dont j'ai pu bénéficier.

Madame Nicole Wuscher, du service d'histopathologie de l'Institut Pasteur, pour les informations concernant Claudius Regaud.



## DOUBLE MARQUAGE IMMUNO-HISTOCHEMIQUE : CD31/ADN FRAGMENTÉ

V. SALLEZ<sup>1</sup>, V. GUILPIN<sup>1</sup>, C. BUCANA<sup>2</sup>,  
C. COBORN<sup>2</sup>, Y.F. WANG<sup>2</sup>

1 : AVENTIS PHARMA/DSE - Service de Pathologie - Vitry-sur-Seine - France

2 : MD ANDERSON CANCER CENTER - Department of Cancer Biology - Houston - USA

### INTRODUCTION

L'immuno-histochimie permet de détecter des molécules tissulaires, appelées antigènes ou épitopes antigéniques, à l'aide de molécules sériques (anticorps) qui les reconnaissent de façon spécifique. La plupart des techniques en immuno-histochimie sont facilement réalisables et viennent principalement en complément de technique d'histologie classique, permettant au pathologiste d'affiner son diagnostic. Il est possible, en effet, d'identifier avec précision, grâce à l'immuno-histochimie, des agents infectieux ou certains types de tumeur. Par exemple, un marquage positif à la kératine sur une tumeur indifférenciée permettra au pathologiste d'orienter son diagnostic vers un carcinome plutôt que vers un sarcome, ce qui est important pour la conduite thérapeutique à suivre.

Un marquage immuno-histochimique simple, permet d'identifier et de localiser un antigène sur une préparation tissulaire ou cellulaire. Par exemple, sur une coupe de

lymphome, un simple marquage suffit pour classifier cette tumeur comme un lymphome à cellules B ou T.

Mais parfois, un marquage simple donne une réponse insuffisante. Pour reprendre l'exemple précédent, le simple marquage permet d'identifier un lymphome à cellule T mais pour savoir si ces cellules T sont CD4 + ou CD8 +, il est nécessaire de réaliser un double marquage.

Permettant non seulement de détecter deux antigènes sur un même tissu et d'évaluer leur localisation l'un par rapport à l'autre, le double marquage présente cependant certains inconvénients principalement d'ordre technique.

Le double marquage correspond à deux marquages simples successifs et, est de ce fait, plus difficile à réaliser. Pour réaliser un double marquage de bonne qualité, il faut absolument maîtriser individuellement le marquage simple de chaque antigène. Parmi les paramètres à maîtriser, le fixateur peut se

révéler être un élément difficile à gérer celui-ci devant être commun aux deux antigènes. Sachant que certains antigènes (les antigènes membranaires principalement) sont dénaturés par la fixation, le choix du fixateur est fondamental.

Une technique de double marquage CD31 / TUNEL est décrite ci-dessous.

## **PRINCIPE**

Le CD31 appelé aussi PECAM 1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) est une glycoprotéine membranaire d'environ 130 kDa. Exprimée par les cellules endothéliales et certaines cellules hématopoïétiques comme les leucocytes et les plaquettes, cette molécule joue un rôle important dans les interactions cellulaires.

Le CD31 est mis en évidence par une réaction immuno-histochimique indirecte (cf. figure n°1) mettant en jeu un anticorps primaire, un anticorps secondaire, une peroxydase et de la Di-Amino-Benzidine (DAB). Avec ce marquage, les cellules CD31 + apparaissent en marron.

La mort cellulaire, qu'elle soit induite ou programmée, se caractérise par une fragmentation de l'ADN (cf. figure n°2) qui peut-être mise en évidence par une technique immuno-histochimique appelée T.U.N.E.L. (TdT-mediated d'UTP-X Nick End Labeling).

Le principe de cette technique est simple et repose sur la libération de terminaisons hydroxyles "OH" lors de la fragmentation de l'ADN sur lesquelles peuvent venir se fixer des nucléotides modifiés (radioactifs ou non) à l'aide de la TdtT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase). Dans la technique décrite ci-après, l'incorporation de Biotin-

16-d'U.T.P. est mise en évidence grâce à un complexe [Streptavidine/Avidine/Peroxydase] et au 3-Amino-9-Ethylcarbazole (AEC) permettant de visualiser en rouge les cellules à ADN fragmentée.

## **METHODE**

### **A) LA FIXATION**

Les tissus (tumeurs implantées dans la paroi abdominale de souris) sont prélevés et immergés dans du méthanol pur pendant 20 heures en moyenne (de 4 à 72 heures) à température ambiante (T.A.)

### **B) LA DESHYDRATATION ET L'IMPREGNATION**

Les tissus sont déshydratés et imprégnés sur un temps très court afin de limiter la dénaturation de l'antigène par la paraffine :

Ethanol 100 %	3 x 30 minutes
Xylène	3 x 30 minutes
Paraffine	2 x 1 heure

### **C) L'INCLUSION, LA MICROTOMIE, LE SECHAGE**

Des coupes de tissu de 3 mm d'épaisseur sont réalisées et déposées sur des lames traitées au néoprène pour être ensuite séchées dans une étuve à 37° C pendant une nuit.

### **D) TECHNIQUE**

#### **\* Blocage des peroxydases endogènes**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au 1/10<sup>ème</sup>  
dans du méthanol 10 min à T.A.

**Rinçage en PBS**



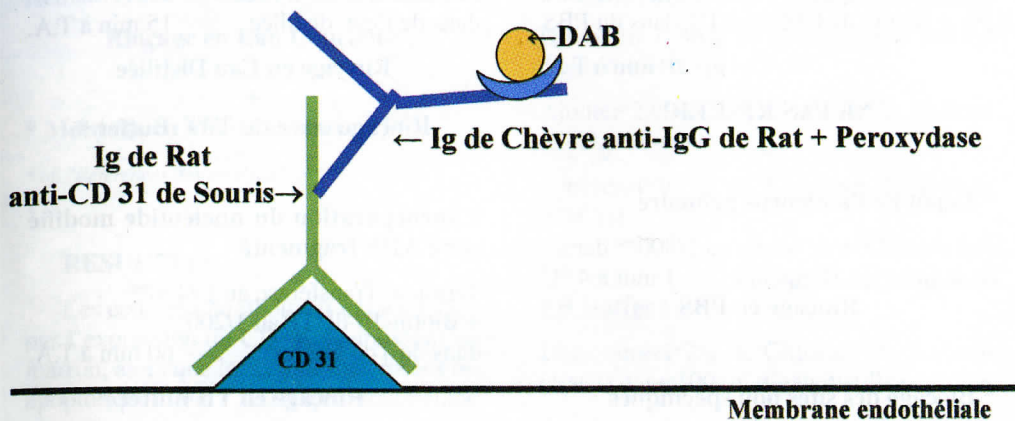


Figure n°1 : Marquage du CD 31 par immuno-histochimie indirecte.

### **Mort Induite (Nécrose)**

Augmentation de la taille des organelles  
**Condensation de la chromatine**  
 Perte d'intégrité membranaire

### **Mort Programmée ( Apoptose)**

Bourgeonnement du cytoplasme  
**Fragmentation de la chromatine**  
 Phagocytose des corps apoptotiques

**FRAGMENTATION DE L'ADN**

**Aléatoire**

**En segments  
de 180 à 200 nucléotides**

Figure n°2 : La mort cellulaire

**\* Blocage des sites non spécifiques**

Solution Bloquante = Sérum de Cheval à 5% + Sérum de Chèvre à 1% dans du PBS

20 min à T.A.

**NE PAS RINCER!**

**\* Dépôt de l'anticorps primaire**

Rat anti-CD31 de souris au 1/800<sup>ème</sup> dans de la Solution Bloquante 1 nuit à 4 °C

**Rinçage en PBS**

**\* Blocage des sites non spécifiques**

Sérum de cheval à 5% + Sérum de chèvre à 1% dans du PBS 5 à 10 min à T.A.

**NE PAS RINCER!**

**\* Dépôt de l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase**

[Chèvre anti IgG de rat + peroxydase] au 1/200<sup>ème</sup> dans de la Solution Bloquante 60 min T.A.

**Rinçage en PBS**

**\* Dépôt du premier substrat**

DAB 5 à 10 min à T. A.

**Rinçage en Eau Distillée**

**\* Fixation du premier marquage**

Paraformaldéhyde à 4 % 20 min à T.A.

**Rinçage en Eau Distillée**

**\* Démasquage enzymatique**

Protéinase K au 1/1000<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée 15 min à T.A.

**Rinçage en Eau Distillée**

+

**Rinçage avec du TdT Buffer \***

**\* Incorporation du nucléotide modifié sur l'ADN fragmenté**

Terminal Transférase au 1/400<sup>ème</sup> + Biotin-16-dUTP au 1/200<sup>ème</sup> dans du TdT Buffer\* 60 min à T.A.

**Rinçage en TB Buffer \***

+

**Rinçage en Eau Distillée**

**\* Blocage des sites non spécifiques**

BSA à 2% + Sérum de cheval à 5% dans de l'eau distillée 10 min à T.A.

**Rinçage en Eau Distillée**

+

**Rinçage en PBS**

**\* Dépôt de l'enzyme**

Streptavidine + Peroxydase au 1/400<sup>ème</sup> dans la Solution de Détection \* 30 min à T.A.

**Rinçage en PBS**

**\* Dépôt du second substrat**

AEC 15 min à T.A.

**Rinçage en PBS**



## \* Contre coloration

Hématoxyline de Gill                      qq secondes

### Rinçage en Eau Courante

## \* Montage en milieu aqueux

\* cf. "Références des produits"

## REFERENCES DES PRODUITS

### TdT Buffer :

Dissoudre 0,36 g de Trizma dans 100 ml d'eau distillée (pH  $\approx$  7,2)

Ajouter 2,99 g de Cacodylate de Sodium ( $C_2H_6AsNaO_2$ )

Ajouter 0,01 g de Chlorure de Cobalt ( $CoCl_2$ )

### TB Buffer :

Dissoudre 1,7 g de Chlorure de Sodium (NaCl) dans 100 ml d'eau distillée

Ajouter 0,88 g de Tri-Citrate de Sodium ( $C_6H_5Na_3O_7$ )

## RESULTATS

Les cellules endothéliales caractérisées par l'expression du CD31 apparaissent en marron, alors que les cellules nécrosées ou apoptotiques dont l'ADN a été fragmentée apparaissent en rouge. Les noyaux quant à eux sont colorés en bleu.

PRODUITS	REFERENCES	FOURNISSEURS
Rat anti-CD 31 de souris (Clone : MEC 13.3)	01951 D	Pharmingen
Chèvre anti-IgG de rat + Peroxydase	112-035-102	Jackson ImmunoResearch
DAB	750118	Research Genetic
Protéinase K	1 373 196	Roche
Terminal transférase	220 582	
Biotin-16-UTP	1 093 070	
Streptavidine / HRP	P 0397	Dako
AEC	HK092-5K	Biogenex
Hématoxyline de Gill	H 7264	Sigma
Trizma	T 8524	
Cacodylate de Sodium		Prolabo
Chlorure de Cobalt		
Chlorure de Sodium		
Tri-Citrate de Sodium		
Chlorure de Magnésium		

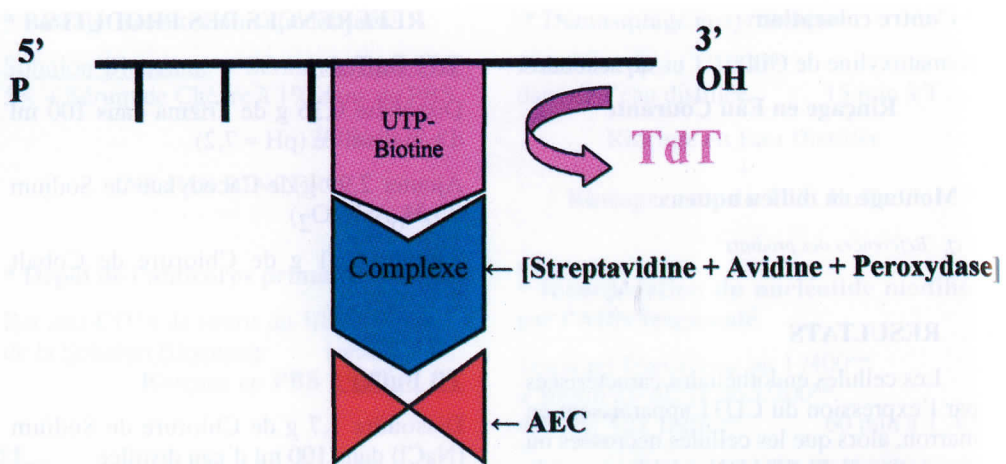


Figure n°3 : Mise en évidence de la Fragmentation de l'A.D.N. par la méthode T.U.N.E.L.

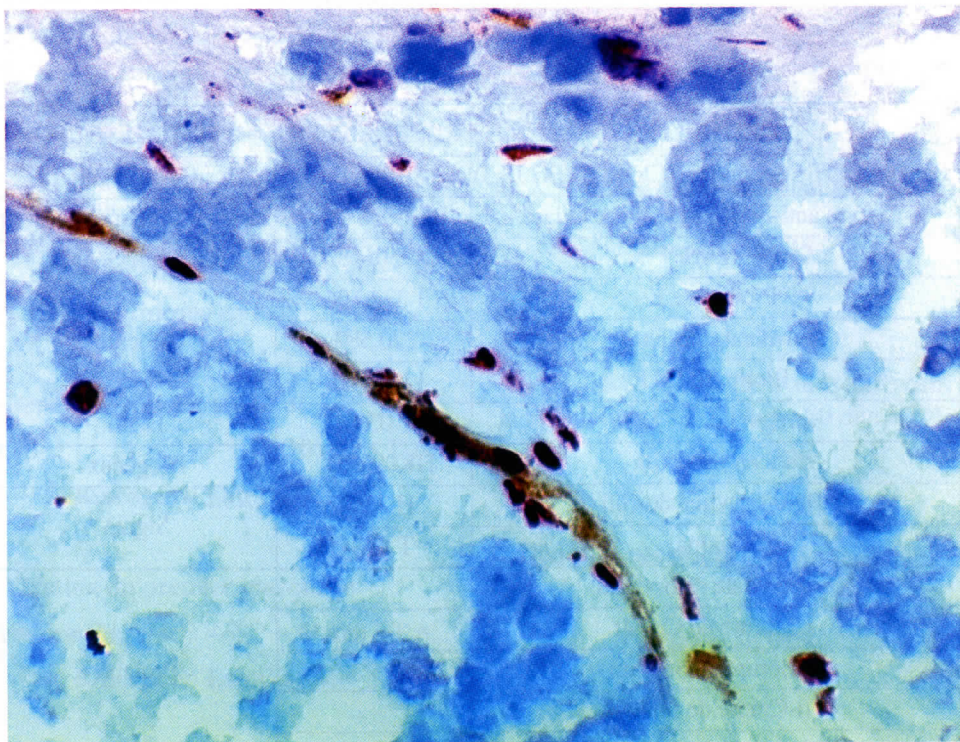


Figure n°4 : Double marquage CD31/TUNEL sur tumeur de souris



### Solution de Détection :

Cette solution est stable à 4°C pendant 1 an  
95 ml d'eau distillée

1,21 g de Trizma

2,92 g de Chlorure de Sodium (NaCl)

200 mg de Chlorure de Magnésium (MgCl<sub>2</sub>)

700 ml d'Acide Chlorhydrique pur (HCl)

50 ml de Tween 20

Ajuster à un pH 8 et compléter avec de l'eau distillée afin d'avoir un volume total de 100 ml.

### CONCLUSION

Ce double marquage CD31 / Fragmentation de l'ADN permet d'identifier les cellules endothéliales et apoptotiques (cf figure n° 4). Il est relativement facile à réaliser et met en jeu deux méthodes différentes IHC (immuno-histochimie) indirecte et TUNEL. Mais en règle générale, les marquages immuno-histochimiques multiples sont complexes à réaliser et nécessitent certaines précautions :

Il faut travailler avec un fixateur permettant la mise en évidence de tous les antigènes à étudier. La durée de fixation doit être optimisée de telle façon que l'architecture tissulaire soit préservée et que les sites antigéniques ne soient pas dénaturés.

Il est indispensable de maîtriser et de tester individuellement chaque marquage (en particulier sa spécificité) puis de vérifier que l'application simultanée ou consécutive des réactifs ne fait pas apparaître d'artéfacts.

Pour éviter de nombreux artéfacts, il est conseillé de réaliser de nombreuses étapes

bloquantes des sites immuno-réactifs non spécifiques à l'aide de solutions composées d'albumine, de sérum normal, ... De même, pour limiter d'éventuelles réactions croisées entre anticorps, il est judicieux de choisir des anticorps primaires (polyclonaux) d'espèces différentes mais par contre, des anticorps secondaires préparés chez la même espèce.

Le choix des enzymes, du substrat et du contre-colorant a un rôle primordial dans la révélation. Lorsque les antigènes à mettre en évidence sont à des localisations bien distinctes, deux enzymes identiques peuvent être utilisées, en saturant bien celle qui interviendra en premier au cours du premier marquage. Par contre, il est fortement conseillé d'utiliser des enzymes différents (par exemple une peroxydase et une phosphatase) pour mettre en évidence des antigènes dont la localisation est proche.

Le choix des chromogènes et contre-colorant, se fait de telle façon que les couleurs soient bien contrastées. Par exemple, il faut éviter d'utiliser un chromogène "bleu" et une contre coloration à l'hémalum et de même un chromogène comme l'AEC (rouge) avec une contre coloration au rouge nucléaire.

Il ne faut pas non plus hésiter à tester plusieurs enzymes, chromogènes ou contre-colorants de plusieurs fournisseurs ; leur qualité variant énormément.

Et pour finir, ne jamais conclure hâtivement à une co-localisation en cas de superposition des marquages mais toujours suspecter la possibilité de réactions croisées et donc d'inclure de nombreux contrôles à chaque étape des techniques immuno-histochimiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. VECCHI A., GARLANDA C., LAMPUGNANI M.G., Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels, *Eur. J. Cell Biol.* 1994 63 : 247-254
2. VANZULLI S., GAZZANIGA S., BRAIDOT M.F., Detection of endothelial cells by MEC 13.3 monoclonal antibody in mice mammary tumors, *Biocell* 1997 21: 39-46
3. CONSTANT A.A., BENJAMIN S.B., TESSARI J.D. Increased rate of apoptosis correlates with hepatocellular proliferation in rats, *Toxicologic Pathology* 1996 24 (3): 315-322
4. KIM J.M., LUO L., ZIRKIN B.R., Caspase -3 activation is required for Leydig Cell, *Endocrinology* 2000 141 (5): 1846-1853
5. COLECCHIA M., FRIGO B., DEL BOCA C, Detection of apoptosis by the TUNEL technique in clinically localized prostatic cancer before and after combined endocrine therapy, *J Clin Pathology* 1997 May 50 (5): 384-388
6. SCHWANDNER O., SCHIEDECK TH., BRUCH HP., Apoptosis in rectal cancer : prognostic significance in comparison with clinical histopathologic, and immunohistochemical variables, *Dis Colon Rectum* 2000 Sep 43(9) : 1227-1236
7. RIEKO I., YUKICHI TANAKA, KEISUKE KATO, Clinicopathologic study of mass screened neuroblastoma with special emphasis on untreated observed cases, *The American Journal of Surgical Pathology* 2000 24 (6) : 807-815

# MISE EN EVIDENCE DE L'APOPTOSE NEURONALE DURANT LA METAMORPHOSE CHEZ *XENOPUS LAEVIS* PAR LA METHODE TUNEL

J. ESTABEL et J. M. EXBRAYAT

*Laboratoire de Biologie Générale, Université Catholique  
et Laboratoire de Reproduction et Développement des Vertébrés  
Ecole Pratique des Hautes Etudes, 25 rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 02  
E-mail : jestabel@univ-catholyon.fr*

## INTRODUCTION

Au cours du développement embryonnaire d'un organisme, il existe des phénomènes génétiquement contrôlés qui régissent la vie et la mort des cellules.

Contrebalançant les mécanismes de division, la mort cellulaire programmée ou apoptose est un phénomène essentiel dont le rôle est la régulation du nombre de cellules et l'élimination des cellules non fonctionnelles ou potentiellement dangereuses pour l'organisme (1, 2).

L'apoptose pendant la métamorphose des Amphibiens n'a été étudiée que d'un point de vue musculaire lors de la régression de la queue (3).

Notre étude a alors porté sur un aspect plus large de l'apoptose en intégrant le système nerveux central (moelle épinière et ganglions spinaux) et les muscles.

L'étude semi-quantitative a également été réalisée pour essayer d'établir une car-

tographie spatio-temporelle des cellules apoptotiques au cours du climax (étape finale de la métamorphose).

## Rappel sur l'apoptose

L'apoptose peut être une mort cellulaire physiologique lorsqu'elle s'inscrit dans un programme de développement ou de vieillissement, ou alors une mort cellulaire réactionnelle aux modifications environnementales. Elle est souvent opposée à la nécrose.

Les modifications morphologiques (4) induites par l'apoptose sont nombreuses. Le cytoplasme devient condensé avec des organites cellulaires intacts. Au niveau du noyau, on observe une condensation périphérique puis totale de la chromatine (clivage de l'ADN).

Ces phénomènes aboutissent à la fragmentation du noyau et à la formation de "corps apoptotiques", unités entourées d'une membrane plasmique et contenant du cytoplasme, des organites et quelques fragments nucléaires. Le clivage de l'ADN peut-être



mis en évidence par la méthode TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*) (5).

## MATERIEL ET METHODES

Le matériel biologique utilisé est le Xénope (*Xenopus laevis*) pigmenté, crapaud sud-africain. Les Xénopes sont des Amphibiens totalement aquatiques. Ces animaux sont utilisés en recherche biologique car ils sont adaptables, résistants et se reproduisent assez facilement. Les sexes sont assez faciles à déterminer car la femelle est plus ronde et presque deux fois plus grande que le mâle. Le corps de ces crapauds mesure environ une douzaine de cm.

Les Xénopes sont maintenus en élevage dans des aquariums contenant 50L d'eau du robinet à une température de 20 à 25°C. L'éclairage est maintenu en alternance 12h de jour et 12h de nuit. 25 à 50% environ de l'eau est renouvelée régulièrement. Les crapauds sont nourris avec des granulés pour truites (4 à 5 granulés/individu/jour).

Les adultes sont obtenus auprès du service d'élevage de Xénopes du CNRS à Rennes (UPRES-A 6026 CNRS- Université Rennes I).

Les têtards sont obtenus par fécondations *in vitro* réalisées au laboratoire. Les stades de développement sont déterminés grâce à la table de Nieuwkoop et Faber (6).

Pour chaque stade, un ou plusieurs têtards sont fixés au Paraformaldéhyde (PF) 4% refroidi préparé extemporanément. Les têtards sont ensuite inclus en blocs de paraffine puis débités en coupes sérieées de 7 µm.

Les coupes sérieées pour l'étude *topographique* sont montées sur lames de verre et colorées par le Trichrome de Masson-Goldner qui permet une étude structurale.

Les coupes sérieées pour l'étude de l'*apoptose* par la méthode TUNEL sont montées sur des lames Superfrost® Plus avec de l'eau distillée stérile. Des lames (1 sur 10) sont colorées par la coloration de Nissl pour permettre le repérage anatomique.

La méthode TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labelling*) est une technique permettant de détecter et de quantifier les cellules apoptotiques.

Pendant le phénomène apoptotique, l'ADN des cellules en apoptose est découpé en fragments de faible poids moléculaire (mono- et oligonucléosomes) mais aussi en fragments de haut poids moléculaire ("nick").

L'utilisation d'une enzyme ("*Terminal deoxynucleotidyl transferase*" ou TdT) catalyse la polymérisation de nucléotides marqués par de la fluorescéine à la partie 3'-OH libre des fragments d'ADN (figure 1). La manipulation est réalisée avec le kit "*In situ cell death detection, fluorescein*" de Roche diagnostics.

### Mode opératoire

1- Déparaffiner (2 x 10mn par le cyclohexane) et hydrater les coupes.

2- Incuber les coupes avec de la protéinase K (Sigma) 20 µg/ml pendant 30 mn à 37°C.

3- Rincer les coupes 2 x 5mn au tampon PBS

4- Ajouter 50 µL de la solution TUNEL préparée extemporanément pendant 60 mn à 37°C en chambre humide.

5- Rincer les coupes 3 x 5mn au tampon PBS

6- Montage avec du *Gel Mount* spécial fluorescence (Biomed, MICROM France).

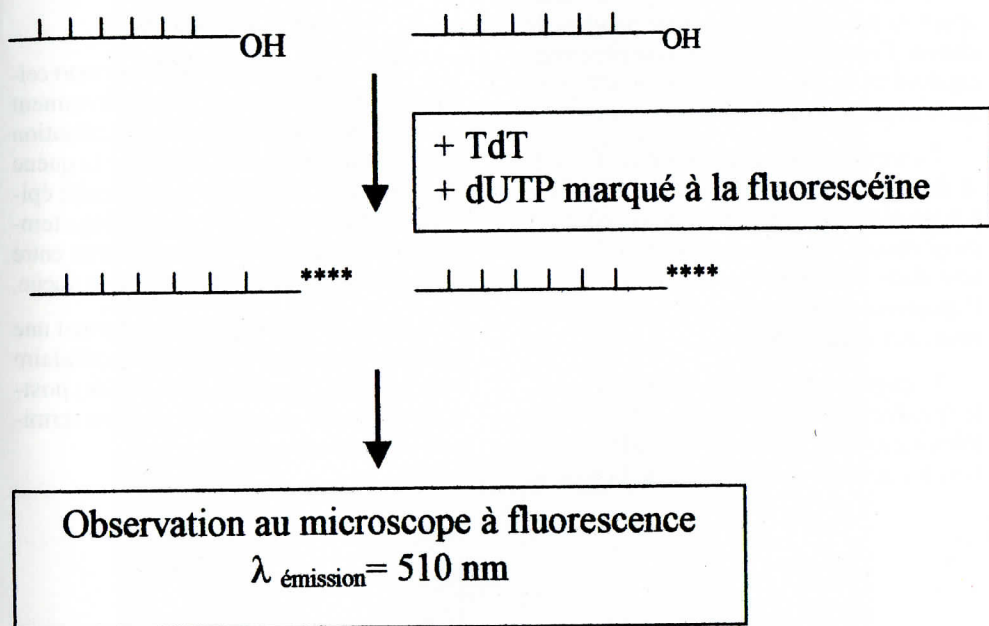


Figure 1 : Schéma de la méthode TUNEL

7- Observation au microscope à fluorescence à  $\lambda=510$  nm

*N.B.* : Des contrôles négatifs sont réalisés en omettant l'enzyme TdT.

## RESULTATS

La métamorphose chez les Amphibiens est une des phases du développement présentant un taux très important de cellules apoptotiques particulièrement pendant le climax. Cette mort cellulaire concerne principalement la queue (muscles, moelle épinière et peau).

La mort cellulaire programmée présente des caractéristiques spatio-temporelles. Un décalage temporel de la mort cellulaire programmée est observé entre le pic d'apoptose dans la moelle épinière (stade 58) et l'apoptose musculaire de la queue (maximum aux stades 62-63).

L'apoptose des neurones dans la moelle épinière induit certainement celle des cellules musculaires. Suivant les stades observés, les cellules apoptotiques de la moelle

épinière sont localisées soit dans la partie dorsale (stade 58 : dégénérescence des cellules de Rohon-Beard) soit dans la partie ventrale (stade 61 : dégénérescence de certains motoneurones) (photos 1 et 2).

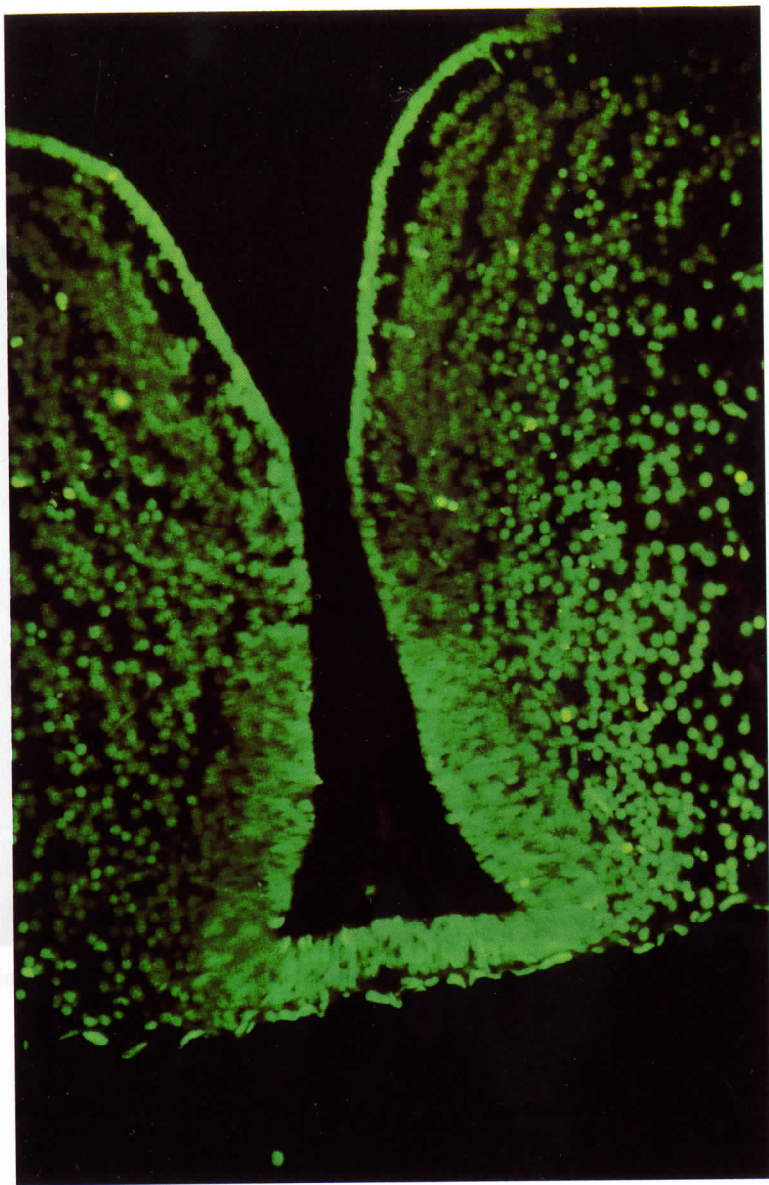
Les ganglions spinaux présentent également des cellules apoptotiques avec un pic de fréquence au stade 56.

## CONCLUSIONS

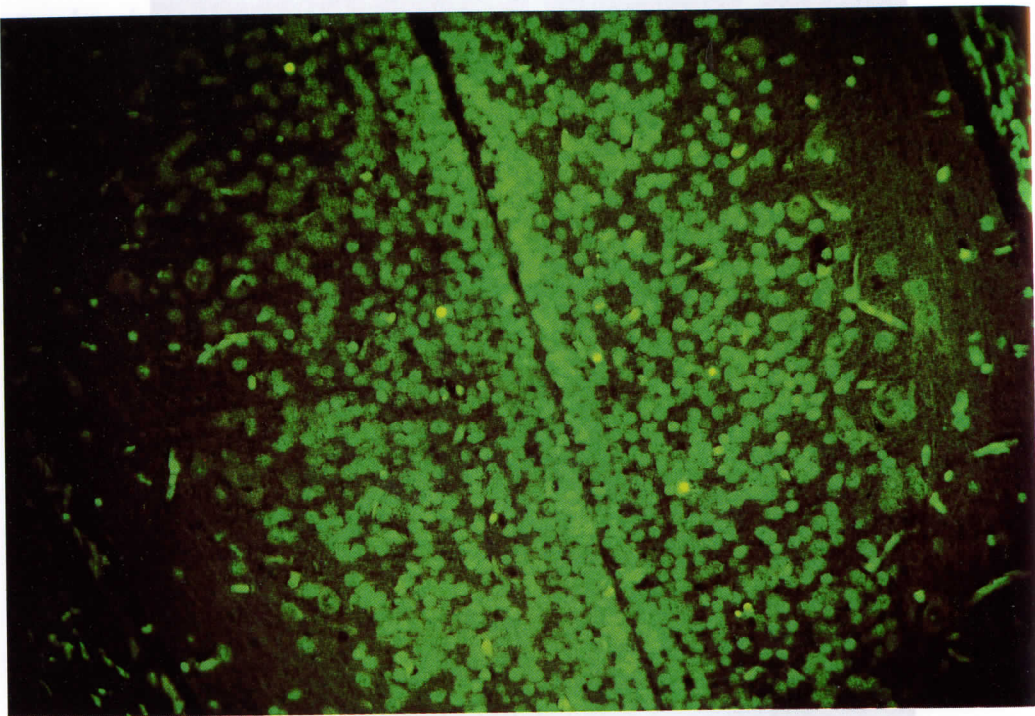
Pendant la métamorphose, la mort cellulaire programmée affecte différemment les cellules en fonction de leur localisation et de leur fonction. Elle remodèle la queue et permet une maturation de la moelle épinière. Cette étude montre un décalage temporel de la mort cellulaire programmée entre la moelle épinière et les muscles de la queue.

L'étude chez *Xenopus laevis* permet une approche quantitative de la mort cellulaire programmée pendant des stades post-embryonnaires au cours de la phase terminale de la métamorphose.





**Photo 1 : Stade 61. Cellules apoptotiques (cellules jaunes brillantes) dans la partie ventrale du diencephale.**



**Photo 2: Stade 61. Cellules apoptotiques (cellules jaunes brillantes) dans la moelle épinière.**

## BIBLIOGRAPHIE

1. JACOBSON M.D., WEIL M., RAFF M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997. 88 :347-354.
2. MEIER P. ; FINCH A. ; EVAN G. Apoptosis in development. *Nature*. 2000. 407 :796-801.
3. WEBER R. Ultrastructural changes in regressing tail muscles of *Xenopus* larvae at metamorphosis. *J Cell Biol*. 1964. 22 :481-487.
4. SARASTE A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*. 1999. 24 : 189-195.
5. GAVRIELI Y. ; SHERMAN Y. ; BEN-SASSON S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol*. 1992. 119(3) :493-501.
6. NIEUWKOOP P.D. ; FABER J. Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). North Holland. Amsterdam. 1967.



# ETUDE ULTRASTRUCTURALE DES MEMBRANES OVOCYTAIRES DU BLACK-BASS (*Micropterus salmoides*) AU COURS D'UN CYCLE SEXUEL

MARTIN M., HARDY I., EXBRAYAT J.M., GOUBIER V.

Laboratoire de Biologie générale - Université Catholique de Lyon et Laboratoire  
de Reproduction et Développement des Vertébrés EPHE  
25 rue du Plat - 69288 Lyon Cedex 02 - France. [ihardy@univ-catholyon.fr]

## INTRODUCTION

Les enveloppes qui entourent l'ovocyte ont été observées, à la fois en microscopie photonique et en microscopie électronique, et décrites depuis longtemps chez de nombreuses familles et espèces de poissons : Mugilidés, (1), *Salvelinus fontinalis*, *Salmo gairdneri*, *Perca fluviatilis*, (2, 3), *Cichlasoma nigrofasciata* (4) pour citer les études les plus anciennes. Des travaux plus récents se sont intéressés à l'évolution de ces enveloppes au cours d'un cycle sexuel, *Dicentrarchus labrax* (5, 6, 7, 8, 9), et par ce travail nous avons voulu nous inscrire dans cette approche. En effet, l'observation en microscopie électronique de l'évolution des enveloppes de l'ovocyte du black-bass (*Micropterus salmoides*) complète des études histologiques antérieures réalisées au cours des cycles sexuels de plusieurs années consécutives, dans le but de contrôler et d'améliorer la reproduction de cette espèce, dans le contexte de l'élevage (10, 11, 12, 13).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel utilisé est un lot homogène de black-bass de 3 ans, élevés dans une ferme aquacole (Ferme aquacole du Beaujolais, Rhône, France), sur lequel des échantillonnages réguliers mensuels ont été effectués par pêche au filet ou à la ligne.

Immédiatement après la pêche, les ovaires des femelles ont été prélevés et pesés au centigramme près, (balance électronique de précision SARTORIUS 1465 MP8). Elles ont ensuite été fixées pour une partie dans du Bouin pour des coupes histologiques classiques, observables en microscopie photonique. Une autre partie de l'ovaire (sous forme de fragments d'environ 1mm<sup>3</sup>) a été fixée dans du liquide de Karnowski (glutaraldéhyde à 4%, paraformaldéhyde à 2%, tampon de Sorensen à 0.2 M, pH 7.4, (1:1:2) pression osmotique de 300mOs/l), puis rincée dans une solution de lavage (tampon de Sorensen à 0.175M) pendant au moins 2 heures (14). Puis on a procédé à une post-fixation de ces fragments dans le tétroxyde

d'osmium à 2% dans du tampon de Sorensen à 0.2 M, pH 7.4 (1 : 1). Les échantillons ont ensuite été inclus dans de l'Epon<sup>1</sup> et introduits, avec le milieu d'inclusion, dans des gélules de gélatine. Après 12 heures de polymérisation et durcissement l'ensemble se présente en blocs de résine contenant la préparation, blocs que l'on a façonné à la lame de rasoir en forme de troncs de pyramide. Ceux-ci ont été débités à l'ultramicrotome (Ultracut Reichert) en coupes semi fines (1µm d'épaisseur) ou ultrafines (60 à 90 nm d'épaisseur). Les coupes ultrafines ont été récupérées sur des grilles de cuivre comportant une vingtaine de mailles sur un diamètre utile de 2.3 mm. Les coupes ont ensuite été contrastées à l'acétate d'uranyle à saturation dans l'éthanol, puis au citrate de plomb. Elles ont ensuite été observées au microscope électronique à transmission HITACHI H300.

Parallèlement, pour l'observation en microscopie photonique, les meilleurs résultats de lisibilité ont été obtenus avec une coloration des coupes à l'azan de Roméis.

Le tableau I donne les caractéristiques des poissons qui ont fait l'objet d'observations ultrastructurales, poissons pêchés à 5 moments différents de l'année, octobre, décembre, avril, début mai et fin mai. Cette périodicité a été retenue après observation en microscopie photonique, des coupes histologiques de tout l'échantillon, de façon à sélectionner les coupes qui présentaient les stades de maturation des ovaires de la façon la plus significative (10). Les valeurs du GSI (rapport de la masse de l'ovaire à la masse du corps, multiplié par 100) qui traduit aussi le niveau de maturation des ovaires ont été mentionnées dans le tableau.

identification du poisson	date de pêche	Taille (cm) et Masse (g)		valeur du GSI (%)	identification de la grille	nombre de grilles étudiées
98-7	28/10/98	27.5	240	2.21	A	5
98-7	28/10/98				B	1
98-9	21/12/98	22.5	146	1.96	C	5
98-9	21/12/98				D	3
99-20	01/04/99	24.6	198.5	3.11	E	5
99-28	10/05/99	25.5	205	6.05	F	5
99-34	25/05/99	24.5	225.6	10.36	G	5

**Tableau I. Caractéristiques des poissons dont les follicules ont fait l'objet d'observations en microscopie électronique.**

<sup>1</sup>. Les résines epoxy sont constituées d'un monomère (Epikote 812) d'un ou plusieurs durcisseurs (DDSA = dodécényl succénil anhydride, MNA = méthyl nadic anhydride) d'un accélérateur (DMP30 = 2,4,6 tridiméthylaminoéthylphénol).

Le milieu utilisé est un mélange Epon A (Epikote 812 et DDSA) Epon B (Epikote 812 et MNA) et DMP 30. Le temps d'imprégnation est de 12 heures (14)

## RÉSULTATS

Les ovocytes sont entourés d'enveloppes concentriques, cellulaires ou non cellulaires, et l'ensemble constitue le follicule ovarien. La structure de ces enveloppes, leurs dimensions, les rapports entre les ovocytes et les cellules folliculeuses varient au cours du cycle, simultanément avec la maturation de l'ovocyte pendant l'ovogénèse.

C'est ainsi que l'on distingue :

- un stade prévitellogénique caractérisé par des enveloppes ovocytaires (épithélium folliculaire, cellules thécales, lame basale) peu distinctes et peu observables en microscopie photonique.

- un stade vitellogénique que l'on dit tel à partir du moment où s'effectue le stockage des lipoprotéines, caractérisé par le développement et l'épaississement des enveloppes folliculaires et thécales et celui de la zona radiata.

La figure 1 montre une vue d'ensemble de ces deux stades, sur des coupes colorées à l'azan de Roméis et observées en microscopie photonique.

En microscopie électronique on peut voir sur les photos de la figure 2 la succession des enveloppes de l'ovocyte en début de vitellogénèse :

- les couches acellulaires essentiellement constituées par la zona radiata, interne et externe, les microvillosités qui font communiquer l'ovocyte avec les couches cellulaires que sont les membranes folliculaires et thécales (figure 2.A). Le détail des couches acellulaires est montré sur la figure 2B. On observe un enchevêtrement de stries, transversales et longitudinales formant la couche interne (zri), tandis que la couche externe (zre), beaucoup plus étroite,

présente une structure à la fois compacte et criblée d'orifices, opaque aux électrons.

Les microvillosités, excroissances des membranes plasmiques de l'ovocyte d'un côté et des cellules folliculaires de l'autre sont, en fin de prévitellogénèse, courtes et orientées de manière irrégulière. Avec la maturation de l'ovocyte elles s'allongent, s'organisent régulièrement et s'espacent du fait de l'augmentation de la distance ovocyte/cellules folliculaires (figure 1C)

- les couches cellulaires constituées de la granulosa contenant les cellules folliculaires et de la thèque contenant les cellules thécales déjà observées sur la figure 1A.

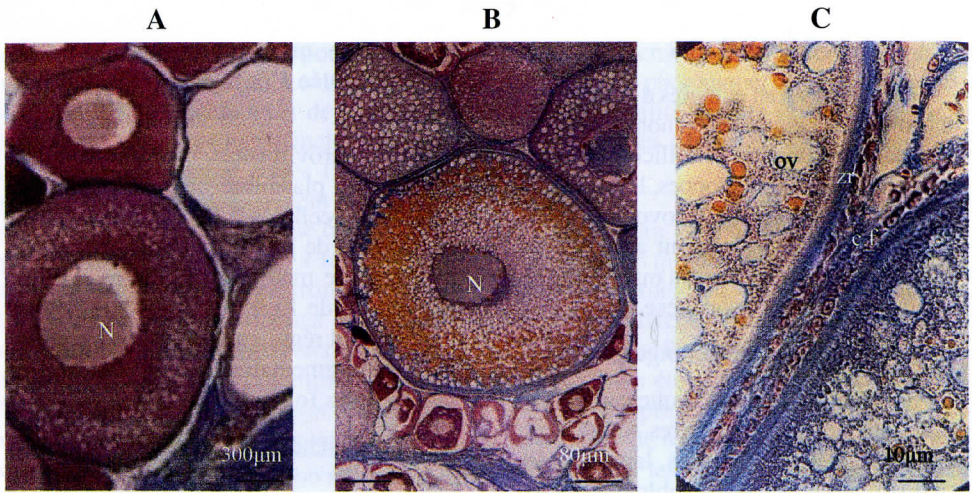
Les cellules folliculaires sont disposées en rangées régulières ou pseudo stratifiées, bien visibles en microscopie photonique (figure 1C) si les colorations sont adéquates. Elles présentent un gros noyau chromophile au nucléole arrondi (figure 3A), témoin d'une vitellogénèse avancée, ou plus diffus (figure 3C) et un cytoplasme relativement réduit. La portion de cytoplasme proche du noyau contient du réticulum endoplasmique lisse bien développé et de très nombreuses mitochondries aux crêtes tubulaires, caractéristiques d'une activité cellulaire stéroïdogène.

Les cellules de la thèque sont longues et étroites, fusiformes, séparées des cellules folliculaires par une lame basale.

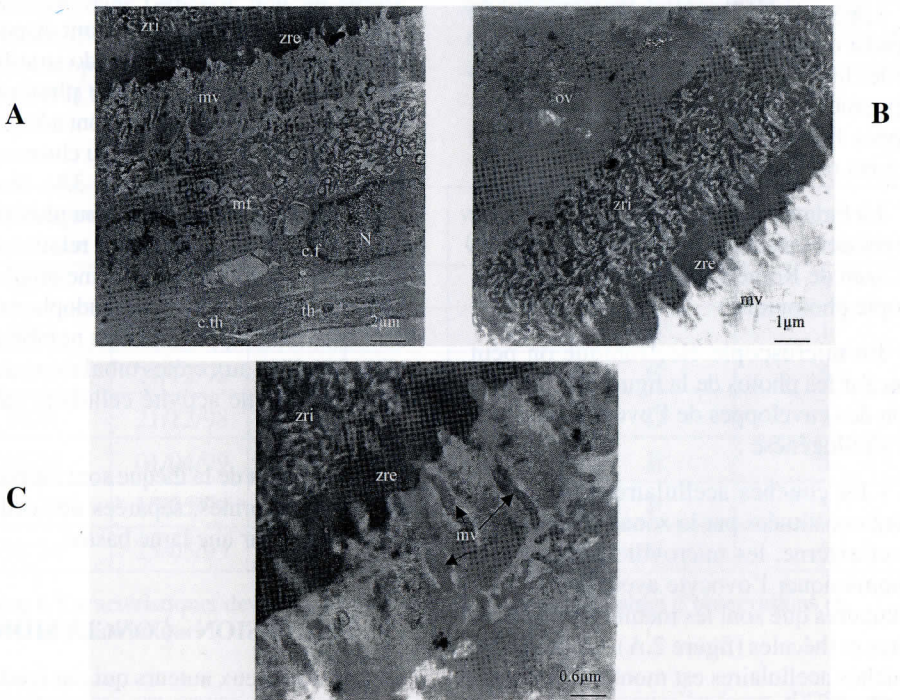
## DISCUSSION - CONCLUSION

Les nombreux auteurs qui ont étudié le processus de reproduction ont jugé important de connaître et de comprendre le fonctionnement des structures qui permettaient les échanges au niveau de l'ovocyte, futur





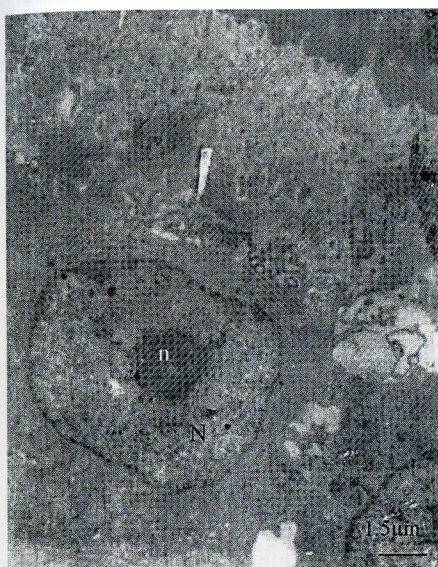
**Figure 1 : Les enveloppes ovocytaires aux stades prévitellogénique (A) et vitellogénique (B) ; détail des enveloppes (x100) (C).**



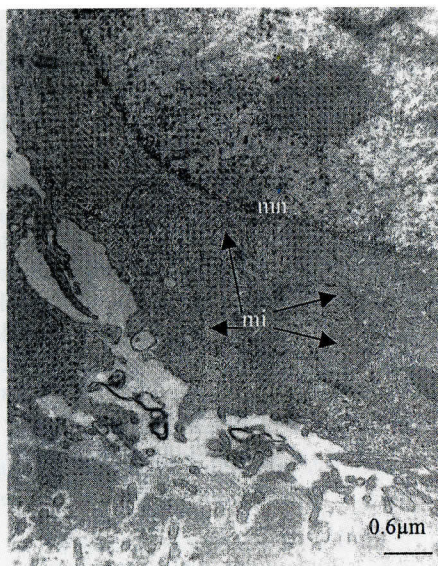
**Figure 2 : Les enveloppes de l'ovocyte. A : succession des couches ; zona radiata interne (zri), zona radiata externe (zre), microvillosités (mv), membrane folliculaire (m.f), cellule folliculaire (c.f), thèque (th), cellule thécale (c.th). B : détail des couches acellulaires à partir de l'ovocyte (ov). C : microvillosités d'un follicule au stade vitellonénique.**



A



B



C



D



**Figure 3 : Cellules folliculaires de l'épithélium folliculaire A, B, C et cellule thécale D.**  
 (mi = mitochondries, rel = reticulum endoplasmique lisse, n = nucléole, N = noyau).

œuf. Et c'est dans cette optique que nous avons placé notre travail.

Ainsi, Kobayashi (6) étudie les communications entre l'ovocyte et les cellules folliculaires au moment du stade final de maturation, c'est à dire au moment de la migration de la vésicule germinale. Kagawa (8) s'intéresse à l'évolution du follicule lors de la maturation et de l'ovulation mais pour une maturation induite par injection de gonadotropine. Andreucetti, (15) mesure les follicules et l'espace entre les cellules folliculaire et l'oocyte. Sur des follicules de 50  $\mu\text{m}$  il observe des desmosomes like-junctions. Sur des follicules de 150  $\mu\text{m}$  il observe des ponts intercellulaires.

Dans cette première approche, nous nous sommes d'abord limités à reconnaître les structures impliquées :

- les ovocytes et microvillosités qui nous sont apparues plus ou moins nombreuses, courtes ou longues, plus ou moins orientées, suivant les stades de maturation de l'ovocyte.

- les deux couches de la zona radiata, la couche interne qui jouxte l'ovocyte et la couche externe directement accolée à la pre-

mière. Ces deux couches apparaissent très distinctes à l'observation, la couche externe étant, du fait de sa structure réticulée, très dense aux électrons.

- l'épithélium folliculaire comprenant les cellules folliculaires, larges cellules au gros noyau très chromophile, plus ou moins diffus ou arrondi suivant la maturation de l'ovocyte, au cytoplasme peu important, bourré de mitochondries et de réticulum endoplasmique.

- la thèque avec ses cellules très allongées, fusiformes, au noyau relativement peu dense aux électrons. Dans le cytoplasme nous avons aussi observé quelques mitochondries aux crêtes tubulaires.

L'importance du rôle du follicule ovarien, particulièrement des cellules folliculaires et des cellules de la thèque, dans la production de stéroïdes, régulant la vitellogénèse et la maturation des ovocytes, nous incitent à approfondir ces premières observations, à quantifier les évolutions au cours des stades des diverses structures et effectuer des marquages immunocytochimiques pour localiser aussi exactement que possible la zone de production des stéroïdes.



## BIBLIOGRAPHIE

1. STAHL A., & LERAY C. L'ovogénèse chez les Poissons Téléostéens. I. Origine et signification de la zona radiata et de ses annexes. Arch. Anat. Micr. Morphol. Exper., 1961, 50, 251-268.
2. FLÜGEL H. Electron microscopic investigations on the fine structure of the follicular cells and the zona radiata of trout oocytes during and after ovulation. Naturwissenschaften, 1964, 51, 564-565.
3. FLÜGEL, H. Licht und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Oozyten und Eiern einiger Knochenfische. Z. Zellforsch. Mikr. Anat., 1967, 83, 82-116.
4. BUISSON-MABILLOT S. Evolution des enveloppes de l'ovocyte et de l'œuf chez un Poisson Téléostéen. J. Microsc., 1973, 18, 23-44.
5. CAPORICCIO B. & CONNES R. Etude ultrastructurale des enveloppes périovocytaires et périovulaires de *Dicentrarchus labrax* L. (Poisson Téléostéen). Ann. Sci. Naturelles, Zool., 1977, 12, 19, 351-368.
6. KOBAYASHI W. Communications of oocyte-granulosa cells in the Chum salmon ovary detected by transmission electron microscopy. Develop. Growth and Differ., 1985, 27 (5), 553-561.
7. WALLACE A & SELMAN K. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in Fish and Amphibians. Journal of Electron Microscopy Technique, 1990, 16, 175-201
8. KAGAWA H. Ultrastructural observations on the ovarians follicles of the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) during oocyte maturation and ovulation. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture., 1991, 19, 1-10.
9. YORK W.S., PATINO R, THOMAS P. Ultrastructural changes in follicle cell-oocyte associations during development and maturation of the Atlantic Croaker. General and Comparative Endocrinology, 1993, 92, 402-418.
10. GOUBIER V., MARTIN M., KOKKIDIS M.J., EXBRAYAT J-M. Observations on ovary maturation of reared black-bass (*Micropterus salmoides* L.). An histological description of the annual reproductive cycle. Pol. Arch. Hydrobiol., 1997, 44, 159-169.
11. MARTIN M., GOUBIER V., KOKKIDIS M.J., EXBRAYAT J. M. Comparative evolution of the ovary maturation of black-bass (*Micropterus salmoides*) according to the water temperature. Pol. Arch. Hydrobiol., 1997, 44, 129-138.
12. MARTIN M., GOUBIER V., EXBRAYAT J-M. Oocyte degenerative process of female black-bass (*Micropterus salmoides*) prevented to spawn. Pol. Arch. Hydrobiol., 1998, 45, 545-552.

13. MARTIN M., GOUBIER V., EXBRAYAT, J-M., KAMVIRA S. Effect of environmental factors on oocyte maturation and spawning delay or inhibition, in black-bass (*Micropterus salmoides* L) : Synthesis of two years experiments. Pol. Arch. Hydrobiol., 1999, 46, 63-70.
14. POTTU-BOUMENDIL J. Microscopie électronique. Principes et Méthodes de préparation. Coll. Techniques en....., Ed. INSERM, 1989, 221 p.
15. ANDREUCETTI P., IODICE M., PRISCO M., GUALTIERI R. Intercellular bridges between granulosa cells and the oocyte in the Elasmobranch *Raya asterias*. The Anatomical Record, 1999, 255, 180-187.

# OBSERVATION DIRECTE DE LA TOPOLOGIE DES LÉSIONS VASCULAIRES RÉNALES CHEZ LE RAT HYPERTENDU

Daniel CASELLAS, Annie ARTUSO

*Groupe Rein et Hypertension - Institut Universitaire de Recherche Clinique - Montpellier*

*Correspondance : Daniel CASELLAS - Chargé de Recherche INSERM  
Groupe Rein et Hypertension - Institut Universitaire de Recherche Clinique  
641 Avenue du Doyen Giraud - 34093 Montpellier Cédex 5 - Tél: 04 67 41 59 27  
Fax: 04 67 54 27 31 - E-mail: casellas@iurc1.iurc.montp.inserm.fr*

## INTRODUCTION

L'ensemble des artères et artérioles rénales préglomérulaires réajustent leurs calibres et donc leurs résistances en sens inverse des fluctuations spontanées de la pression artérielle. Cette réactivité pression-dépendante définit le phénomène d'autorégulation rénale qui maintient le débit sanguin rénal et la pression artérielle intraglomérulaire relativement constants (1). Dans l'hypertension artérielle, toute altération de l'efficacité de l'autorégulation peut aboutir à la transmission de l'hypertension jusqu'aux capillaires glomérulaires. Un tel barotraumatisme peut conduire à la glomérulosclérose (2). Dans les modèles expérimentaux d'hypertension artérielle chez le rat, il est donc important de pouvoir évaluer le degré d'altération structurale des vaisseaux préglomérulaires et la topologie segmentaire des lésions, car elles signent une probable altération de la réactivité vasculaire et donc de l'autorégulation rénale. Les méthodes histologiques, certes

adaptées à l'évaluation des altérations structurales glomérulaires et tubulaires, ne donnent accès qu'à des profils ou à des segments vasculaires de longueurs limitées, rendant difficile l'établissement précis de la topologie et de la fréquence des lésions vasculaires.

L'objectif de cet article est de présenter et d'illustrer une technique récemment développée au laboratoire, complémentaire de l'histologie, et permettant l'observation microscopique directe des lésions vasculaires préglomérulaires associées à l'hypertension artérielle du rat. Elle découle d'une série d'études ayant montré que les lésions vasculaires préglomérulaires sont le siège de phénomènes inflammato-prolifératifs et se caractérisent par l'accumulation de lipides soudanophiles (3-6).

Notre technique s'effectue en deux temps: 1/ Isolement des lits vasculaires rénaux par microdissection (7), 2/ marquage des lipides vasculaires à l'aide de noir Soudan.



## MATERIEL ET METHODES

L'étude a été faite sur des rats mâles adultes de souche Sprague-Dawley (Iffa-Crédo, Lyon) ayant été soumis, sous anesthésie (pentobarbital sodique, 50 mg / kg i.p.), à une uninephrectomie droite, et à la pose d'une minipompe osmotique (Alzet modèle 2002) sous la peau du dos permettant de délivrer 400 ng / kg.min d'angiotensine II (Sigma) dans l'espace interstitiel pendant 10 jours. A la fin du traitement, les animaux ont une pression artérielle (mesurée par sphygmomanométrie)  $\geq$  à 200 mmHg, et une albuminurie élevée. Sous anesthésie, les reins sont prélevés après section du pédicule vasculaire et décapsulés. Chaque rein est sectionné longitudinalement en deux moitiés. La technique d'isolement et de marquage au noir Soudan a été détaillée dans des publications précédentes (3, 7). Elle comporte les étapes suivantes :

**1/ Isolement des arbres vasculaires préglomérulaires :** Les reins sont immergés dans une solution de HCl / H<sub>2</sub>O (6 N) et placés au bain-marie (37-40° C, 1.5 - 2 hr), rincés abondamment et macérés à l'eau distillée (4° C, 24-72 hr). Ce traitement ramollit suffisamment la matrice extracellulaire pour permettre, sous loupe binoculaire, d'isoler les vaisseaux des tubules rénaux à l'aide d'aiguilles montées. La presque totalité de l'arbre artériel peut souvent être obtenue et comprend, les artères arquées, leurs branches latérales, les artères interlobulaires et les artérioles afférentes. Les glomérules et vaisseaux post-glomérulaires restent généralement attachés aux tubules. Pour leur conservation, les vaisseaux sont fixés à la formaline tamponnée à 10% (Accustain, Sigma).

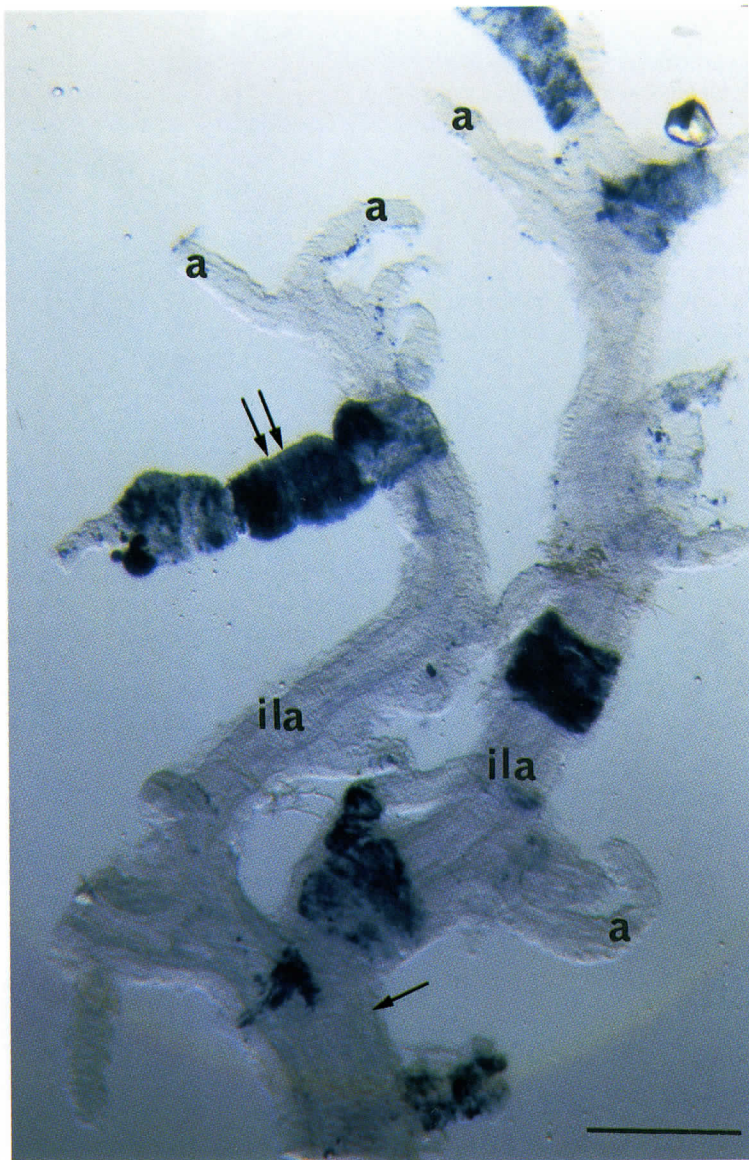
**2/ Marquage au noir Soudan :** Des portions d'arbre vasculaire sont échantillonnées, comprenant jusqu'à une artère

arquée complète. L'ensemble des opérations de marquage est effectué à l'aide de lames de verre épaisses pourvues d'un puits circulaire (1 x 0.8 cm). Les échantillons sont exposés à des solutions croissantes d'éthanol (30-70%) puis exposés (10 min) à une solution saturée de noir Soudan (Sudan black B, Sigma) dans l'éthanol absolu, filtrée à 0.45  $\mu$ m. La coloration est ensuite différenciée dans l'éthanol absolu et les échantillons sont ramenés à l'eau distillée via des solutions décroissantes d'éthanol.

**3/ Montage et observation :** Les arbres vasculaires sont observés rapidement après leur marquage car le noir Soudan diffuse progressivement dans toutes les membranes cellulaires. Les échantillons peuvent être observés directement à la loupe binoculaire. Pour l'observation microscopique (objectifs 10x et 25x), ils sont montés dans une goutte d'eau entre lame et lamelle, ou au glycergel (Dako).

## RESULTATS

Comme illustré par la vue générale de la figure 1, la méthode présentée permet la visualisation directe des lésions vasculaires par l'accumulation de lipides soudanophiles. Le caractère focal des lésions est immédiatement apparent, et rend compte de la difficulté de leur observation par l'histologie. Dans ce modèle d'hypertension, les lésions sont situées majoritairement le long des artères interlobulaires et des artérioles afférentes (figure 1). De tels échantillons autorisent donc l'étude précise de la distribution segmentaire des lésions vasculaires. Un plus fort grossissement (figure 2), révèle le détail de l'altération d'une artériole afférente associée à une lésion soudanophile et marquée par l'hypertrophie et l'hyalinose des cellules musculaires lisses.



**Figure 1 :** Vue générale d'une portion d'arbre vasculaire rénal d'un animal hypertendu après dissection et marquage au noir Soudan. L'échantillon comprend l'extrémité d'une branche d'artère arquée (flèche), deux artères interlobulaires (ila) et des artérioles afférentes (a). L'accumulation focale de noir Soudan délimite les zones lésionnelles. Noter une grande accumulation lipidique le long d'une artériole afférente (double flèche). Barre 100  $\mu$ m.





**Fig 2: Rat hypertendu.** Cet échantillon comprend 5 artérioles afférentes (a), dont une est lésée sur toute sa longueur (flèche), branchées sur la même artère interlobulaire (ila). Par comparaison, noter l'hypertrophie et l'hyalinose des cellules musculaires lisses associées à la lésion. Barre 25  $\mu$ m.



## DISCUSSION

Le caractère soudanophile des lésions vasculaires rénales du rat a été mis à profit pour visualiser leur distribution segmentaire le long de lits vasculaires isolés après macération acide. Une série d'études a montré l'existence de telles lésions dans divers modèles d'hypertension chez le rat (3, 8). Chez le rat spontanément hypertendu de souche japonaise (6) ou lyonnaise (5), ces lésions ne se développent pas de manière spontanée mais peuvent être induites par inhibition de la génération de monoxyde d'azote (5, 6). D'excellentes corrélations ont été obtenues entre la fréquence des lésions, déterminée par la présente technique, et des index histologiques d'altération glomérulaire et tubulaire (6), ou un index global d'altération rénale, l'albuminurie (6). Par ailleurs, les traitements antihypertenseurs (inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine II) préviennent ou réversent l'albuminurie ainsi que le développement lésionnel (6, 9) renforçant le concept d'un lien fonctionnel entre pathologie vasculaire et pathologie rénale.

En conclusion, la technique présentée permet de manière simple de visualiser la topologie et l'extension des lésions vasculaires préglomérulaires chez le rat. Elle peut être étendue à d'autres espèces comme la souris ou le lapin, ou pratiquée sur des biopsies ou des fragments de biopsies d'origine humaine. Cette approche est particulièrement utile en expérimentation animale pour la détection précoce d'altérations vasculaires lorsque ces dernières ont une fréquence faible, 'invisible' à l'histologie. Les arbres vasculaires isolés par macération acide peuvent être également étudiés par immunohistochimie pour visualiser, par exemple, les cellules à rénine (7), la prolifération cellulaire (3), les fibres adrénérergiques (10), ou la distribution des canaux calciques (11). Enfin, notons que l'absence de lésions anatomiques ne peut être considérée comme la preuve d'absence d'altération(s) fonctionnelle(s). L'étude directe de la réactivité microvasculaire rénale s'avère alors nécessaire (12).

## BIBLIOGRAPHIE

1. CARMINES P.K., CASELLAS D., & NAVAR L.G. Control of renal hemodynamics by intrarenal mechanisms. *Contr. Nephrol.*, 1984, 41: 1-9.
2. BIDANI A.K., SCHWARTZ M.M., & LEWIS E.J. Renal autoregulation and vulnerability to hypertensive injury in remnant kidney. *Am. J. Physiol.*, 1987, 252: F1003-F1010.
3. BOURIQUET N., DUPONT M., HERIZI A., MIMRAN A., & CASELLAS D. Preglomerular sudanophilia in L-NAME hypertensive rats. Involvement of endothelin. *Hypertension*, 1996, 27: 382-391.
4. CASELLAS D., BOURIQUET N., & HERIZI A. Bosentan prevents preglomerular alterations during angiotensin II hypertension. *Hypertension* 1997, 30: 1613-1620.
5. CASELLAS D., BOURIQUET N., & ARTUSO A. Nitric oxide and preglomerular vascular lesions in Lyon spontaneously hypertensive rats. *Acta. Physiol. Scand.*, 2000, 168: 133-138.
6. CASELLAS D., HERIZI A., ARTUSO A., MIMRAN A., & JOVER B. Candesartan prevents L-NAME-induced cardio-renal injury in spontaneously hypertensive rats beyond hypotensive effects. *J. R. A. A. S.*, 2001, 2 (suppl 1): 584-590.
7. CASELLAS D., DUPONT M., KASKEL F.J., INAGAMI T., MOORE L.C. Direct visualization of renin-cell distribution in preglomerular vascular trees dissected from rat kidney. *Am. J. Physiol.*, 1993, 265: F151-F156.
8. BOURIQUET N., YOUNUS A., CASELLAS D., MOORE L.C., & KASKEL F.J. IGF-I therapy in growing rats with progressive chronic renal failure: role of blood pressure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1998, 9: 46P (abstract).
9. CASELLAS D., BENAHMED S., ARTUSO A., & JOVER B. Candesartan and progression of preglomerular lesions in nitro-L-arginine methyl ester hypertensive rats. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 1999, 10: S230-S233.
10. CASELLAS D., BOURIQUET N., ARTUSO A., WALCOTT B., & MOORE L.C. New method for imaging innervation of the renal preglomerular vasculature. *Alterations in hypertensive rats. Microcirculation*, 2000, 7: 429-437.
11. HANSEN P.B., JENSEN B.L., ANDREASEN D., & SKOTT Ø. Differential expression of T- and L-type voltage-dependent calcium channels in renal resistance vessels. *Circ. Res.*, 2001, 89: 630-638.
12. CASELLAS D., & CARMINES P.K. Control of the renal microcirculation: Cellular and integrative perspectives. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 1996, 5: 57-63.

# APPLICATIONS DU LASER SCANNING CYTOFLUORIMÈTRE (LSC) EN TOXICO-PATHOLOGIE

B. GREINER et D. ROMAN

*Novartis Pharma AG*

*MUT-2881-237*

*Auhafenstrasse - CH-4132 Muttenz*

*SUISSE*

## 1. Le Laser Scanning Cytofluorimètre (LSC®)

Le LSC (figure 1) de la société Compu-Cyte Corporation (Cambridge, Mass) est un système avancé permettant l'obtention de renseignements équivalents à ceux obtenus en cytométrie de flux, mais ayant l'avantage d'être basé sur la microscopie.

Le LSC mesure différentes fluorescences et enregistre les coordonnées de chaque cellule. Les cellules intéressantes peuvent être confirmées visuellement, recolorées par d'autres marqueurs, remesurées et photographiées.

## 2. Applications en toxicologie / pathologie

L'indice de prolifération, d'apoptose, l'étude du cycle cellulaire ainsi que l'immunophénotypage des cellules sont souvent des paramètres utilisés pour l'estimation de la toxicité et/ou de l'efficacité d'une substance pharmaceutique.

Le LSC a été utilisé dans notre laboratoire pour l'évaluation de ces paramètres sur des lames cytologiques et histologiques (1).

Les résultats obtenus ont permis de confirmer ou d'affiner ceux obtenus lors de l'examen histo-pathologique et d'aider à expliquer le mécanisme et l'action de certaines substances testées. (6)

## 3. Matériel et méthodes

### 3.1 Cycle cellulaire :

Une suspension de cellules épidermales est obtenue grâce à une digestion enzymatique thermolysine-trypsine. Les cellules isolées sont fixées dans du méthanol froid et conservées à -20°C (2).

Afin d'effectuer le marquage, les cellules fixées sont lavées dans du tampon phosphate (PBS), resuspendues à une concentration d'environ 1.5 millions de cellules par ml puis centrifugées sur lame (50 µl par lame) à l'aide de la cytocentrifugeuse de Shandon.



Les lames sont ensuite incubées avec une solution d'iodure de propidium (PI, 50 µg/ml, RNase 10 µg/ml, 0.1% de Triton X-100 dans du PBS) pendant 30 minutes à l'abri de la lumière (figure 2) (3).

### **3.2 Apoptose :**

Pour l'évaluation de l'apoptose la détection immunohistochimique du Bax (Alexis) et du Bcl-2 (Calbiochem) a été prise en compte. Le marquage a été effectué d'une part sur des cellules épidermales qui ont été isolées et fixées selon la procédure décrite ci-dessus et d'autre part sur des coupes paraffines.

#### **\* Cellules isolées :**

Les cellules fixées sont lavées dans du PBS puis incubées avec une solution de Triton X-100 à 0.1% dans du PBS pendant 10 minutes.

Après centrifugation les cellules sont incubées avec les anticorps anti-BAX de lapin (1:250) et anti Bcl2 de souris (1:100) dilués dans un tampon salin TRIS additionné de 0.1% de BSA et 0,005% de Tween 20 pendant une heure à température ambiante.

Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS et incubées avec un anti-souris Alexa 488 (1:200, Molecular Probe) et un anti-lapin Alexa 633 (1:200 Molecular Probe) dilués dans le même tampon d'incubation que les anticorps primaires durant 30 minutes à température ambiante.

Après lavage au PBS la coloration des noyaux est faite au PI (10 µg/ml PI, RNase 10 µg/ml, dans du PBS contenant 0.1% de Triton X-100).

Les cellules sont centrifugées sur lame et montées au GelMount (Biomed) (figure 3).

#### **\* Coupes paraffines :**

Immunohistochimie Bax et Bcl-2 sur coupes paraffines pour localiser les cellules exprimant ces marqueurs d'apoptose (4).

Les coupes déparaffinées sont traitées au micro-onde dans un tampon citrate à pH 6 pendant 15 minutes à 98°C. Lorsque les lames ont atteint la température ambiante elles sont incubées dans une solution de caséine pendant 10 minutes afin de bloquer le marquage non spécifique.

Les lames sont ensuite incubées avec un anti-BAX de lapin (1:250) et un anti-Bcl2 de souris (1:100) dilués dans un tampon salin de TRIS additionné de 0.1% de BSA et 0,005% de Tween 20, durant la nuit à 4°C.

Les coupes sont ensuite lavées avec du PBS et incubées avec un anti-souris Alexa 488 (1:200 Molecular Probe) et un anti-lapin Alexa 633 (1:200 Molecular Probe) dilués dans le même tampon d'incubation que les anticorps primaires durant 30 minutes à température ambiante.

Après lavage au PBS la coloration des noyaux est faite au PI (2 µg/ml PI, RNase 10µg/ml, dans du PBS contenant 0.1% de Triton X-100).

Une concentration plus faible de propidium est en généralement utilisé pour les coupes paraffines, la pénétration étant plus aisée que sur des cellules épidermales entières.

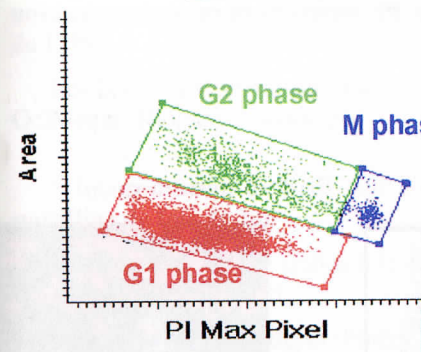
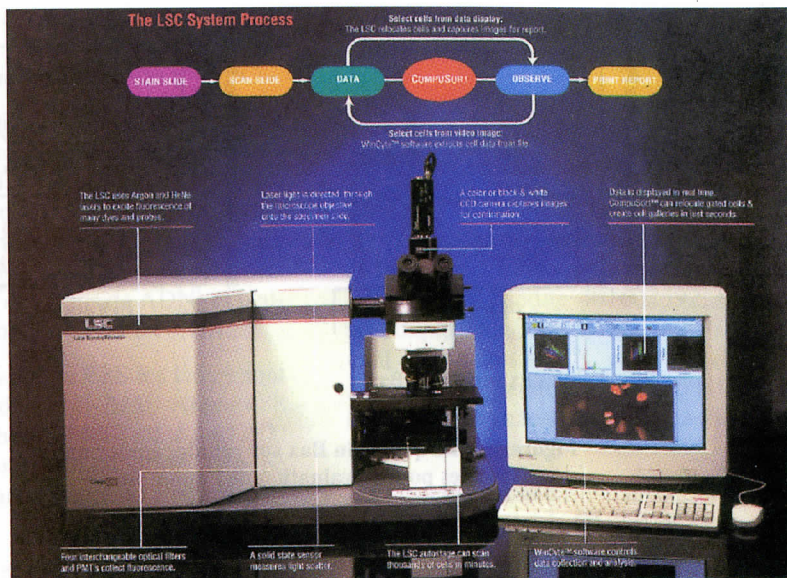
Les lames sont ensuite montées au Gel-Mount (Biomed) (figure 4).

### **3.3 Prolifération :**

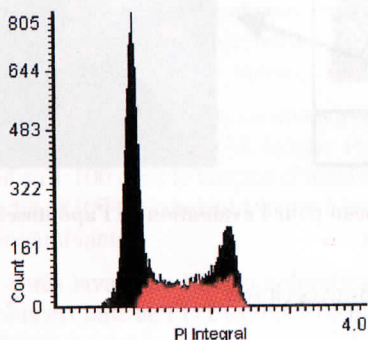
#### **\* Incorporation in situ de BrdU (Chamber slides, Labtek)**

Les cellules sont cultivées dans des chambre slides et traitées au BrdU pendant 90 minutes. Le milieu de culture est enlevé

**Figure 1 :**  
**Le LSC.**

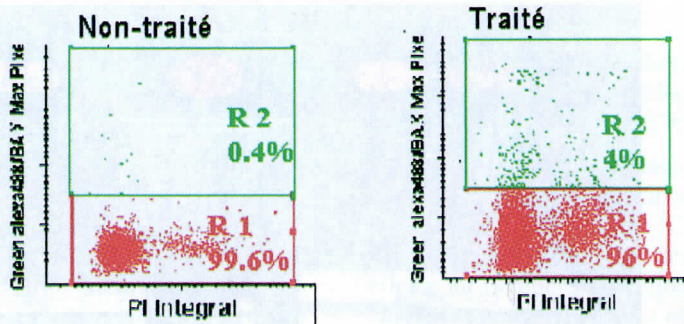


Dot plot permettant de détecter les différentes phases du cycle cellulaire.



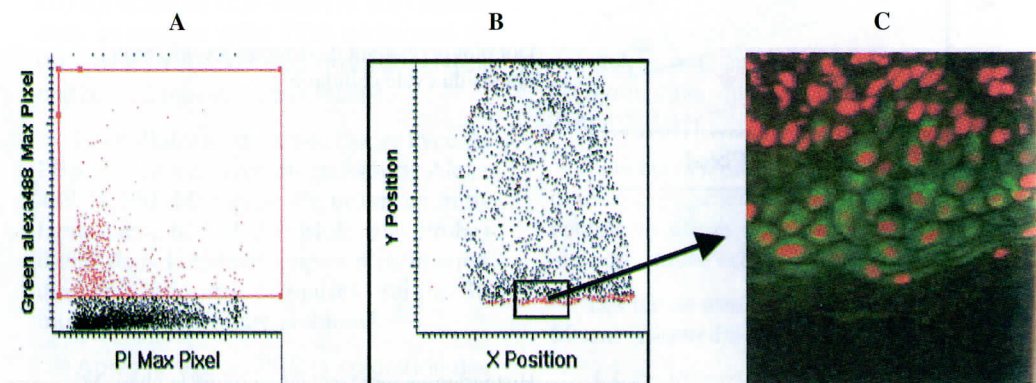
Histogramme représentant en rouge la phase M.

**Figure 2 : Marquage du cycle cellulaire à l'iodure de propidium.**



R2 : cellules exprimant le Bax

**Figure 3 : Marquage du Bax sur cellules épidermales isolées pour l'évaluation de l'apoptose.**



**Figure 4 : Marquage du Bcl-2 sur coupe paraffine de peau pour l'évaluation de l'apoptose.**

A : Les cellules Bcl-2 positives sont représentées en rouge.

B : Localisation des cellules exprimant le Bcl-2.

C : Les noyaux sont colorés en rouge, les cellules Bcl-2 positives en vert.



et les lames sont mises à sécher à température ambiante. Elles sont ensuite cellées dans un plastique et conservées à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Pour le marquage les lames doivent tout d'abord atteindre la température ambiante tout en restant dans le plastique de protection. Elles sont ensuite fixées dans de l'éthanol 80% pendant 10 minutes, puis traitées avec de l'HCl 4M pendant 20 minutes (permet l'ouverture des brins de ADN) et neutralisées dans un bain de borax 0,1M.

Après un lavage au PBS les lames sont incubées avec de l'anti-BrdU Alexa 488 (Molecular Probe A 21303) dilué au 1:100 dans le tampon d'incubation (Roche 1810740) pendant 1 heure 30 à température ambiante.

Après lavage au PBS la coloration des noyaux est faite au PI ( $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  PI, dans du PBS).

Les lames sont finalement montées au GelMount (Biomed) (figure 5).

#### **\* Incorporation de BrdU sur coupe paraffine de foie de rat**

Les animaux ont été traités à la BrdU 2 heures avant le sacrifice.

Les coupes de foie déparaffinées sont traitées avec de l'HCl 4M pendant 20 minutes à température ambiante puis neutralisées dans un bain de borax 0,1M et lavées au PBS pendant 5 minutes.

Les lames sont ensuite incubées avec de l'anti-BrdU Alexa 488 (Molecular Probe) dilué au 1:100 dans le tampon d'incubation (Roche 1810740) pendant 1 heure à température ambiante.

Après lavage au PBS la coloration des noyaux est faite au PI ( $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  PI dans du PBS).

Les lames sont ensuite montées au GelMount (Biomed) (figure 6).

#### **\* Immunohistochimie sur coupes paraffines de tumeur pour quantifier le nombre de cellules exprimant le Ki-67**

Les coupes déparaffinées sont traitées au micro-onde dans un tampon démasquant (ProTaq IV Medite 401602392, tampon spécifique pour démasquage du Ki67), pendant 20 minutes à  $98^{\circ}\text{C}$  et lorsqu'elles ont atteint la température ambiante elles sont bloquées dans une solution de caséine pendant 10 minutes.

Les lames sont ensuite incubées avec un anti-Ki-67 de souris (Dako) dilué au 1:75 dans un tampon TRIS additionné de 0.1% de BSA et 0,005 % de Tween 20 pour la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Les coupes sont lavées au tampon TRIS et incubées avec un anti-souris Alexa 488 (Molecular Probe) dilué au 1:200 dans du tampon TRIS additionné de 0.1% de BSA durant 30 minutes à température ambiante.

Après lavage au TRIS la coloration des noyaux est faite au PI ( $2\text{ }\mu\text{g/ml}$  PI, RNase  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ , dans du PBS contenant 0.1% de Triton X-100) (figure 7).

Les lames sont ensuite montées au GelMount (Biomed).

#### **3.4 Immunophénotypage:**

Après lyse des globules rouges (Dako Utilyse) les leucocytes sont centrifugés sur lames (Cytospin de Shandon). Les lames sont ensuite séchées à l'air et conservées sous plastique jusqu'au marquage à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Avant le marquage les lames sont fixées à l'acétone pendant 10 minutes.

### *Anticorps utilisés :*

\* Monoclonaux de souris dirigés contre le rat (Serotec).

CD3 FITC, dilution 1:50 ( tampon d'incubation à pH 6), durant la nuit à 4°C.

CD4 FITC dilution 1:50 et CD8 biotin dilution 1:80 en mélange (tampon d'incubation à pH 6) durant la nuit à 4°C.

CD45RA biotin dilution 1:50 (tampon d'incubation à pH 7.5) durant la nuit à 4°C.

\* Deuxième anticorps (Molecular Probe) :

Anti-FITC Alexa 488 (1:200; excitation laser Argon) pour la détection du marqueur de surface CD3.

Streptavidin Alexa 633 (1:150; excitation laser HeNe) pour la détection du marqueur de surface CD45RA, marqueur des cellules B.

Le mélange des 2 anticorps est utilisé pour la détection des 2 marqueurs de surface CD4 et CD8

L'incubation est faite dans du tampon TRIS additionné de 0,1% de BSA pendant 30 minutes à température ambiante.

\* La coloration des noyaux est faite au PI (2 µg/ml dans du tampon phosphate) pendant 15 minutes et les lames sont ensuite montées au GelMount (figure 8) (5).

Les résultats sont comparables à ceux obtenus par la cytométrie de flux.

### **4. Paramètres de mesure :**

La fluorescence émise par les cellules marquées est mesurée par le LSC et analysée à l'aide du programme WinCyt 3.4.

Le laser Argon est utilisé à 488 nm et le HeNe à 633 nm.

L'acquisition est faite sur plus de 5000 cellules par lame de cytologie et sur l'ensemble du tissu pour une coupe d'histologie.

Le paramètre de contour est effectué sur les noyaux à l'aide de la fluorescence du PI (laser Argon).

Pour chaque contour cellulaire, les intensités de fluorescence verte, rouge et orange sont automatiquement analysées et permettent le calcul des propriétés suivantes :

- Intégrale : somme de toutes les valeurs à l'intérieur du contour.

- Max pixel : valeur maximale de chaque fluorescence.

- Surface et position du contour.

### **5. LSC, un outil très performant dans différents domaines :**

Evaluation du cycle cellulaire et des paramètres de l'apoptose dans des biopsies de peau lors du développement de produits dermatologiques.

Etudes de prolifération lors du développement précoce de produits oncologiques.

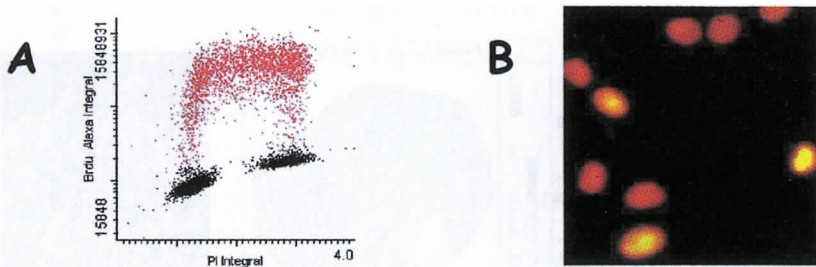
Immunophénotypage chez le rat, 2 paramètres (CD4/CD8) pour 25 µl de sang.

### **6. Avantages du LSC :**

Mesures et analyses sur lames cytologiques et histologiques.

Rapidité et objectivité en comparaison de l'évaluation l'immuno-histopathologique traditionnelle.

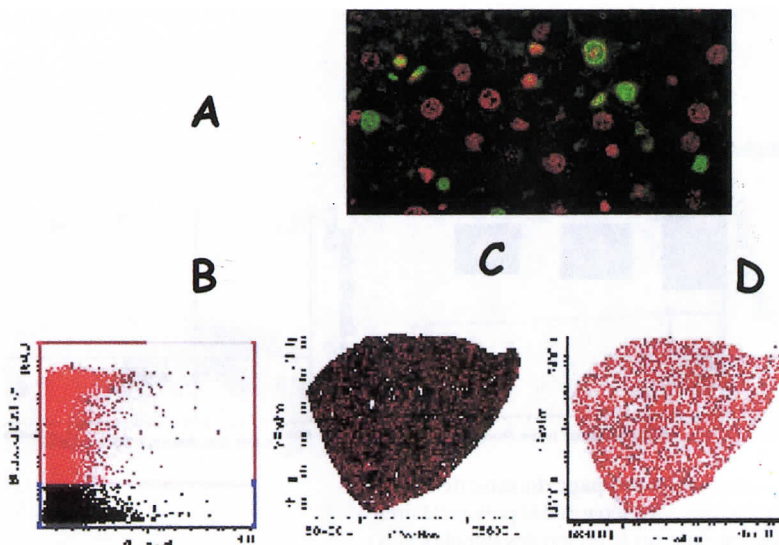
Combinaison des mesures et de l'image visuelle de la cellule analysée.



**Figure 5 : Marquage du BrdU sur cellules cultivées en chamber slides pour l'étude de la prolifération.**

A : Les cellules ayant incorporées la BrdU sont représentées en rouge.

B : Les noyaux sont colorés en rouge, les cellules ayant incorporées la BrdU en vert/jaune.



**Figure 6 : Marquage du BrdU sur coupe paraffine de foie de rat pour l'étude de la prolifération.**

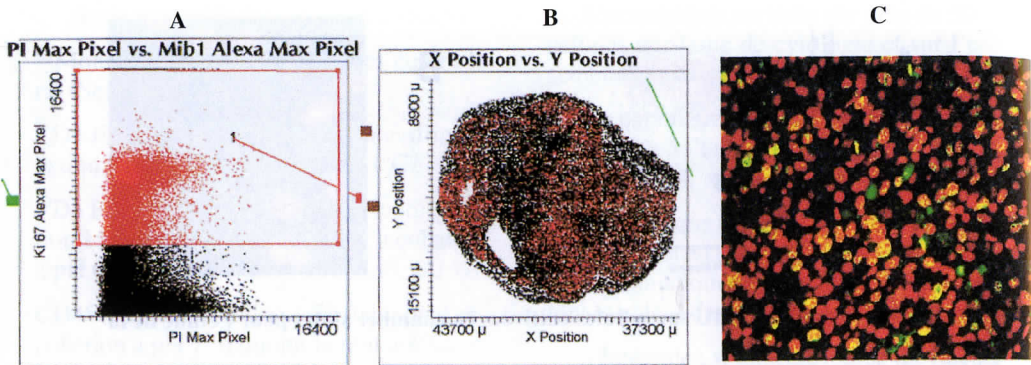
A : Les noyaux sont colorés en rouge, les cellules ayant incorporées la BrdU en vert.

B : Les cellules ayant incorporées la BrdU sont représentées en rouge.

C : Les cellules ayant incorporées la BrdU en rouge, les autres en noir.

D : Distribution des cellules ayant incorporées la BrdU.



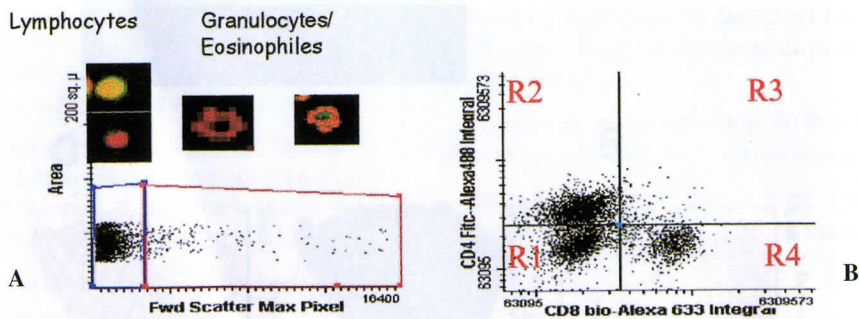


**Figure 7 : Marquage du Ki-67 sur coupe paraffine de tumeur pour l'étude de la prolifération.**  
**Les souris ont été transplantées avec des cellules de carcinome humain**

A : Les cellules Ki-67 positives sont colorées en rouge.

B : Localisation dans la tumeur des cellules exprimant le Ki-67 en rouge.

C : Les noyaux sont colorés en rouge, les cellules Ki-67 positives en vert/jaune.



**Figure 8 : Immunophénotypage du sang de rat**

A : Les lymphocytes sont séparés des polynucléaires.

L'analyse est faite sur la région des lymphocytes.

B : Dot plot permettant de séparer :

- R1 cellules négatives au CD4 et au CD8.
- R2 cellules positives au CD4 et négatives au CD8.
- R3 cellules positives au CD4 et CD8.
- R4 cellules négatives au CD4 et positives au CD8.

## BIBLIOGRAPHIE

1. DARZYNKIEWICZ Z. BEDNER E. (1999) Laser Scanning Cytometry: A new Instrumentation with many applications. *Exp Cell Research* 249, 1-12.
2. GLADE CP, SEEGER B, BAMP, MEULEN EFJ, VAN HOOIJDONK CAEM, VAN ERP PEJ AND VAN DE KERKHOF PCM (1996). *Arch Dermatol Res* 288: 203-210.
3. LUTHER ED AND L. KAMENTSKY (1996). Resolution of mitotic cells using laser scanning cytometry. *Cytometry* 23:272-278.
4. BEDNER E., LI X. GORCZYCA W., MELAMED M.R. AND DARZYNKIEWICZ Z. (1999) Analysis of Apoptosis by Laser Scanning Cytometry. *Cytometry* 35 :181-195.
5. CLATCH R.J., FOREMAN J.R. AND WALLOCH J.L. (1998) Simplified Immunophenotypic Analysis by Laser Scanning Cytometry. *Cytometry* 34 :3-16.
6. ROMAN D, DEBRUGEROLLE-DE FRAISINETTE A, GREINER B, BOBADILLA M. (2000) Application of laser scanning cytometry (LSC) in toxicological testing. *Cytometry suppl.* 10 :96.

# ETUDE HISTOLOGIQUE DE LA STRUCTURE DES MUSCLES DE BOVINS EN RELATION AVEC LA QUALITE DES VIANDES. APPROCHE PAR TRAITEMENT D'IMAGES

R. LABAS, L. MAUNIER, L. CHANIER, H. COLLIGNON, R. TAYLOR

*Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)  
Station de Recherches sur la Viande  
THEIX 63122 Saint Genès Champanelle*

## INTRODUCTION

Le muscle squelettique est une structure composite formée de fibres contractiles (myofibres), maintenues par un réseau de tissu conjonctif. Au sein de ce réseau, le pérmysium délimite les faisceaux de myofibres, l'endomysium entoure chaque fibre musculaire.

Lors de la conservation réfrigérée des viandes après abattage, intervient une phase de maturation : des enzymes protéolytiques participent à la dégradation des fibres contractiles assurant l'attendrissement des viandes (1). La tendreté finale des viandes dépend donc de deux composantes : myofibrillaires (principalement la taille des fibres) et conjonctives (2).

Le but de nos études est de caractériser, par des méthodes histologiques, les composantes structurelles des viandes en relation avec les types de muscles, les races et les traitements technologiques appliqués et de corréler ces observations à des études bio-

chimiques ou des mesures physiques. Une des limites dans la caractérisation des changements de structure a été le manque de mesures précises et de quantification des structures. Dans ce but, nous avons développé plusieurs algorithmes de traitement d'images, pour caractériser la structure des muscles et les changements post-mortem.

Un certain nombre d'études ont déjà utilisé le traitement d'images sur coupes histologiques de muscles squelettiques. La plus grande part de ces recherches porte sur la composante myofibrillaire : étude du type métabolique et taille de fibres chez l'homme (3), chez les volailles (4), les porcs (5), les ovins (6) et les bovins (7). En revanche, peu nombreuses sont les recherches menées par analyse d'images sur le tissu conjonctif (8), l'espace extra-cellulaire (9) ou les lipides (10).

Nous présenterons ici des exemples d'applications permettant de caractériser, par traitement d'images sur coupes histologiques, la structure des muscles en relation avec la



qualité des viandes. Nous nous sommes intéressés à l'étude de la taille et de la forme des fibres en relation avec la vitesse de réfrigération, à l'espace extra-cellulaire mais aussi à l'organisation de la trame conjonctive (surface et longueur du réseau).

## MATERIELS ET METHODES

**Préparations des échantillons :** les cubes de muscles (0,5 cm de côté) prélevés entre 1h et 24h *post-mortem* sont collés sur un morceau de liège avec du milieu d'encubage Tissue-Tek (OCT compound). Ils sont congelés en les immergeant pendant 30 secondes dans un bain d'iso pentane refroidi à l'azote liquide. Ils sont conservés ensuite à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

**Réalisation des coupes histologiques et colorations :** Les coupes de  $10\text{ }\mu\text{m}$  sont réalisées perpendiculairement à l'axe des fibres à l'aide d'un cryostat à  $-20^{\circ}\text{C}$  (Reichert Jung Frigocut 2800 E).

La coloration hématoxyline éosine safran permet une caractérisation générale de la structure des muscles. Les coupes sont séchées 15 min, colorées à l'hématoxyline de Harris 5 min puis lavées à l'eau 2 fois 5 min, colorées à l'éosine aqueuse Y 0,5% (Sigma) 15 secondes, lavées à l'eau 2 fois 1 min, déshydratées dans l'éthanol  $80^{\circ}$  (2 min) éthanol  $95^{\circ}$  et  $100^{\circ}$  (5 min), puis colorées dans une solution de safran alcoolique 8 min (solution saturée de safran dans l'éthanol absolu).

Pour évaluer l'espace extracellulaire entre les fibres musculaires, les coupes sont montées directement en milieu aqueux (Mount Quick Aqueous, Bio-Optica, Italie), après l'étape de rinçage suivant la coloration à l'éosine. Nous réalisons alors directement l'acquisition d'images numériques, la coloration n'étant pas stable dans le temps.

La coloration azorubine permet l'étude des différents paramètres caractérisant la taille et la forme des fibres à 1h post mortem. Après séchage, les coupes sont fixées pendant 5 min dans un bain de formaldéhyde 15%  $\text{CaCl}_2$  18mM, puis rincées à l'eau distillée. Elles sont colorées pendant 45 min dans une solution d'azorubine 1%, acide molybdique 0,5%, acide acétique 1%, puis rincées 2 fois à l'eau. Elles sont déshydratées dans 3 bains de 2 min d'alcool à concentration croissante (éthanol  $80^{\circ}$ ,  $95^{\circ}$ ,  $100^{\circ}$ ), puis subissent 2 passages dans le méthyl-cyclohexane et sont montées à l'eukitt.

La coloration au rouge sirius (11, 12) permet de caractériser la trame conjonctive des muscles en relation avec la tendreté des viandes. Les coupes sont incubées pendant 60 min dans l'acétone, puis fixées 10 min dans une solution picro-formalin (aldéhyde formique 5%, éthanol 90%, acide picrique saturé). Cette étape est suivie par un rinçage à l'éthanol 90% 1 min puis un rinçage dans l'eau et par la coloration dans la solution rouge picro-sirius pendant 60 min (solution aqueuse rouge sirius 0,1%, acide picrique saturé). Les coupes sont ensuite placées dans un bain d'HCl 0,01M 5 min puis rincées dans l'eau distillée 1 min et déshydratées dans trois bains éthanol ( $95^{\circ}$ ,  $100^{\circ}$ ,  $100^{\circ}$ ). Suivent deux passages dans le méthylcyclohexane puis le montage réalisé avec l'eukitt.

**Méthodes immunohistologiques :** La caractérisation des composants spécifiques de la trame conjonctive est réalisée par immunohistologie. Dans un premier temps les anticorps dirigés contre l'élastine, la laminine et la décorine ont été testés. Les trois anticorps utilisés ont été produits chez la souris. L'anticorps anti-élastine provient de la Société SIGMA ref : E 4013 (monoclonal, clone BA-4). L'anticorps monoclonal

D18 contre la laminine a été produit par J.R. Sanes de "Developmental studies hybridoma bank" (USA). L'anti-décorine monoclonal a été gracieusement fournie par le Professeur B. Caterson, Université de Cardiff, Pays de Galles. La révélation de la réaction immuno-histologique est réalisée par un anticorps secondaire anti IgG de souris produit chez la chèvre. Cet anticorps secondaire est marqué par une sonde fluorescente TRITC (SIGMA T 5393) ou par une peroxydase (SIGMA A 5278).

Les coupes (10µm) réalisées au cryostat sont mises à sécher à température ambiante pendant 1 h. Aucune étape de fixation, de type para formaldéhyde à 4% dans du PBS couramment pratiquée, n'est mise en œuvre; les résultats obtenus sans cette étape étant satisfaisants. Les réactions immuno-histologiques ont été réalisées en chambre humide à température ambiante. Du sérum de chèvre 10% dans du PBS est déposé sur les coupes pendant 10 min afin de saturer les sites non spécifiques. Après aspiration de celui-ci, l'anticorps primaire à la dilution appropriée est déposé pendant 1 h. Les coupes sont rincées 3 x 2 min avec du PBS. Le second anticorps anti-souris marqué à la peroxydase ou au TRITC est ajouté et incubé pendant 1h. L'activité peroxydasique est révélée par addition du substrat diaminobenzidine à partir de tablettes prêtes à l'emploi (SIGMA FAST DAB D 4168). Après déshydratation dans des bains à concentration croissante d'éthanol puis 2 bains de méthylcyclohexane, les coupes sont montées dans de l'eukitt. Après rinçage au PBS, les coupes marquées avec la sonde fluorescente TRITC sont montées avec du milieu crystal/mount (Biomedica).

#### **Acquisition et traitement d'images :**

Après coloration, les lames sont placées sur un microscope Polyvar (Reichert) et les

images sont acquises à l'aide d'une caméra noir et blanc CCD JAI CV-M300 (figures 1, 2, 3). La numérisation est réalisée par l'intermédiaire d'un micro-ordinateur équipé d'une carte d'acquisition Matrox Meteor. Les images de grand champ (figure 4) sont acquises en plaçant les coupes sur un banc lumineux. Dans ce cas, l'acquisition se fait avec la même caméra montée sur un statif, équipées d'un objectif AF Micro NIKKOR 60mm 1:2.8 D. Les images noir et blanc des colorations azorubine, et rouge sirius (figures 1, 2, 3) destinées au traitement d'images sont acquises en utilisant un filtre vert, couleur complémentaire de la coloration de base rouge des composants à évaluer, afin d'augmenter le contraste et faciliter le traitement.

Le traitement d'images est réalisé avec le logiciel VISILOG 5.3 sous Windows de la Société NOESIS (France). Trois algorithmes de traitement ont été réalisés avec le concours des ingénieurs de développement de la Société Noesis. L'algorithme 1 : "espace extra-cellulaire", permet, par seuillage automatique sur les niveaux de gris de l'image, d'évaluer l'espace entre les fibres musculaires (figure 1). L'algorithme 2 : "taille de fibres", permet de calculer sur un champ donné le nombre, la surface et divers indices de taille et de forme des fibres musculaires au niveau de coupes transversales colorées par azorubine ou hématoxyline éosine safran (figure 2). L'algorithme 3 : "trame conjonctive", a été développé afin d'étudier l'organisation de la trame périmysiale. Après digitalisation de l'image, une étape de segmentation permet d'extraire le réseau et, par mesure de la surface, d'évaluer l'importance relative en % de l'image totale. Puis une étape de squelettisation renseigne sur la longueur du réseau (figure 3).



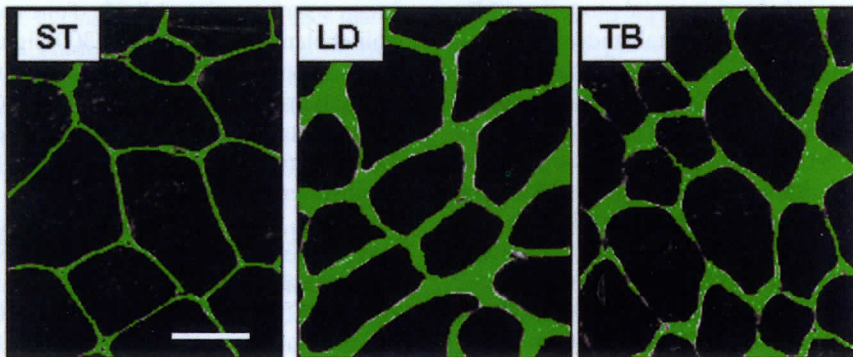


Figure 1 : Comparaison de l'espace extracellulaire (en vert) par méthode de seuillage entre différents muscles : ST (*Semi tendinosus*), LD (*Longissimus dorsi*), TB (*Triceps brachii*) (barre = 50 $\mu$ ).

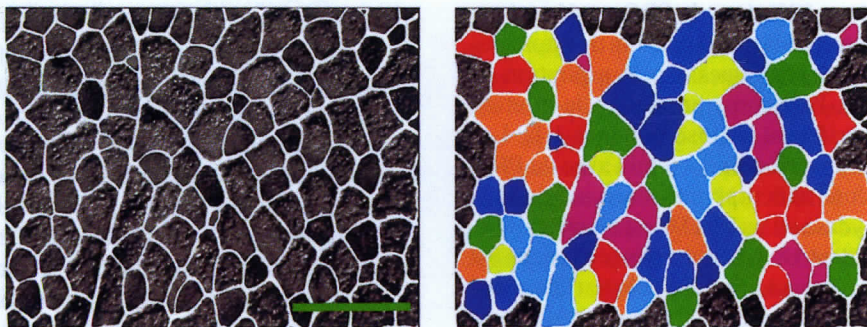
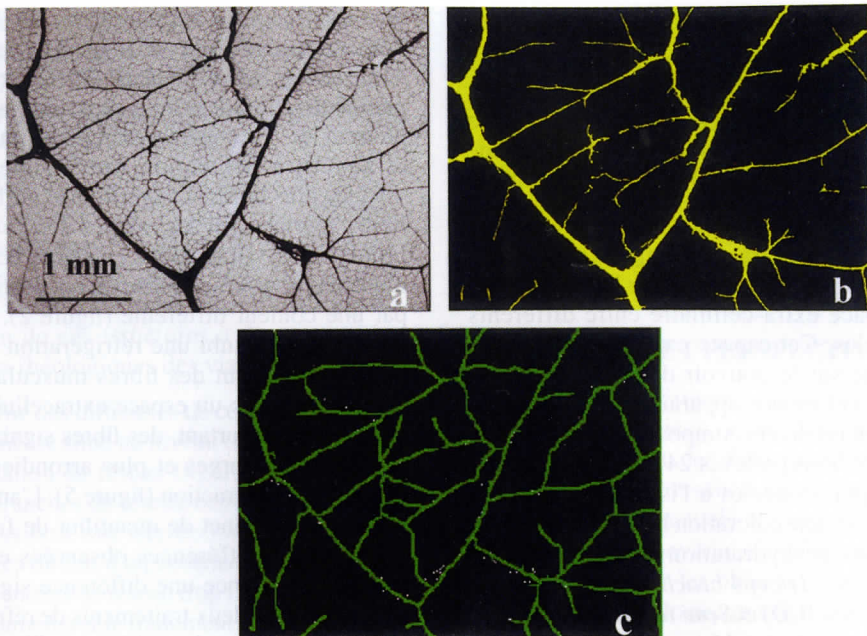
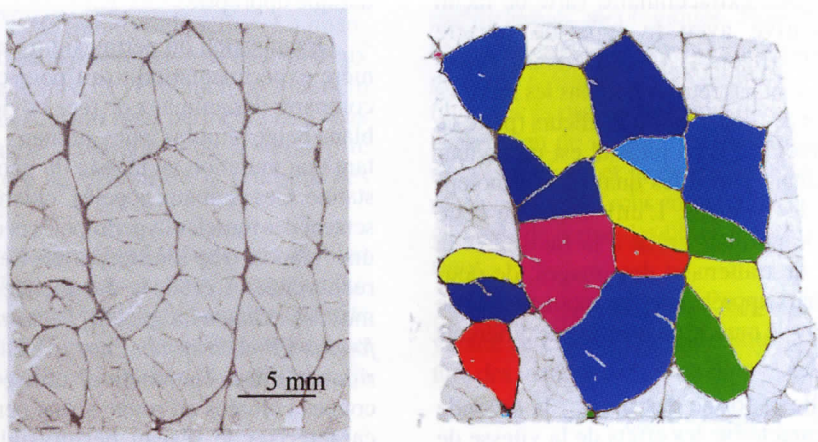


Figure 2 : Evaluation de la surface, du périmètre et de l'indice de forme des cellules musculaires. Coloration azorubine (barre = 200 $\mu$ ).





**Figure 3 : Image numérique (a) du réseau de la trame conjonctive sur une coupe transversale de muscle. Coloration rouge sirius. Segmentation (b) et squelettisation (c).**



**Figure 4 : Mesure de la surface des faisceaux de fibres musculaires, à partir d'une coloration rouge sirius.**

## RESULTATS ET DISCUSSION

Nous présentons les résultats de trois études : la première porte sur la comparaison de muscles, la seconde montre l'effet de traitements technologiques et la troisième met en évidence des différences entre types génétiques.

Espace extra-cellulaire : la première étude a pour objet d'évaluer les différences d'espace extra-cellulaire entre différents muscles. Cet espace extra-cellulaire renseigne sur le pouvoir de rétention d'eau. Dans cet espace apparaît de l'eau exsudée contenant divers composants solubles. Les échantillons prélevés 24 heures après abattage puis congelés à l'iso pentane ont été soumis à une coloration hématoxyline éosine sans déshydratation alcoolique. Trois muscles : *Triceps brachii* (TB), *Longissimus dorsi* (LD) et *Semi tendinosus* (ST) ont été comparés sur 16 taurillons de 24 mois. Le traitement des images par seuillage sur les niveaux de gris permet de calculer l'espace extracellulaire en % de la surface totale. L'espace extracellulaire varie de façon significative avec le type de muscle ( $p < 0,001$ ) (figure 1). Ces différences observées ne sont pas retrouvées dans les mesures sur l'état de l'eau, faites par ailleurs (perte de jus, osmolarité). La jutosité est un facteur déterminant parmi les qualités organoleptiques des viandes. L'utilisation de cette méthode permet, grâce à la facilité et la vitesse de traitement des images, de pouvoir mieux appréhender les mouvements de l'eau dans le muscle en fonction de différents facteurs.

Taille et forme des fibres : la seconde étude caractérise les effets de la vitesse de réfrigération des muscles après abattage des animaux. Les conditions de réfrigération des carcasses peuvent avoir des conséquences très importantes sur la tendreté des

viandes. Une réfrigération trop rapide (4°C) immédiatement après l'abattage par rapport à une réfrigération standard (15°C), induit une contraction des fibres musculaires qui utilisent les réserves énergétiques du muscle et aboutit à l'obtention irréversible, de viandes plus dures. L'algorithme "taille de fibres" permet, sur les images des coupes histologiques, d'individualiser chaque cellule musculaire, représentée de façon aléatoire, par une couleur différente (figure 2). Les muscles ayant subi une réfrigération trop rapide présentent des fibres musculaires contractées avec un espace extracellulaire (EEC) plus important, des fibres significativement plus larges et plus arrondies du fait de cette contraction (figure 5). L'analyse d'images permet de quantifier de façon objective les différences observées et de mettre en évidence une différence significative entre les deux traitements de réfrigération. Là encore, le traitement d'images permet une évaluation des effets liés à un traitement technologique donné et la possibilité de mise en œuvre d'un traitement statistique approprié.

Organisation du périnysium : une dernière expérimentation avait pour objet de comparer des animaux de race bovine Bleu blanc belge témoins à des animaux présentant une mutation au niveau du gène myostatine. Ces animaux appelés "culards" présentent des muscles hypertrophiés et donnent une viande très tendre particulièrement recherchée. L'étude a été menée sur 3 muscles : *Gluteo biceps* GB, *Pectoralis profundus* PP et *Semi tendinosus* ST. L'algorithme "trame conjonctive" utilisé sur les coupes colorées au rouge sirius permet de caractériser le réseau périnysial. Nous observons des différences significatives sur la surface ainsi que sur la longueur du réseau entre animaux témoins et animaux hypertrophiés. Ces derniers présentent un réseau



moins dense. (figure 6). Cette différence est la plus significative pour le muscle ST ( $p < 0,001$ ), moindre pour le muscle GB ( $p < 0,01$ ) et la plus faible mais significative pour le muscle PP ( $p < 0,05$ ).

Nous essayons de développer une méthode d'évaluation de la taille des faisceaux primaires de périnysium (figure 4) sur des coupes de grande dimension (de l'ordre de  $4 \text{ cm}^2$ ). Nous espérons relier ainsi l'organisation de ces structures à des caractéristiques rhéologiques des viandes.

Une des difficultés de ces différents traitements se situe au niveau de l'étape de segmentation du réseau (figure 3). Une partie des branches du réseau ne sont pas extraites nécessitant une correction manuelle des images du fait d'un contraste insuffisant ou de branches de réseau trop fines. Nous espérons améliorer le traitement en optimisant la phase d'acquisition d'images.

Etudes immunohistologiques. La dernière approche est la caractérisation par méthode immunohistologique des composants de cette trame conjonctive. La quantification de la part relative de chacun d'eux ainsi que le suivi de l'évolution post mortem de ces constituants nous permettra de mieux comprendre les origines de la variabilité rencontrée au niveau de la tendreté des viandes.

Les composants tels que la laminine (figure 7) autour de chaque fibre musculaire, la décorine, protéoglycane en quantité importante (figure 8) dans l'endomysium et le périnysium et l'élastine (figure 9) dans la

trame périnysiale ont ainsi été révélées. Le marquage de différents types de collagène, constituant majeur de la trame conjonctive, fera l'objet de prochaines expérimentations. Le traitement d'images pour chacun de ces composants révélés par exemple par réaction peroxydasique devrait nous permettre une approche quantitative de la part relative jouée par chacun d'eux.

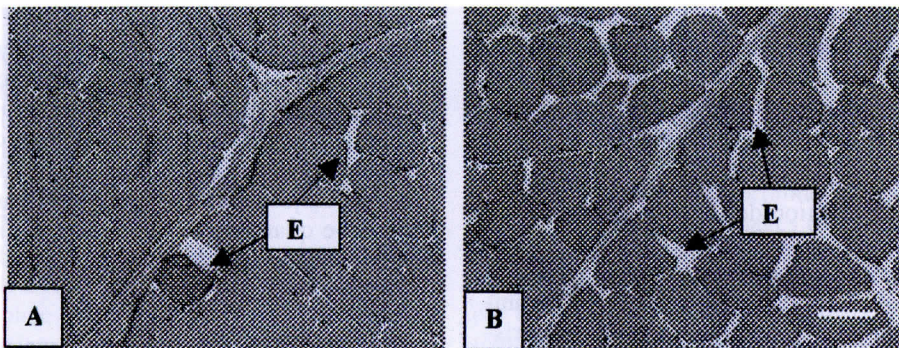
## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le traitement d'images permet d'avoir une évaluation objective des différences observées au niveau des différentes expérimentations. La puissance de calcul des micro-ordinateurs actuels en font un outil performant, plus convivial d'utilisation permettant d'optimiser les observations faites par méthodes histologiques traditionnelles.

L'objet de nos études actuelles est d'approfondir l'étude de l'organisation de la trame conjonctive en relation avec les mesures objectives de la tendreté des viandes évaluée par méthodes rhéologiques. Nous souhaitons poursuivre également l'étude des changements d'espace extra-cellulaire en relation avec la perte d'eau ainsi que l'étude de la jonction de la fibre musculaire avec le tissu conjonctif et la matrice extracellulaire. Nous poursuivrons enfin l'étude des changements de forme des fibres musculaires en rigor.

Nous remercions S. de Smet de l'Université de Gand (Belgique) pour la fourniture des viandes de bovins Bleu blanc belge.



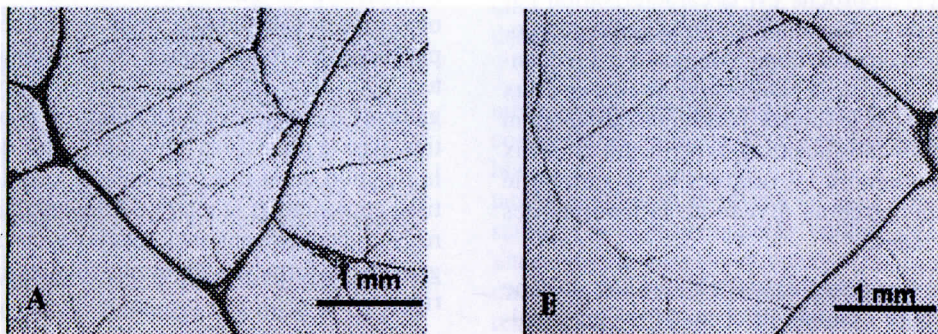


**Figure 5 : Etude de l'effet de la vitesse de réfrigération sur la structure des muscles.**

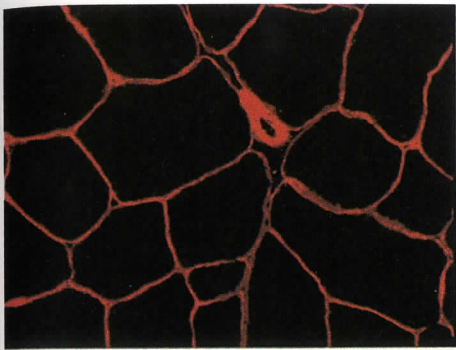
**A - muscle témoin réfrigération normale**

**B - muscle ayant subi un effet de contracture au froid lié à une réfrigération trop rapide. Coloration hématoxyline éosine safran.**

**E : espace extra-cellulaire. barre = 50  $\mu$ m.**

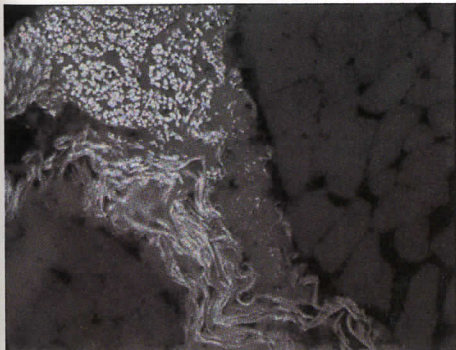
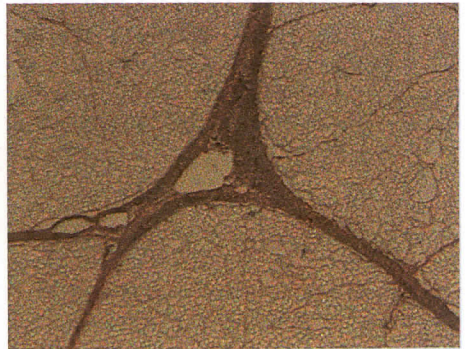


**Figure 6 : Comparaison de la structure de la trame périmysiale entre animaux témoins (A) et animaux porteurs de la mutation du gène myostatine (B). Coloration rouge sirius.**



**Figure 7 : Marquage de la laminine endomyocardiale par immunofluorescence.**

**Figure 8 : Mise en évidence de la décorine péri-mysiale par anticorps marqué à la peroxydase.**



**Figure 9 : Mise en évidence de l'élastine péri-mysiale par immunofluorescence.**



## BIBLIOGRAPHIE

1. KOOHMARAIE M.: Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. *Meat Sci.* 1996, 43, S193 – S201.
2. HARPER G.S., ALLINGHAM P.G. & HUNTER R.A.: The significance of connective tissue structure and content to meat quality: growth path and nutritional history. *ICoMST*, 1997,43, 90-93.
3. HOPSTER, DJ CODD JD, ROSE P.E., SALISBURY J. R.: Use of different histomorphometric parameters in the routine assessment of human skeletal muscle biopsies. *Anal. Cell. Pathol.* 1996, 12, 173-185.
4. BAEZA E., SALICHON M. R., MARCHE G., WACRENIER N., DOMINGUEZ B., CULIOLI J.: Effects of age and sex on the structural, chemical and technological characteristics of mule duck meat. *Brit. Poul. Sci.*, 2000, 41, 300-307.
5. LEFAUCHEUR L., BUCHE P., ECOLAN P., LEMOING M.: Classification of pig myofibres and assessment of post-mortem glycogen depletion according to fibre type by computerized image analysis. *Meat Sci.*,1992, 32, 267-278.
6. SAYD T., MERA T., MARTIN V., LAVILLE E.: Spatial distribution of myosin heavy chain isoforms and lactate dehydrogenase M4 in the limb musculature of two crossbred lambs. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998, B 120, 153-163.
7. PICARD B, DURIS M.P., JURIE C. Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. *Histochem. J.*, 1998, 30, 473-479.
8. IWAMOTO H., GOTOH T., SUGIMURA M., OKAMOTO S. Histological changes of fasciculus induced by different sizes of the pectoralis muscle in Japanese quail with large, normal and small body size. *ICoMST*, 1999, 45, 286-287.
9. GUIGNOT, F., VIGNON X., MONIN G. : Post mortem evolution of myofibril spacing and extracellular space in veal muscle. *Meat Sci.*,1993, 333-347.
10. GOODPASTER BH, THERIAULT R.,WATKINS S.C., KELLEY D.E.: Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* 2000, 49, 467-472.
11. LIU A.,NISHIMURA, T.,TAKAHASHI, K. Structural changes in endomysium and perimysium during post-mortem aging of chicken semitendinosus muscle - contribution of structural weakening of intramuscular connective tissue to meat tenderization *Meat Sci.* 1994, 38, 315-328.
12. GHEYLE M.,PUTTEVILS C. & LOGGHE J. P. Le rouge sirius comme coloration de routine pour les fibres collagènes. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 1991, 4, 7-10.



## EVALUATION DE L'OS EN TOXICOLOGIE

### Techniques histologiques et Morphométrie

A. BÉCRET et P. PERSIL

*Département d'Histopathologie  
CIT- BP 563  
27005 EVREUX CEDEX*

#### INTRODUCTION

La Recherche et le Développement des laboratoires pharmaceutiques sont fortement stimulés actuellement par le très préoccupant problème de santé publique que pose l'ostéoporose du fait du vieillissement croissant de la population. L'ostéoporose se définit par une masse osseuse basse avec détérioration de l'architecture osseuse menant à une fragilité osseuse avec possibilité de fractures (1).

L'approche toxicologique des nouveaux médicaments à visée anti-ostéoporotique passe par l'histomorphométrie qui fait partie, avec la densitométrie osseuse, les marqueurs du métabolisme osseux et la biomécanique, du bilan des effets engendrés sur l'os par les différentes molécules .

Le but de cet article est de présenter l'environnement technique d'un laboratoire d'histomorphométrie, l'importance de l'obtention d'une bonne qualité des coupes histologiques, puis de faire une revue non

exhaustive des paramètres mesurés et de présenter le matériel constituant la station d'analyse d'images.

#### TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

L'os est un tissu vivant alliant une composante organique, essentiellement représentée par les protéines d'origine collagénique (90% de collagène, surtout de type I), et une composante minérale, constituée de cristaux d'hydroxyapatite à partir d'ions calcium et de phosphate. Toute étude histomorphométrique implique que le minéral calcique soit préservé et que l'os soit étudié sans avoir été auparavant décalcifié.

#### Matériel :

Les modèles animaux les plus couramment utilisés sont le rat ou le primate ovariectomisés.

Ceci implique des variations dans la

taille des prélèvements (beaucoup plus petits chez le rat). Les pièces osseuses les plus utilisées sont le tibia et les vertèbres lombaires. Chez le singe on peut également pratiquer sous anesthésie générale des biopsies osseuses de crête iliaque (comme chez l'homme) ou de côtes. Ces biopsies permettent l'examen d'échantillons de petite taille (1.5 mm<sup>2</sup> pour une côte, 3 mm<sup>2</sup> pour une crête iliaque).

### **Méthode :**

Dès le prélèvement à l'autopsie, les os sont débarrassés des tissus mous les recouvrant (muscles et aponévroses) et sont immergés dans de l'alcool 70%. Selon la taille des prélèvements la durée des étapes successives de fixation, déshydratation et imprégnation varie. Ainsi, pour la vertèbre de primate qui a servi à l'essai comparatif des trois méthodes de recueil des coupes, 8 semaines de fixation dans l'éthanol 70%, puis 4 semaines de déshydratation à température du laboratoire dans de l'éthanol 100% ont été nécessaires. Après substitution dans du toluène, la vertèbre a subi une imprégnation en résine Méthylméthacrylate + Dibutyl-phtalate par 3 bains successifs d'une durée de 7 jours chacun, à la température de +4°C (le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> bains contenant respectivement 1 % et 2% de Benzoyle Peroxyde qui est un accélérateur de la polymérisation). La polymérisation a été faite à chaud, par paliers de températures successifs (28°C, 30°C et 32°C). Le bloc de résine a ensuite été meulé (meuleuse/polisseuse ESCIL 200GT 1V) puis coupé à l'aide d'un microtome pour objets durs (Polycut SM 2500 S LEICA) avec un couteau au carbure de tungstène (angle de 60°). Huit niveaux de coupe ont été effectués, espacés entre eux de 150 µm. A chaque niveau, 3 coupes séries de 7 µm d'épaisseur ont été recueillies par trois méthodes différentes : une, par la

technique des coupes flottantes (méthode simple et rapide mais qui induit un phénomène de "gondolage" dû à la résine qui est contraignant lors de l'analyse au microscope) ; une autre, sur lames gélatinées, et la dernière, sur lames gélatinées et déplastifiées (méthode plus longue et compliquée mais qui atténue fortement le phénomène de "gondolage" et pourrait permettre une automatisation de la coloration).

### **Essai comparatif de trois méthodes de recueil des coupes**

Pour l'essai les lames ont simplement été colorées au Bleu de Toluidine alors qu'en examen de routine, il est classique de colorer trois lames au Goldner (coloration de Masson modifiée) et de garder trois coupes non colorées qui servent à l'examen en épifluorescence.

Du fait des propriétés irritantes et sensibilisantes du MMA toutes les manipulations concourant à la réalisation des coupes histologiques doivent se faire sous hotte d'aspiration ; le réfrigérateur où est stocké le MMA ainsi que l'étuve où se fait la polymérisation doivent être reliés à cette hotte équipée, de plus, d'un moteur anti-déflagrant, afin que les vapeurs de MMA soient éliminées sans risque étant donné le potentiel explosif du Benzoyle Peroxyde.

### **IMPORTANCE DE LA QUALITE DE LA TECHNIQUE HISTOLOGIQUE DANS L'EVALUATION QUANTITATIVE DES PARAMETRES OSSEUX**

Dans le but d'essayer de diminuer le phénomène de "gondolage" lié à la persistance de la matière plastique sur la lame et dans le même temps de mettre en place une automatisation de la méthode de coloration, nous avons fait des tests sur 24 échantillons répartis en 3 groupes, selon les 3 méthodes décrites ci-dessous.



## METHODE

Il s'agit de comparer la qualité des coupes histologiques obtenues par trois méthodes : recueil sur coupes flottantes ; recueil sur lames gélatinées ; recueil sur lames gélatinées et déplastifiées. Les critères de qualité des coupes histologiques recueillies sont une bonne cohésion des travées osseuses avec peu de craquelures ou des craquelures de petite taille et un contact étroit entre la moelle osseuse et le bord de la travée osseuse. Pour cet essai, les lames ont été colorées au bleu de toluidine (1% de bleu de toluidine dans du tampon phosphate à  $\text{pH}=4,3$  pendant 20 minutes), technique plus simple et plus rapide que la coloration de Goldner et suffisante pour différencier les espaces médullaires et les travées osseuses. Pour chaque méthode employée, huit lames ont été réalisées. Outre les résultats qualitatifs obtenus avec chacune des trois méthodes, des résultats quantitatifs ont été obtenus sur quelques paramètres histomorphométriques avec étude statistique (ANOVA).

### *Méthode 1 : Lames témoins*

Chaque coupe est récupérée dans un pot à faisselle contenant de l'eau puis colorée au Bleu de Toluidine. Le montage de la coupe se fait au Fluoromount.

### *Méthode 2 : Lames gélatinées*

Chaque coupe est récupérée sur lame gélatinée puis recouverte d'un film plastique et mise sous presse pendant 72 heures.

### *Méthode 3 : Lames gélatinées et déplastifiées*

Certaines coupes d'abord récupérées sur lames gélatinées sont ensuite déplastifiées dans du 2 Métoxyéthyle-acétate (3 fois 15 minutes) puis colorées au Bleu de Toluidine. Le montage de la coupe se fait au Fluoromount.

## RESULTATS

### Qualitatifs

L'image histologique de la coupe de vertèbre préparée par la première méthode (témoin) répond aux critères de qualité énoncés (figure 1). Sur l'image histologique de la coupe de vertèbre préparée par la deuxième méthode (lame gélatinée maintenue sous presse) le nombre et la taille des craquelures au sein des travées osseuses sont augmentés (figure 2). Le manque de qualité de la coupe histologique est encore accentué pour la vertèbre préparée par la troisième méthode avec un espace artéfactuel qui se crée entre la moelle osseuse et le bord de la travée osseuse (figure 3).

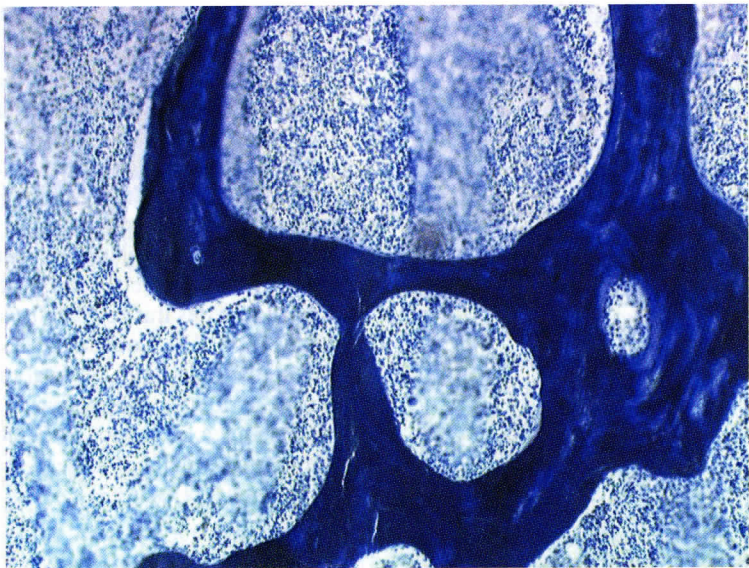
### Quantitatifs

Il est clair que l'organisation de l'os se trouve d'autant plus bousculée que le nombre d'étapes supplémentaires ajoutées à la méthode de recueil est plus important. Il s'ensuit une diminution progressive du volume osseux, maximum avec la méthode de déplastification (-8%, statistiquement non significative) et vraisemblablement liée à la perte de substance osseuse du fait des manipulations successives. Par contre, les craquelures augmentant les contours osseux, il s'ensuit une augmentation de la surface osseuse maximum avec la méthode de déplastification (+12 %) et statistiquement significative ( $p < 0.01$ ).

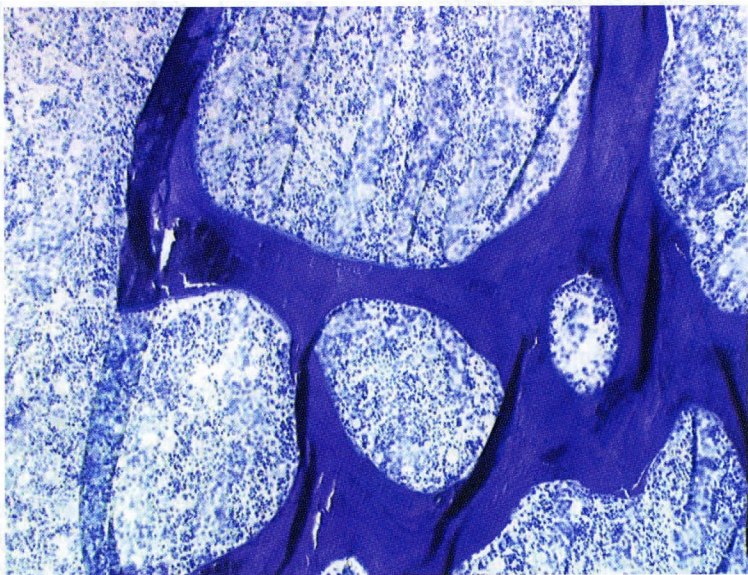
## CONCLUSION DE L'ESSAI

Trop d'artéfacts sont issus de la méthode de déplastification comme le montrent l'analyse qualitative des coupes histologiques. De plus, les variations de la surface osseuse ne sont pas acceptables puisque la surface osseuse est la surface de référence utilisée pour exprimer la plupart des paramètres histomorphométriques primaires.





**Figure 1 : recueil d'une coupe flottante. Coloration au bleu de toluidine. Gx10. Peu de craquelures étroites.**



**Figure 2 : recueil de la coupe histologique sur lame gélatinée. Coloration au bleu de toluidine. Gx10. Augmentation du nombre et de la taille des craquelures.**

## MORPHOMETRIE

Avant de présenter le matériel équipant la station d'analyse d'images, un rappel des différents paramètres d'histomorphométrie de base et de leur signification est nécessaire.

Le remodelage osseux qui survient chez l'homme adulte ou chez l'animal mature est le résultat du couplage de la résorption de l'os ancien (premier événement) et de la formation d'os nouveau (second événement). L'os nouvellement formé apparaît d'abord à l'état non minéralisé (ostéoïde) et n'est minéralisé que dans un second temps. La balance osseuse est équilibrée quand la quantité d'os formé égale celle de l'os résorbé. La balance est déficitaire si la résorption est supérieure à la formation et positive dans le cas contraire. Les recherches actuelles essaient de trouver des produits capables de diminuer la résorption de l'os et/ou d'en augmenter la formation, de telle sorte que le bilan osseux soit positif. Certaines molécules sont prometteuses soit du fait de leur activité anti-résorbante (les biphosphonates, par exemple) ou leur effet anabolisant (l'hormone parathyroïdienne, par exemple), pour n'en citer que quelques unes.

Pour en faciliter l'exposé, les paramètres de base d'histomorphométrie osseuse peuvent être classés en plusieurs rubriques : paramètres structuraux, paramètres statiques, paramètres dynamiques et paramètres microarchitecturaux (ou squelettisation). Ce sont ceux définis par le comité scientifique de l'ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) (2).

Pour pouvoir obtenir les mesures des *paramètres dynamiques*, il convient d'avoir au préalable administré IN VIVO à l'animal des fluorochromes dont la propriété est de se fixer au niveau du front de minérali-

sation et de pouvoir être visualisés sur coupes histologiques recueillies sans coloration et examinées en épifluorescence. Les fluorochromes les plus utilisés étant la Calcéine (fluorescence verte), la Tétracycline (fluorescence jaune) et l'Alizarine Complexone (fluorescence rouge). Le terme *labeling* désignant ce marquage, les initiales des surfaces simplement ou doublement marquées sont par conséquent sLS pour les surfaces simplement marquées et dLS pour les surfaces doublement marquées.

Les paramètres dynamiques expriment d'une part la vitesse de minéralisation de l'os nouvellement formé (MAR : Mineral Apposition Rate, exprimé en  $\mu\text{m/day}$ ) et d'autre part, la quantité de surface osseuse marquée (MS/BS) exprimée en pourcentage. La vitesse de minéralisation est obtenue en divisant la distance ( en  $\mu\text{m}$ ) séparant deux lignes de marquages par le temps écoulé entre la première et la seconde administration de deux fluorochromes. Pour le calcul de MS/BS, la surface minéralisée totale est en fait la somme de la moitié des surfaces simplement marquées et de la totalité des surfaces doublement marquées ( $\text{MS} = \frac{1}{2} \text{sLS} + \text{dLS}$ ).

*Les paramètres structuraux* sont obtenus par seuillage automatique HLS (selon les initiales des termes anglais et correspondant à des niveaux de teinte, de luminosité et de saturation). Ils mesurent au niveau de la travée osseuse le volume osseux (BV : Bone Volume) rapporté au volume tissulaire total de la pièce osseuse (TV : Tissue Volume) soit  $\text{BV/TV}$  exprimé en pourcentage ainsi que la surface osseuse (BS : Bone Surface) exprimée en  $\mu\text{m}^2$ . Par des formules de calcul rentrés dans le logiciel (Osteolab BIOCROM) et dérivées des équations de Parfitt (3) le seuillage automatique permet d'obtenir également le



nombre de travées osseuses (Tb.N : Trabecular Number) exprimé en mm<sup>-1</sup>, l'épaisseur des travées ( Tb.Th : Trabecular Thickness) exprimée en  $\mu\text{m}$  et l'espacement des travées (Tb.Sp : Trabecular Spacing) exprimé en  $\mu\text{m}$ .

**Les paramètres statiques** regroupent les paramètres de la formation et de la résorption osseuses. Les mesures portant sur les cellules formatrices d'os ou ostéoblastes (Ob.S/BS) et les mesures portant sur la quantité de matériel ostéoïde déposé au bord des travées (OV/BV et OS/BS) permettent une estimation de la formation osseuse. La surface des liserés ostéoblastiques et la surface et le volume des dépôts de substance ostéoïde sont rapportés à la surface ou au volume osseux de référence. Selon un principe identique, les mesures portant sur les surfaces osseuses occupées par des lacunes de résorption (ES/BS) creusées par les cellules résorbantes ou ostéoclastes (Oc.) permettent une estimation de la résorption osseuse.

**Les paramètres micro-architecturaux** (mesures de la connectivité : squelettisation) sont recueillis après transformation de l'image des travées osseuses qui sont réduites à leur squelette.

Le logiciel peut sortir énormément de paramètres concernant la squelettisation.

Néanmoins les paramètres qui traduisent le mieux une bonne connectivité sont ceux qui prennent en compte les nœuds et les segments de travées entre les nœuds (Nd. : Nodes) : Nd.N: Nombre de Nœuds ; Nd to Nd N.: Nombre de segments de nœud à nœud ; Nd to Nd.Le ( $\mu\text{m}$ ): Longueur totale des segments de nœud à nœud ; ces paramètres sont rapportés à la longueur totale du squelette (TSL en  $\mu\text{m}$ ).

## ANALYSE D'IMAGES ASSISTEE PAR ORDINATEUR

Le système d'analyse d'images permet grâce à une caméra couleur tri- CCD (SONY DXC-950) de faire l'acquisition des images. La caméra est montée sur un microscope éclipse 600 (NIKON). Le logiciel Osteolab (BIOCOM) est un logiciel d'analyse d'images dédié à l'os. Un moniteur couleur (SONY Multiscan 200 GS) permet l'affichage simultané des barres d'outils du logiciel, de l'image de l'os et de la feuille de résultats. La tour NIXDORF Pro H5 comporte deux lecteurs enregistreurs pour la sauvegarde des données sur disquette et sur disque optique. Le logiciel dispose d'une fonction "acquisition d'images en continu" et une platine motorisée permet d'utiliser la fonction "exploration" qui fixe le point de départ et le point d'arrivée d'une mesure semi-automatique. Le seuillage automatique de coupes histologiques colorées au Goldner, permet l'évaluation quantitative de l'os minéralisé (coloré en vert) au niveau des travées osseuses (BV/TV) et au niveau des corticales l'estimation de la porosité (Ct.Po : Cortical Porosity) et de l'épaisseur des corticales (Ct.Th : Cortical Thickeness). Une fonction de visualisation des surfaces et périmètres pris en compte (fonction "detect") permet au technicien qui pilote la station de contrôler l'adéquation du seuillage avant de valider la mesure de ces paramètres structuraux (figure 4). Les paramètres statiques et dynamiques (figure 5) sont obtenus par une méthode semi-automatique de tracé à l'aide de la souris de lignes fermées ou brisées. La squelettisation des travées permet de différencier par la couleur (figure 6) les nœuds situés entre deux travées, ceux raccordant une travée à la corticale ou encore les extrémités libres des travées (termini).



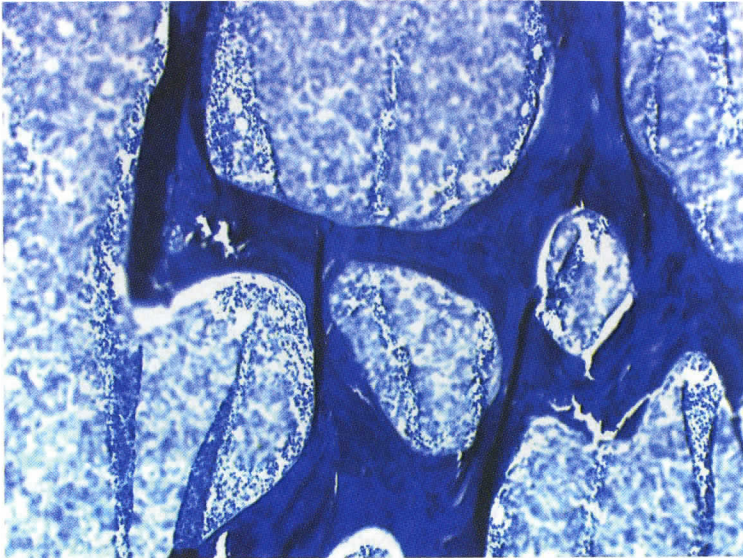


Figure 3 : recueil de la coupe histologique sur lame gélatinée avec déplastification. Coloration au bleu de toluidine. Gx10. Augmentation du nombre et de la taille des craquelures. Espace artéfactuel entre le bord de la travée osseuse et la moelle.

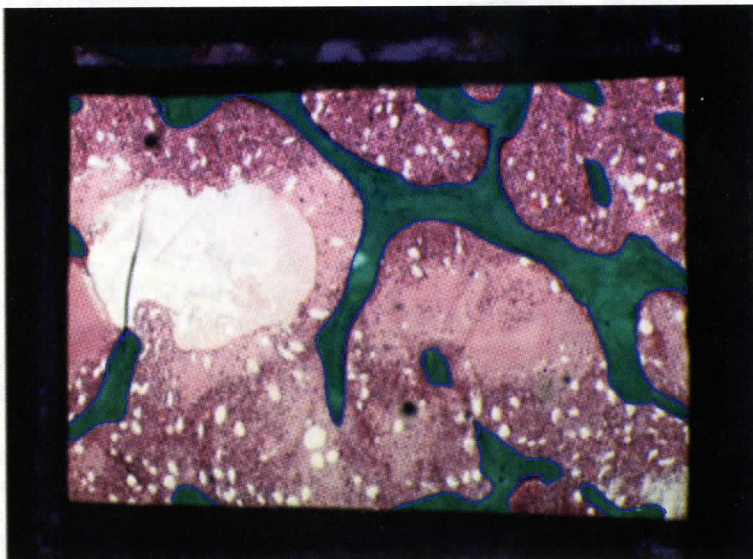
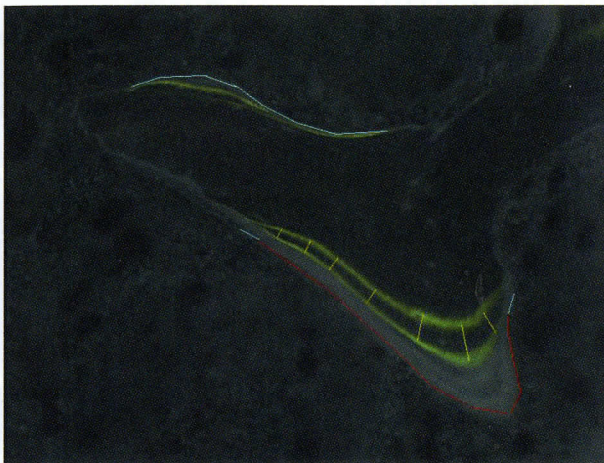
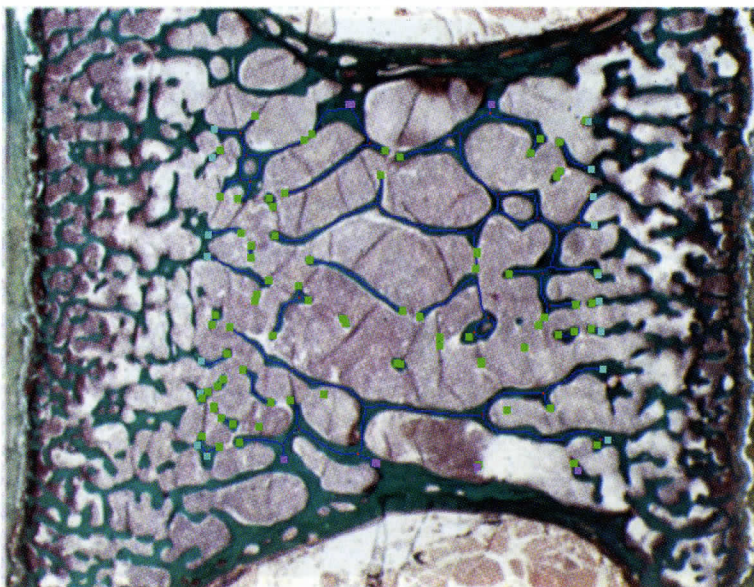


Figure 4 : Faisant suite au seuillage HLS : application de la fonction "detect". Les travées osseuses colorées en vert (Goldner) sont surlignées par un fin liseré bleu qui permet la visualisation du seuillage effectué.



**Figure 5 : Mesure de MS et de MAR par analyse semi-automatique : les surfaces simplement et doublement marquées sont surlignées et la distance entre deux fronts de minéralisation est matérialisée par des traits.**



**Figure 6 : Différenciation par la couleur des nœuds et des termini au cours de la squelettisation d'une vertèbre de primate.**



## CONCLUSION

Le matériel d'analyse d'images présenté ici est très convivial et de plus très performant. L'évolution du logiciel est d'ores et déjà assurée par son successeur "BONE" (EXPLORA NOVA, La Rochelle, France). La revue des paramètres d'histomorphométrie faite dans ces pages n'est certes pas exhaustive. D'autres paramètres primaires existent et également de nombreux paramètres dérivés des premiers par des calculs. On trouvera facilement la liste et la des-

cription de ces paramètres dans des articles beaucoup plus exhaustifs (2). L'exactitude des mesures effectuées ne repose pas uniquement sur la fiabilité des appareils de mesure. Avant tout, la qualité du matériel mesuré est importante. Les travées osseuses doivent être aussi peu endommagées que possible lors de la préparation des coupes histologiques. L'essai technique présenté dans cet article sur quelques échantillons de vertèbre de primate est là pour le souligner.

## BIBLIOGRAPHIE

1. D. KUNTZ.- Ostéoporoses . Maladies Métaboliques Osseuses de l'Adulte. Médecine-Sciences. Flammarion. 234-302
2. A. MICHAEL PARFITT (CHAIRMAN), MARC K. DREZNER, FRANCIS H. GLORIEUX , JOHN A. KANIS, HARMUT MALLUCHE, PIERRE J. MEUNIER, SUSAN M. OTT , and ROBERT R. RECKER .- Bone Histomorphometry : Standardization of Nomenclature, Symbols, and Units. REPORT OF THE ASBMR HISTOMORPHOMETRY NOMENCLATURE COMMITTEE. Journal of Bone and Mineral Research, 1987, 2, n° 6, 595-610.
3. A. M. PARFITT, C. H. E. MATHEWS, A. R. VILLANUEVA, M. KLEERKOPER, B. FRAME, and D. S. RAO.- Relationships between Surface, Volume, and Thickness of Iliac Trabecular Bone in Aging and in Osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular mechanisms of bone loss. J. Clin. Invest., 1983, 72, 1396-1409.