

HISTOMORPHOMÉTRIE DE LA GLANDE THYROÏDE : INFLUENCE DE L'OPÉRATEUR ET DE LA MÉTHODE MORPHOMÉTRIQUE SUR LES RÉSULTATS (1)

M. DELVERDIER, P. CABANIE, F. ENJALBERT, G. VAN HAVERBEKE

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE

*Département de physiopathologie - Service d'Anatomie pathologique
23, chemin des Capelles - 31076 TOULOUSE Cedex - FRANCE*

RÉSUMÉ

Certains paramètres méthodologiques (opérateur, méthode d'évaluation quantitative) de l'histomorphométrie de la glande thyroïde du rat sont analysés quant à leur influence sur la qualité des résultats.

Les variations imputables à l'opérateur sont importantes lorsque les coupes histologiques ne bénéficient pas de techniques particulières permettant une visualisation précise des différents constituants tissulaires.

Des méthodes morphométriques différentes donnent des résultats qui ne pré-

sentent pas de différence significative dès lors que l'échantillonnage statistique, pour chacune de ces méthodes, est adéquat.

Le choix d'une méthode morphométrique donnée doit être conditionné par la finalité de l'étude.

(1) Cette publication concerne une partie du mémoire de Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse du premier auteur.

INTRODUCTION

Le follicule thyroïdien est l'unité fonctionnelle de la glande thyroïde. Il est bordé par un épithélium simple qui élabore la colloïde présente dans la cavité centrale du follicule. Les hormones thyroïdiennes sont libérées dans le sang à la faveur d'un cycle sécrétoire comprenant une phase de synthèse, une phase de stockage dans la colloïde et une phase de sécrétion proprement dite [1].

Sur un plan morphologique au niveau d'un follicule, le cycle sécrétoire se traduit par des modifications des dimensions du follicule, de l'épithélium folliculaire et de la cavité centrale. L'aspect morphologique d'un follicule thyroïdien est donc étroitement dépendant de son activité fonctionnelle. Pour cette raison, l'analyse quantitative en histologie (histomorphométrie) des variations morphologiques de la glande thyroïde se révèle intéressante pour apprécier les effets de facteurs qui sont susceptibles de modifier le fonctionnement glandulaire.

Nous avons conduit dans notre laboratoire une étude méthodologique critique de l'histomorphométrie de la glande thyroïde chez le rat, de manière à évaluer l'impact des principaux paramètres qui conditionnent la qualité des résultats [2, 3, 4].

Dans cet article nous nous proposons de rendre compte d'une étude concernant l'influence de l'opérateur et de la méthode morphométrique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. ANIMAUX

Huit rats Sprague Dawley-Cobs (SD) BR (Charles River France) ont été utili-

sés pour les 3 manipulations de cette étude.

2. TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Selon les cas, deux types de techniques histologiques ont été réalisées :

- les premières comportent une fixation par le formol et une inclusion en paraffine ;

- les secondes une fixation par le glutaraldéhyde et l'acide osmique et une inclusion en résine.

2.1. *Techniques avec inclusion de la glande thyroïde dans la paraffine.*

• **Prélèvement :**

- prélèvement global de la trachée et des thyroïdes avec préfixation dans le formol à 10 % (pour éviter les altérations tissulaires par pression ;

- dissection fine des thyroïdes.

- **Fixation** dans le formol à 10 %.

- **Orientation et inclusion** en paraffine de la totalité de la glande thyroïde.

- **Coupes sagittales** de 5 μm d'épaisseur. La représentativité des coupes effectuées dans la partie centrale de la glande thyroïde du rat a été démontrée dans des travaux antérieurs [5, 6].

• **Examen morphologique :**

- après coloration hémalum-éosine ;
- après une réaction histochimique d'imprégnation argentique (méthode de Gordon et Sweets [7]) permettant de mettre en évidence les fibres de réticuline.

2.2 *Technique avec inclusion de la glande thyroïde en résine.*

- **Prélèvement :** fragmentation de la glande thyroïde en deux parties et recoupe en cubes de 1 mm^3 .

- **Fixation** : glutaraldéhyde (tampon cacodylate : 0,4 M - pH 7,2).

- **Post-fixation** : tétroxyde d'osmium à 2 % - tampon cacodylate.

- **Inclusion** en résine (mélange araldite-épon).

- **Microtomie** : épaisseur de coupe 1 μ m (coupes semi-fines).

- **Examen morphologique** après coloration par le bleu de méthylène azur.

3. MÉTHODES MORPHOMÉTRIQUES

Deux types de méthodes ont été utilisés :

3.1. *La morphométrie semi-automatique* au moyen d'un appareil d'analyse d'images semi-automatique « Leitz - ASM ».

Cette méthode a été utilisée pour mesurer la hauteur des thyrocytes et le pourcentage épithélial (pour un follicule thyroïdien, rapport de la surface épithéliale sur la surface folliculaire).

Pour chacune des 3 manipulations, le nombre de mesures à effectuer a été déterminé pour avoir un intervalle de confiance inférieur à 5 % de la moyenne.

Les mesures ont été effectuées à l'objectif 100 à immersion.

La présence chez le rat de follicules thyroïdiens de type inactif en périphérie de la glande (follicules de grande dimension avec un épithélium très aplati [8]) entraîne des écart-types importants. Cependant des études préliminaires nous ont montré que la prise en compte ou la non prise en compte de ces follicules périphériques ne modifiait pas de manière significative les valeurs moyennes obtenues par animal. En conséquence, nous

avons choisi de ne pas retenir pour les mesures les follicules périphériques sur une bande de 300 μ m environ. La zone de lecture est parcourue selon un balayage systématique à la manière d'un frottis sanguin.

3.2. *Le comptage des points* selon la méthode définie par WEIBEL [9, 10] (« Point-counting »).

L'image du champ d'un microscope photonique est visualisée sur l'écran d'un appareil de projection sur lequel est disposée une grille test comportant 60 points.

La fraction volumique de chaque constituant tissulaire (épithélium folliculaire, colloïde, interstitium) correspond au rapport du nombre de points de la grille test situés sur ce constituant sur le nombre total de points de la grille test, obtenu par mesure de plusieurs champs. Pour limiter l'erreur standard relative à un niveau de 5 % [10], cinq champs ont été étudiés le long du grand axe de la thyroïde (à intervalles réguliers, de telle sorte que tout l'axe soit examiné). Ceci élimine comme précédemment les gros follicules périphériques. Ainsi, 300 comptages par coupe histologique ont été réalisés.

Ce comptage est effectué à l'objectif 40.

4. ÉTUDES RÉALISÉES.

4.1. *Etude A : Influence de l'opérateur et du choix qu'il fait des éléments à mesurer.*

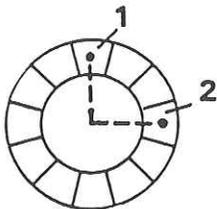
- **Variations liées à la réalisation des mesures par des individus différents.**

Chez un animal, la hauteur des thyrocytes (après inclusion en paraffine et coloration hémalun-éosine) est mesu-

rée avec le morphomètre semi-automatique :

- par le même opérateur, à deux reprises ;
- par un autre opérateur.

Ces mesures portent sur 100 cellules choisies au hasard, à raison de 2 cellules par follicules. La première de ces cellules est déterminée totalement au hasard, la seconde est choisie systématiquement à 90° de la précédente.



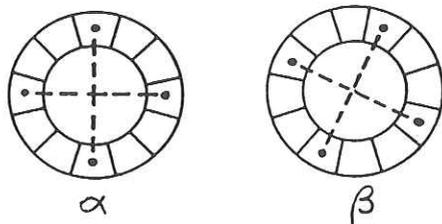
• Influence du choix des éléments mesurés par un individu.

Les mesures effectuées avec le morphomètre semi-automatique concernent la hauteur des thyrocytes de la glande thyroïde d'un rat après inclusion en résine et coloration par le bleu de méthylène-azur (coupes semi-fines). Cette manipulation vise à évaluer la variabilité qui n'est pas directement inhérente à la réalisation des mesures mais au choix des éléments mesurés.

La technique histologique des coupes semi-fines a été choisie en raison de sa très bonne définition des contours cellulaires. En effet, dans l'étude du rôle du choix des éléments mesurés en morphométrie, il nous a paru intéressant de rechercher pour les mesures, une précision maximale, quant à leur valeur absolue.

Pour chaque follicule, quatre cellules

par follicule sont mesurées selon deux modalités (α) et (β) ; pour chacune de ces modalités, 100 cellules sont mesurées.



4.2. Etude B : influence de la méthode morphométrique retenue dans l'appréciation quantitative d'un constituant tissulaire.

Les méthodes morphométriques comparées sont le comptage des points et la morphométrie semi-automatique.

La mesure choisie pour comparer ces deux méthodes est la détermination du pourcentage épithélial. Elle a été réalisée dans un lot de 6 rats mâles du même âge (12 semaines). La technique histologique comprend une inclusion en paraffine et une réaction d'imprégnation argentique (méthode de Gordon et Sweets).

5. STATISTIQUE.

Le test statistique utilisé est le test de Student (abréviations employées : NS : non significatif, S : significatif, * : au niveau 5 %, ** : au niveau 1 %, *** : au niveau 1 %).

La normalité de la distribution a fait l'objet d'une vérification préalable.

RÉSULTATS

1. Etude A : Influence de l'opérateur et du choix qu'il fait des éléments à mesurer.

• Variations liées à la réalisation des mesures par des individus différents.

La mesure de la hauteur des thyrocytes, effectuée deux fois par le même opérateur, a donné les résultats suivants :

- première mesure : hauteur moyenne : 7,715 μm ($\sigma = 1,627$) ;
- deuxième mesure : hauteur moyenne : 7,716 μm ($\sigma = 2,031$).

La différence observée entre ces résultats n'est pas significative (test de Student, $t=0$; NS).

Lorsque cette mesure a été effectuée par un deuxième opérateur, la hauteur moyenne de l'épithélium a été estimée à 8,652 μm ($\sigma = 2,557$). La différence entre ce résultat et celui du premier opérateur (première mesure par exemple) est significative (test de Student, $t = 7,37$; S^{***}).

• Influence du choix des éléments mesurés par un individu.

Sur coupe semi-fine la hauteur des thyrocytes peut être appréciée avec précision (fig. 1). Elle est mesurée deux fois pour chaque follicule, avec à chaque fois une modalité de choix différente pour les cellules retenues pour la mesure. Les résultats sont les suivants :

- première modalité de choix : hauteur moyenne : 7,48 μm ($\sigma = 1,60$) ;
- deuxième modalité de choix : hauteur moyenne : 7,41 μm ($\sigma = 2,05$).

La différence observée n'est pas significative (test de Student, $t = 0,297$; NS).

2. Etude B : Influence de la méthode morphométrique.

La réaction histochimique d'imprégnation argentique nous a permis de visualiser très nettement la membrane basale des follicules thyroïdiens (fig. 2), ce qui a facilité la réalisation des mesures morphométriques. Le résultat des mesures figure dans le tableau I.

Le pourcentage épithélial moyen (rapport de la surface épithéliale sur la surface folliculaire) obtenu par le morphomètre semi-automatique est de 57,27 % ($\sigma = 7,72$).

Pour la méthode du comptage des points il est de 59,93 % ($\sigma = 8,39$).

Les résultats obtenus par les deux méthodes ne sont pas significativement différents (test de Student : $t = 2,2019$; NS).

DISCUSSION

En ce qui concerne l'influence de l'opérateur sur les résultats histomorphométriques, il apparaît qu'un même opérateur mesurant la hauteur des thyrocytes d'une glande thyroïde, obtient sur plusieurs manipulations des valeurs qui ne présentent pas de différence significative. En revanche deux opérateurs obtiennent des résultats significativement différents.

La conclusion qui découle de ce qui précède est naturellement que le même opérateur doit toujours procéder à toutes les mesures d'une étude donnée. En effet, l'opérateur joue un rôle déterminant dans la valeur des mesures morphométriques dans les techniques d'analyse d'images semi-automatiques puisque c'est lui, et lui seul, qui choisit les contours, les distances... Sa fiabilité est liée

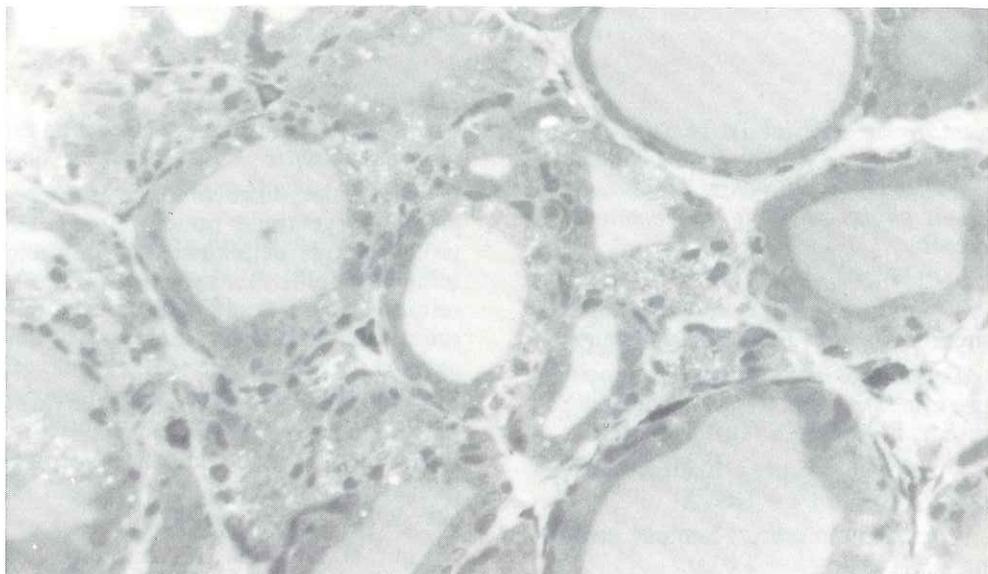


Fig. 1 : Thyroïde. Rat (coupe semi-fine après inclusion en résine, coloration bleu de méthylène-azur, X 200).

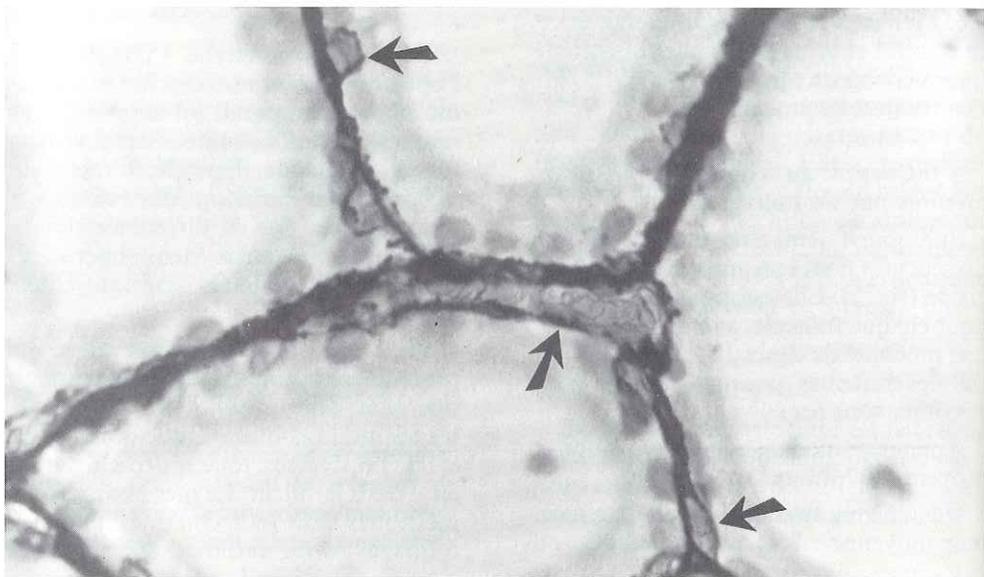


Fig. 2 : Thyroïde. Rat (imprégnation argentique, X400) : membrane basale (flèches).

à son niveau de pratique de la lecture histologique. Moins ce niveau est élevé, plus les techniques histologiques doivent permettre un repérage facile des constituants à mesurer. Dans l'exemple de notre étude nous avons volontairement choisi des coupes histologiques colorées à l'hémalum-éosine sur lesquelles il est parfois difficile de distinguer avec précision la limite externe des follicules thyroïdiens. Dans la détermination de cette limite une confusion avec l'interstitium conjonctif et surtout les capillaires sanguins au contact des follicules [2, 4] peut expliquer, pour partie, les différences de résultats observées entre opérateurs. Une visualisation de la membrane basale par imprégnation argentique est à préconiser pour réduire la variabilité imputable à ce défaut de précision dans l'identification du contour folliculaire [4].

Le choix des éléments soumis à la mesure, à l'initiative de l'opérateur, n'induit quant à lui aucune différence significative. Ce résultat était bien sûr prévisible dès lors qu'une étude statistique préalable fixe le nombre de mesures à effectuer en fonction de l'intervalle de confiance choisi et du pourcentage d'erreur admis. Cela nous permet néanmoins d'insister sur la nécessité impérieuse d'entreprendre les mesures morphométriques sur des échantillons de dimension représentative.

Enfin pour ce qui est de l'influence de la méthode histomorphométrique sur les résultats, nous n'avons pas observé de différence significative entre l'analyse d'image semi-automatique et la technique du comptage des points dans l'estimation du pourcentage épithélial.

TABLEAU I

COMPARAISON DE DEUX MÉTHODES MORPHOMÉTRIQUES DANS L'ESTIMATION DU POURCENTAGE ÉPITHÉLIAL

Méthode A : Morphométrie semi-automatique

Méthode B : Comptage des points (point counting)

Résultats en pour cent

Numéro d'identification des animaux	Méthode A	Méthode B
1	50,10	48,50
2	49,57	51,63
3	68,30	70,22
4	64,34	66,27
5	53,33	60,59
6	57,98	62,35

Ces résultats sont concordants avec les travaux de méthodologie générale en morphométrie de GUNDERSEN [11].

La technique du comptage des points est facile de réalisation et ses résultats sont fiables dès lors que la conception de la grille test est correcte. Elle demande, dans le cas de la thyroïde, pratiquement autant de temps que la morphométrie semi-automatique mais elle est beaucoup moins onéreuse en équipements préalables (morphomètre).

En raison de ces avantages (facilité de réalisation, coût), la technique du comptage des points est à préconiser quand il s'agit seulement d'apprécier les variations relatives des proportions des différents constituants tissulaires de la glande thyroïde (fractions volumiques).

Il paraît logique, dès lors, que la plupart des études histomorphométriques publiées, concernant la glande thyroïde, aient recours à cette technique. Cependant, la technique du comptage des points n'est pas en mesure de fournir directement des valeurs absolues quant aux dimensions des constituants tissulaires (hauteur, diamètre, surface...).

L'analyse d'images semi-automatique apparaît donc complémentaire de la technique du comptage des points lorsqu'il y a lieu d'obtenir des données précises sur les dimensions des constituants tissulaires.

Remerciements :

Nous tenons à remercier pour leur contribution technique à ce travail Mesdames C. CASTAINGTS & M. AMARDEILH (ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE).

BIBLIOGRAPHIE

1. CAPEN C.C., MARTIN S.L. : The effects of xenobiotics on the structure and function of the thyroid follicular and C-cells. *Toxicologic Pathology*, 1989, 17 (2) : 266-293.
2. DELVERDIER M., CABANIE P., ENJALBERT F., PLAISANCIE P., VAN HAVERBEKE (G.) : Histomorphometric study of the morphological variations of thyroid follicles in the rat with respect to age and sex. *Journal of Veterinary Medicine, Series C, Anatomia, Histologia, Embryologia* (accepted, in Press).
3. DELVERDIER M., CABANIE P., ROOME N., ENJALBERT F., PLAISANCIE P., VAN HAVERBEKE G. : Quantitative evaluation by immunocytochemistry of the age-related variations in thyroid C-cells in the rat. *Acta anatomica*, 1990, 138:182-184.
4. DELVERDIER M., CABANIE P., ROOME N., ENJALBERT F., VAN HAVERBEKE G. : Quantitative histology of rat thyroid : influence of histological techniques on morphometric data. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* (accepted, in Press).
5. DENEFF J.F., CORDIER A.C., MESQUITA M., HAUMONT S. : The influence of fixation procedure embedding medium and section thickness on morphometric data in thyroid gland. *Histochemistry*, 1979,63 : 163-171.

6. STRINGER B.M.J., WYNFORD-THOMAS D., WILLIAMS E.D. : Physical randomization of tissue architecture : an alternative to systematic sampling. *J. microsc.*, 1982, 126 (2) : 179-182.
7. GANTER P., JOLLES G. : *Histo-chimie normale et pathologique*, vol. 2, Gauthier-Villard éd., Paris 1969, 1426-1427.
8. LOW O. : Studies on quantitative morphology. VI. Morphometry of colloid and epithelium in the thyroid gland. *Exp. Pathol.*, 1982, 22 : 43-58.
9. WEIBEL E.R. ; KISTLER G.S. ; SCHERLE W.F. : Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biol.*, 1966, 30 : 23-38.
10. CABANIE P., DELVERDIER M. : Principes généraux de morphométrie. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 1989, 2, 1 : 5-11.
11. GUNDERSEN H.J.G., BOYSEN M., REITH A. : Comparison of semi automatic digitizer table and simple point counting. *Virchow's Arch. B Cell Pathol.*, 1981, 37 : 317-325.

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA DISTRIBUTION TISSULAIRE D'UN COMPOSÉ ET DE SES MÉTABOLITES PAR AUTORADIOGRAPHIE

*DURAND Alain. Laboratoire de Pharmacocinétique Animale.
SYNTHÉLABO RECHERCHE (L.E.R.S.), 58 rue de la Glacière 75013 PARIS*

INTRODUCTION

Avant d'être administré à l'homme, tout nouveau composé doit être étudié chez l'animal de laboratoire afin de préciser, outre son profil d'activité pharmacologique et son index de sécurité, les processus réglant son devenir dans l'organisme c'est-à-dire, son absorption, sa distribution tissulaire, son métabolisme et finalement son élimination. Cette connaissance de la pharmacocinétique et du métabolisme du nouveau composé est obtenue grâce à la réalisation d'expériences mettant en œuvre des moyens techniques très variés (analyses chromatographiques, analyses radiochimiques, spectrométrie de masse, etc...).

L'autoradiographie de l'animal entier constitue une technique de choix permettant, en fonction des protocoles expérimentaux retenus, d'obtenir de nombreu-

ses informations sur les différentes étapes du devenir de la substance testée.

L'objet de cet article est donc de présenter de façon schématique l'aspect pratique de cette technique et de souligner quelques uns des éléments à prendre en considération pour une interprétation correcte des résultats obtenus.

PRÉSENTATION DE LA TECHNIQUE

On administre à l'animal de laboratoire (souris, rat ou même singe écureuil) un composé marqué à l'aide d'un isotope radioactif. A un temps déterminé, après ce traitement, l'animal est anesthésié, à l'éther diéthylique par exemple, puis sacrifié par immersion dans un liquide

refroidi à -80°C amenant la mort instantanée de l'animal et minimisant les phénomènes de diffusion tissulaire du composé marqué ou de ses métabolites. Après stabilisation de la température de l'animal à -20°C et préparation (rasage, immersion dans de la carboxyméthylcellulose à 3 % et congélation à -20°C de façon à obtenir un bloc), des coupes sagittales de 20 à 40 μm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome placé dans un cryostat. Ces coupes sont prélevées sur un support adhésif (« scotch magique ») puis conservées dans une enceinte à -20°C jusqu'à déshydratation complète obtenue en quatre jours. Elles sont ensuite mises en contact, à -20°C , avec un film photographique sensible aux rayonnements ionisants. Après un délai d'exposition convenable, les films sont traités selon les techniques photographiques usuelles (révélation, fixation). On obtient alors une image de la coupe exposée où les zones contenant la radioactivité apparaissent en gris plus ou moins foncé en fonction de leur marquage. Il s'agit donc d'une technique essentiellement qualitative ou semi-quantitative, mais qui peut, moyennant quelques précautions, être exploitée au niveau quantitatif.

QUELQUES ÉLÉMENTS A PRENDRE EN CONSIDÉRATION

Composé.

Le choix de l'isotope radioactif et de la position de marquage sont fonction de critères pouvant être contradictoires :

- un isotope de faible énergie donnera une meilleure résolution,
- un isotope de forte énergie sera détecté plus facilement,

- la demi-vie de désintégration de l'isotope doit être assez longue,

- la synthèse radiochimique doit se faire à moindre risque et à moindre coût.

Pour ces différentes raisons en pharmacocinétique et métabolisme on utilise le plus couramment des molécules marquées au carbone 14 et plus rarement des molécules tritiées ou marquées au soufre 35 ou à l'iode 125.

Par ailleurs, la position de marquage doit tenir compte des risques de dégradation et/ou de métabolisme de la molécule.

Protocole expérimental

Il sera fonction bien entendu des questions auxquelles on désire répondre :

- choix de la dose pondérale : pharmacologique ou toxicologique ?
- choix de la voie d'administration : iv, po, ip, im, etc... ?
- choix du nombre d'administrations : unique ou répétées ?
- choix du ou des temps de sacrifice,
- choix des niveaux de coupes etc...

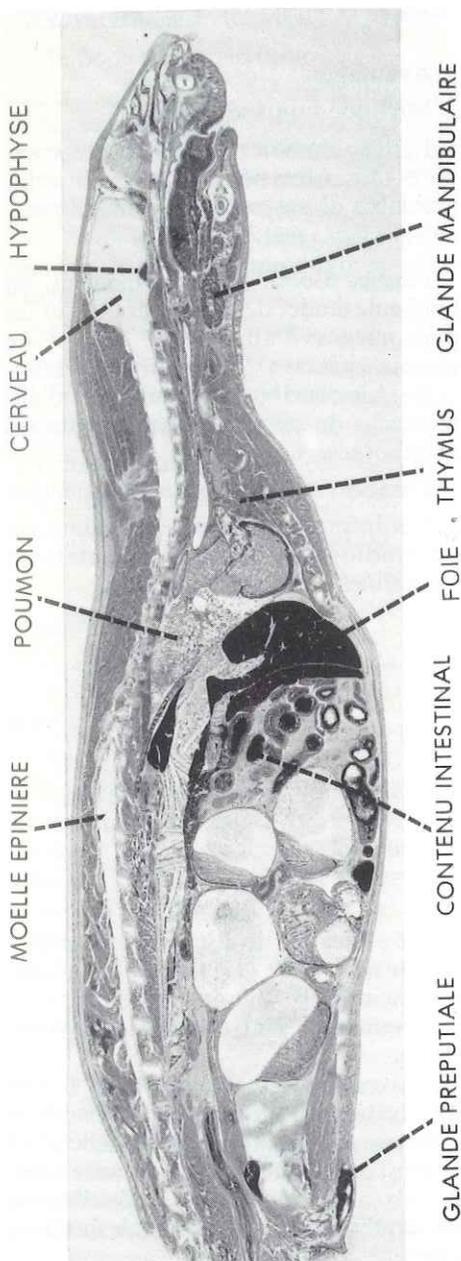
Conditions expérimentales

Durée d'exposition

Plusieurs problèmes sont à considérer :

- Objectif de l'analyse : si l'on souhaite effectuer une analyse densitométrique des autoradiogrammes il faut éviter une exposition trop prolongée qui entraînerait une saturation de l'émulsion photographique au niveau des zones fortement radioactives.

- Quantité de radioactivité administrée.



- Caractéristiques pharmacocinétiques du composé étudié et de ses métabolites.
- Temps de sacrifice.
- Type d'émulsion utilisé.

A titre d'exemple, après administration chez le rat de $3,7 \text{ MBq.kg}^{-1}$ d'un composé marqué au carbone 14 et dont la demi-vie d'élimination de la radioactivité (composé inchangé + métabolites) est comprise entre 1 et 10 heures, la durée d'exposition d'une coupe de $30 \mu\text{m}$ d'épaisseur avec un film sensible aux rayons β^- sera comprise entre 1 et 3 semaines suivant les temps de sacrifice (de 5 minutes à 72 heures).

Choix du film

Il est préférable d'utiliser des films pour lesquels la coloration du fond (bruit de fond) sera aussi claire que possible : film monocouche, support incolore.

ex : Hyperfilm- β max (AMERSHAM) pour la détection du 14 C.

Hyperfilm-3H (AMERSHAM) pour la détection du tritium.

Fig. 1 : Exemple de distribution tissulaire chez le rat femelle (17^e jour de gestation), 0,5 heure après administration par voie intraveineuse d'un composé antihistaminique.

Au niveau maternel on note l'absence de pénétration cérébrale de la radioactivité contrastant avec la distribution relativement homogène dans le reste de l'organisme. Au niveau des embryons on observe le marquage relativement intense des placentas alors que les fœtus sont plus faiblement marqués que l'organisme maternel.

ÉVALUATION DE LA MÉTHODE

Avantages

Méthode non spécifique

Permet d'étudier n'importe quel composé sans nécessiter de mise au point préalable d'une technique analytique.

Richesse de l'information

Permet d'obtenir simultanément, en une seule étude, des informations sur les phénomènes d'absorption, d'effet de premier passage (et donc de métabolisme), de distribution tissulaire et d'élimination du composé étudié et de ses métabolites.

Caractère médiatique de l'information

Les informations contenues dans un autoradiogramme sont directement accessibles et compréhensibles.

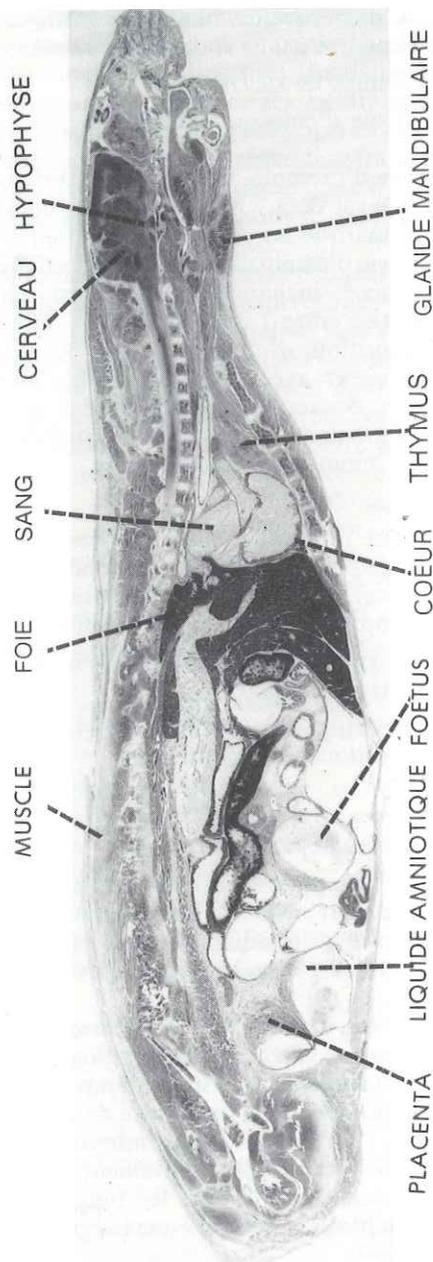


Fig. 2 : Exemple de distribution tissulaire chez le rat femelle (17^e jour de gestation), 0,25 heure après administration par voie intraveineuse d'un composé psychotrope.

Au niveau maternel on note la bonne pénétration cérébrale de la radioactivité avec une distribution différentielle entre la substance blanche et la substance grise. Au niveau des embryons la distribution de la radioactivité est plus faible que dans l'organisme maternel.

Inconvénients

Méthode non spécifique

Cette méthode repose sur la détection de la radioactivité sans pouvoir reconnaître des molécules de structures différentes comportant l'atome radioactif. Ainsi, cette méthode ne permet pas de reconnaître un composé des métabolites radioactifs qui en résultent après administration chez l'animal.

Méthode « radioactive »

Cette méthode nécessite d'utiliser une molécule marquée ce qui impose de nombreuses contraintes :

- installations appropriées,
- autorisations administratives,
- précautions de manipulation.

Coût

La synthèse d'une molécule marquée est très coûteuse (100 à 200 KF) de même que le matériel utilisé.

Délai

La technique est assez longue à mettre en œuvre et il faut prévoir environ 6 semaines entre le traitement des animaux avec le composé marqué et l'obtention d'un autoradiogramme.

CONCLUSION

Malgré tous les inconvénients évoqués ci-dessus, l'autoradiographie de l'animal entier reste une technique extrêmement intéressante qui constitue une source d'informations irremplaçables sur la pharmacocinétique et le métabolisme d'un composé. A ce titre il s'agit d'une

étude pivot permettant d'évaluer le devenir du médicament dans l'organisme avant son administration à l'homme.

RÉFÉRENCES

- WADDELL W.J. ET MARLOWE C. in Drug Fate and Metabolism, volume 1. ; Marcel Dekker, New York (1977).
- ULLBERG S. : Acta Radiol. (Stockholm), Suppl. 118 : 1 (1954).
- WADDELL W.J. et BRINKHOUS W.K. : J. Biol. Photogr. Ass. 35 : 147 (1967).

LOCALISATION ULTRASTRUCTURALE DE LA CHITINE DANS LA PAROI FONGIQUE PAR LE COMPLEXE WHEAT GERM AGGLUTININ-OR COLLOÏDAL

C. SAIDALI-SAVY et R. DARGENT

*Laboratoire de Cryptogamie - Université Paul Sabatier
118, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE CEDEX*

INTRODUCTION

La chitine est, après la cellulose, le polysaccharide le plus répandu dans la nature. Si dans le règne animal, la chitine est un élément structural des téguments de certains invertébrés (Insectes, Crustacés,...) dans le règne végétal, elle n'est trouvée que dans les parois de certaines algues et de la plupart des champignons. L'abondance et la diversité structurale et chimique des différents composés polysaccharidiques posent des problèmes pour leur identification. Il n'existe pas, en effet, de méthode de mise en évidence au sens strict des polysaccharides, c'est-à-dire qui révélerait les polymères d'oses, mais des techniques qui rendent visibles sur les préparations certaines fonctions chimiques portées par ces oses en particulier les fonctions

hydroxyles. A titre d'exemple, les groupements vic-glycols peuvent être détectés spécifiquement par oxydation périodique (1). Cette méthode a toutefois ses limites. Une réaction positive ne permet pas de conclure à la présence obligatoire d'un polysaccharide. Par ailleurs, la chitine réagit négativement au test de Thiery.

Parmi les méthodes d'affinité, l'utilisation des lectines couplées à l'or colloïdal s'est révélée d'un grand intérêt dans la détection des constituants polysaccharidiques pariétaux des levures comme des champignons filamenteux (2, 3).

Il nous a, par conséquent, semblé intéressant de détecter les sites récepteurs de la WGA chez diverses espèces de champignons appartenant à des groupes taxonomiques différents et caractérisés par une paroi renfermant de la chitine.

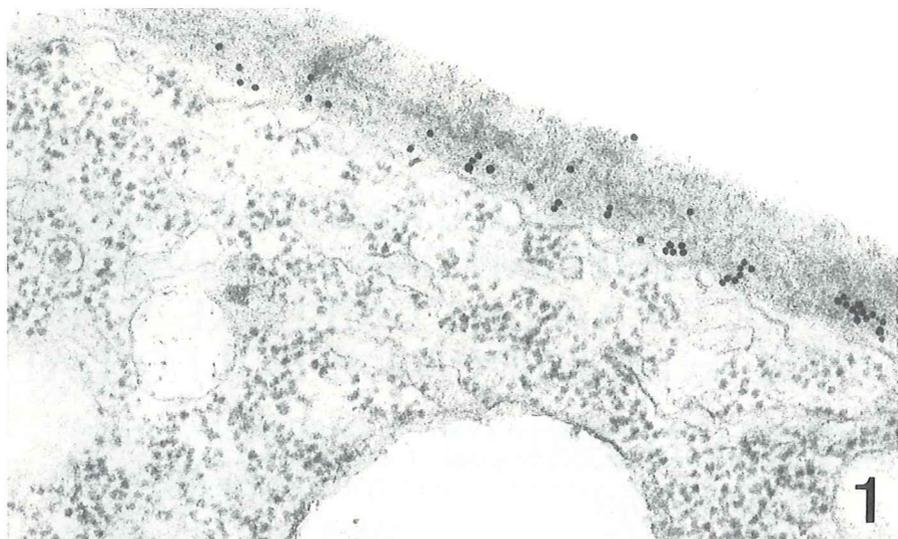


Fig. 1 - Coupe longitudinale d'une hyphe de *Mucor mucedo*. Marquage régulier au niveau de la couche interne de la paroi. (x 74 000).

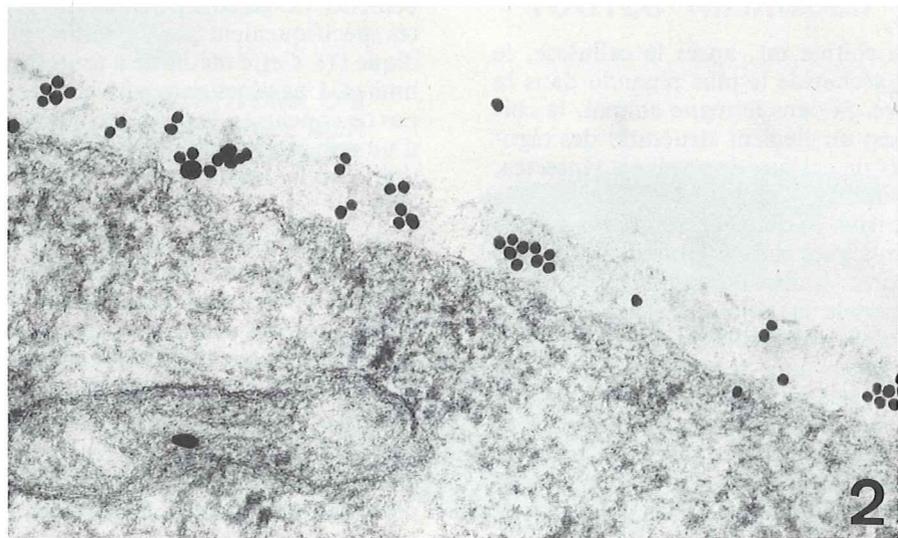


Fig. 2 - Hyphe d'*Hypomyces chlorinus*. (x 110 000).

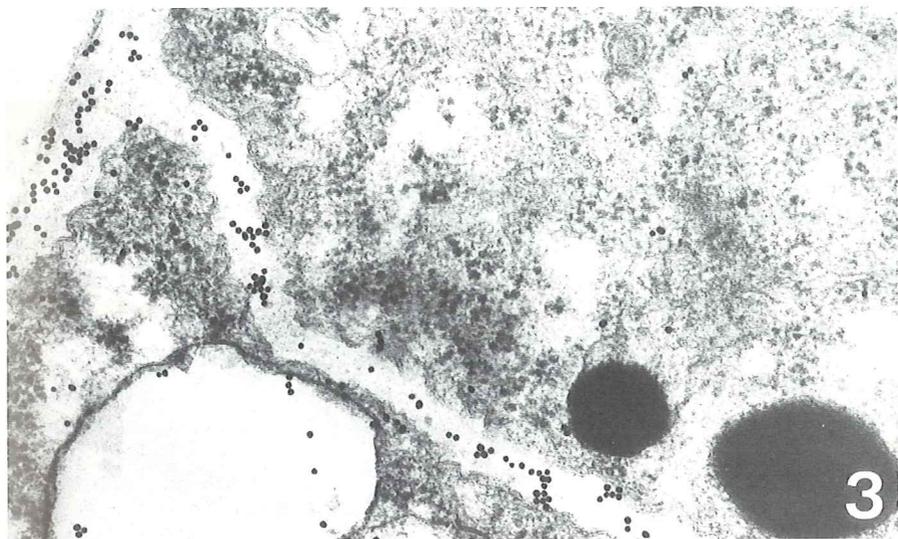


Fig. 3 - Paroi et septum d'*Hypomyces chlorinus* fortement marqués. (x 60 000).

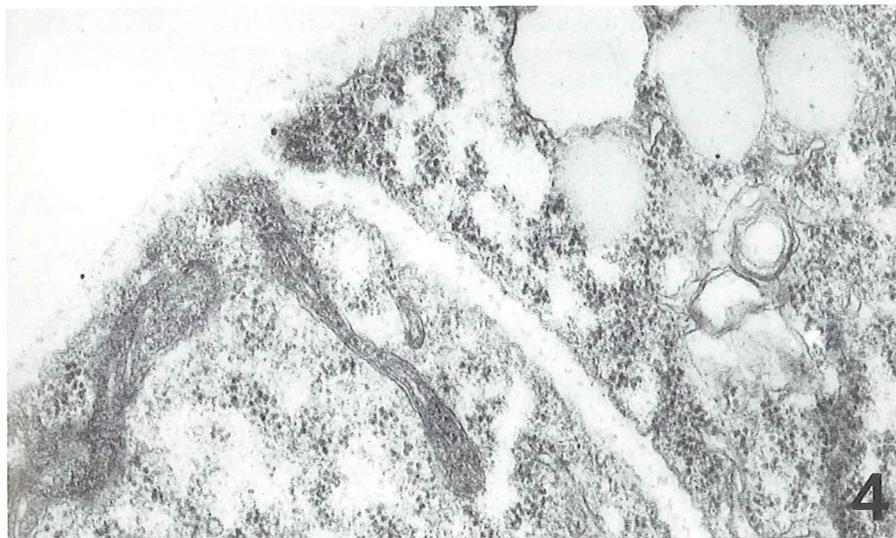
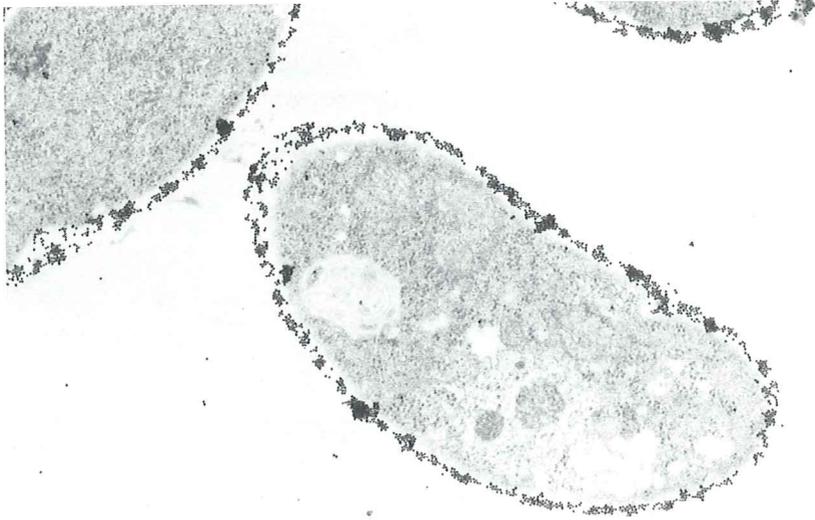


Fig. 4 - Témoin. A comparer avec la figure 3. (x 42 000).



5

Fig. 5 - Hyphe de *Scopulariopsis brevicaulis*. (x 20 000).



6

Fig. 6 - Hyphe de *Boletus edulis*. (x 20 000).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1 - Organismes utilisés

- Mucor mucedo* Linné Zygomycètes ;
- Hypomyces chlorinus* Tulasne Ascomycètes ;
- Scopulariopsis brevicaulis* Bainier Deutéromycètes ;
- Boletus edulis* Fr. ex Bull Badidiomycètes.

2 - Préparation du matériel biologique

Les colonies fongiques âgées au maximum de 48 heures sont plongées, très rapidement dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M, pH 7,2 durant 1 heure à 4°C. Après plusieurs bains de lavage les échantillons sont post fixés avec le tétroxyde d'osmium à 1 % durant 4 heures à 4°C, puis deshydratés et enfin inclus dans des résines Epoxy (Epon 812 ou Spurr). Les coupes sont montées sur des grilles en or ou en nickel recouverte d'un film de parlodion-carbone.

3 - Préparation de l'or colloïdal

Les particules d'or colloïdal ont un diamètre de 17 nm (4).

A 0,1 g HAuCl_4 dans un litre d'eau tridistillée, agitée vigoureusement à l'agitateur magnétique et portée à ébullition, nous ajoutons 25 ml de citrate de sodium (trisodique) à 1 %.

L'ébullition reprend et le liquide jaune clair devient peu à peu orangé rouge. L'or ainsi préparé a un pH de 5,5. Ce pH peut être remonté par addition de CO_3K_2 0,2 M.

4 - Préparation du complexe WGA-AU₁₇

La WGA (I.B.F.) est conjuguée à la suspension d'or colloïdal suivant Roberts et coll. (5) de la façon suivante :

- 10 ml Au_{17} ramené à pH 9,7 avec CO_3K_2
- 0,5 ml WGA (2,5 mg/ml dissoute dans HCl 2,5 mM)
- 0,22 ml P.E.G. à 1 %
- attendre quelques minutes
- complexe centrifugé à 16 000 g durant 10 minutes
- laver culot dans tampon Tris et remettre en suspension dans 5 ml de tampon : Tris HCl pH 7,0 20 mM
- 0,04 % P.E.G.
- 0,02 % Azide de sodium

5 - Marquage cytochimique des coupes

- Les incubations sont faites à la température du laboratoire
- rinçage dans du P.B.S. (0,05 M, Ph 7,0) durant 5 minutes
 - incubation dans le complexe Au_{17} -WGA, 20 minutes à 2 heures
 - lavage très soigné dans du P.B.S. puis dans de l'eau distillée
 - coloration uranyl acétate/citrate de plomb.

6 - Témoins

Pour démontrer la spécificité du marquage, plusieurs témoins sont réalisés.

a - incubation des coupes avec le complexe WGA-or colloïdal préalablement neutralisé avec le N-N'-N'' triacetylchitotriose (2 mM).

b - incubation des coupes avec le complexe albumine-or à la place du complexe lectine-or.

c - incubation des coupes avec l'or colloïdal seul.

RÉSULTATS

Les figures 1 à 6 résument les résultats obtenus. Dans tous les cas, nous constatons que plus de 90 % des grains sont détectés au niveau de la paroi (*Mucor mucedo*, *Hypomyces chlorinus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Boletus edulis*) ainsi qu'au niveau des septa pour les espèces septées (Fig. 3).

Aucun marquage n'est observé d'une façon significative au niveau cytoplasmique et dans le milieu extérieur. Les témoins confirment la spécificité du marquage (Fig. 4).

CONCLUSION

Les résultats obtenus chez différents champignons filamenteux montrent que le complexe WGA-or colloïdal permet de localiser la chitine ou son monomère la n-acétyl glucosamine, au niveau ultrastructural.

Cependant, il faut signaler que les conditions adéquates qui permettent en même temps une conservation des structures et une forte accessibilité aux sites récepteurs doivent être définis pour chaque cas.

Chez les champignons, à l'inverse des tissus animaux, la liaison lectine - site récepteur n'est pas perturbée après double fixation glutaraldéhyde-tétroxyde d'osmium et inclusion dans les résines Epoxy.

En conclusion, la méthode de coloration à l'or-colloïdal peut être considérée comme une approche simple et efficace pour la détection des polysaccharides.

RÉFÉRENCES

1. THIERY, J.P. : Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.* 1967, 6, 987-1018.
2. ROTH, J. : Application of lectin-gold complexes for electron microscopic localization of glycoconjugates on thin section. *J. Histochem. Cytochem.* 1983, 31, 987-999.
3. BENHAMOU N. : Preparation and application of Lectin-Gold complexes dans : *Colloidal Gold : Principles, Methods and Application*, vol. 1, Academic Press, 1989.
4. GEOGHEGAN, W.D. et ACKERMAN, G.A. : Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid, and anti-immunoglobulins to colloidal gold for the indirect detection of concanavalin A, wheat germ agglutinin, and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level. A new method, theory and application *J. Histochem. Cytochem.* 1977, 25, 1187-1200.
5. ROBERTS, R.L., BOWERS, B., SLATER, M.L. et CABIB E. : Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 1983, 3, 922-930.

COLORATIONS TOPOGRAPHIQUES ET SIGNALÉTIQUES ASSOCIÉES

Colorations tétrachromiques à base de fuchsine basique

G. SIOU et M. GUFFROY

Laboratoire d'Histopathologie CERTI - 59 avenue de Paris - 78000 VERSAILLES

Il est possible d'associer sur une même préparation une coloration topographique trichromique à une coloration signalétique de certains types cellulaires ou de certains produits de sécrétion. Outre l'agrément de lecture que présentent les préparations ainsi réalisées, elles fournissent des renseignements généralement obtenus par deux colorations différentes et permettent ainsi un gain de temps dans l'examen des préparations. Ces associations offrent l'avantage de pouvoir effectuer sur la même préparation un diagnostic histopathologique et une évaluation fonctionnelle de certaines structures (grains de sécrétion, cellules mucipares...).

Ces méthodes ne sauraient évidemment remplacer les techniques histo-chimiques, immunohisto-chimiques et auto-historadiographiques, techniques beaucoup plus fines et sélectives.

Deux colorations signalétiques, associées au trichrome de Masson, peuvent facilement être mises en œuvre :

- la coloration par la fuchsine-paraldéhyde,
- la réaction à l'acide periodique Schiff (P.A.S.).

Il s'agit de deux colorations à base de fuchsine basique qui, bien que ne présentant aucune spécificité chimique, permettent toutefois la mise en évidence de certaines structures histologiques. Nous y avons recours systématiquement pour quelques organes (poumons, aorte, peau, pancréas) et pour confirmation de certains diagnostics (pigments chromolipoides).

Après avoir rapidement rappelé l'intérêt de la coloration par la fuchsine-

paraldéhyde et de la réaction au P.A.S. en histopathologie, nous fournirons certaines précisions techniques concernant leur association avec le trichrome de Masson. Ces colorations tétrachromiques représentent des méthodes simples, facilement automatisables, capables de fournir des renseignements intéressants en toxicologie expérimentale. Nous les utilisons sur des prélèvements d'organes fixés au liquide de Bouin et inclus en paraffine.

Le point essentiel pour la réussite de ces colorations est de disposer, pour la préparation de la fuchsine-paraldéhyde et du réactif de Schiff, d'un bon échantillon de fuchsine basique. Le chlorhydrate de pararosaniline, actuellement disponible (Sigma, CI 42500), nous donne entière satisfaction.

INTÉRÊT DES COLORATIONS SIGNALÉTIQUES UTILISÉES

La coloration à la fuchsine-paraldéhyde, mise au point par GOMORI pour la coloration des fibres élastiques, colore aussi les glycoprotéines, la kératine et les mucosubstances sulfatées (acides). Elle permet donc de mettre en évidence, outre les fibres élastiques, les produits de sécrétion de certaines cellules : cellules B des îlots de Langerhans, cellules principales des glandes fundiques gastriques, cellules thyroïdiques (TSH) de l'hypophyse, mastocytes.

La fuchsine-paraldéhyde réagit avec deux groupements :

- les sulfates (par lien électrostatique),
- les aldéhydes (par addition non polaire).

Nous avons systématiquement recours à la coloration par la fuchsine-paraldéhyde pour les organes suivants :

- poumons, aorte et peau : fibres élastiques

- pancréas : cellules B des îlots de Langerhans.

D'autres organes peuvent bénéficier de la mise en évidence des fibres élastiques (vaisseaux) et des mastocytes (peau, ganglions lymphatiques). Par ailleurs, les cellules mucipares de l'épithélium trachéo-bronchique sont aussi colorées par la fuchsine-paraldéhyde.

La réaction au P.A.S. (acide periodique Schiff), mise au point par Hotchkiss et Mc Manus-Lillie comporte :

- une oxydation des groupes glycols en aldéhydes par l'acide periodique,

- une détection des aldéhydes par le réactif de Schiff.

La réaction au P.A.S. est une méthode de détection non sélective de certains polysaccharides et permet la mise en évidence :

- du glycogène,
- des substances hyalines et amyloïdes,
- des substances mucipares (acides et neutres),
- des glycoprotéines de certaines cellules hypophysaires (FSH, LH, TSH).

Nous utilisons la réaction au P.A.S. pour l'examen des cellules mucipares gastro-intestinales et trachéo-bronchiques.

La réaction au P.A.S. colore les pigments chromolipoides (céroïdes et lipofuscines). Dans ce cas, nous l'utilisons uniquement comme élément de vérification d'un diagnostic histologique. Au

niveau du rein, outre la coloration des bordures en brosse et des membranes basales, la réaction au P.A.S. colore, dans les tubes proximaux, des grains correspondant à la résorption par endocytose de protéines ayant filtré dans les glomérules ; les cylindres hyalins tubulaires sont aussi colorés.

La propriété du P.A.S. de révéler les mucosubstances neutres et acides lui permet de colorer l'ensemble des cellules mucipares du tractus digestif. La fuchsine-paraldéhyde ne colorant que les mucosubstances acides, ne permet de visualiser que les cellules mucipares de certaines régions, notamment chez le Chien les cellules fundiques (col) et les cellules du côlon. Le cartilage bronchique se colore aussi bien par le P.A.S. que par la fuchsine paraldéhyde.

PRATIQUE DES COLORATIONS TÉTRACHROMIQUES

Nous associons chacune des deux colorations signalétiques à la technique trichromique de Masson (trioxyhématéine ferrique de Hansen, fuchsine acide-ponceau de xylidine, bleu d'aniline). La coloration par la fuchsine-paraldéhyde ou par le P.A.S. est effectuée en premier ; elle est suivie par la coloration trichromique de Masson.

Préparation des solutions colorantes

La solution de **fuchsine-paraldéhyde** est préparée, suivant MOWRY et coll. (1) à partir du chlorhydrate de pararosaniline. Nous en avons précédemment rappelé la confection (2).

Le **réactif de Schiff** peut être obtenu par différents procédés. A titre indicatif, nous indiquons la préparation du

réactif de Schiff que nous utilisons : dissoudre 6 g de pararosaniline dans un litre d'eau permutée, agiter durant 24 heures (barreau magnétique), ajouter 40 g de métabisulfite de sodium, agiter durant 15 minutes, ajouter 40 ml de HCl concentré. La solution est utilisable après repos d'une nuit à l'obscurité. Le réactif doit être conservé au réfrigérateur et peut être employé pendant plusieurs mois.

La **trioxyhématéine ferrique de Hansen** est une laque préparée à chaud à partir d'un mélange d'hématoxyline, d'alun de fer et d'ammonium, et de sulfate d'ammonium (4). Il faut veiller à ne pas pousser trop loin l'oxydation de l'hématoxyline en hématéine, ce qui ferait perdre à cette dernière ses propriétés tinctoriales. La durée d'utilisation du colorant est évidemment fonction du nombre de lames colorées. Notre expérience nous a montré qu'il est possible de réaliser, sur une durée de 4 à 5 semaines, la coloration d'environ quarante portoirs de 40 lames, le temps de séjour dans le colorant étant augmenté progressivement de 5 à 20 minutes. Le colorant est gardé durant toute son utilisation dans le bac à coloration. Un voile métallique se forme régulièrement à la surface du colorant.

Les **autres solutions colorantes** du trichrome de Masson n'appellent pas de notre part de commentaires particuliers. Leur préparation figure dans tous les manuels de techniques histologiques (3, 4) et nous en mentionnerons seulement leur composition. Il s'agit de colorants très stables, pouvant être utilisés durant plusieurs mois, et que nous laissons en permanence dans les bacs à coloration.

- Fuchsine acide 0,2 g et ponceau de xylidine 0,4 g dans 600 ml d'eau permutée.

- Orangé G 10 g et acide phosphomolybdique 15 g dans 500 ml d'eau permutée.

- Bleu d'aniline 1 g et acide acétique pur 16 ml dans 600 ml d'eau permutée.

Techniques de colorations

Les colorations sont réalisées avec des appareils automatiques à 24 bacs (Varistain Shandon), l'un programmé pour la fuchsine-paraldéhyde, l'autre pour la réaction au P.A.S. Après déparaffinage et hydratation, les lames subissent les traitements décrits ci-après.

• Fuchsine-paraldéhyde

- Alcool 70° avec 1 % d'HCl pur 3 mn
- Fuchsine-paraldéhyde 18 h
- Alcool 70° avec 1 % d'HCl pur 3 x 1 mn
- Eau permutée 1 mn
- Trichrome de Masson voir plus bas.

Il est généralement indiqué que, pour la mise en évidence des produits de sécrétion, une oxydation préalable à la coloration par la fuchsine-paraldéhyde est requise. Ce temps n'apparaît pas indispensable si le temps de coloration est suffisamment prolongé. Le temps de coloration dans la fuchsine-paraldéhyde avec une solution relativement récente (moins de trois semaines) peut être évalué à :

- 15 minutes pour les fibres élastiques,
- 2 à 3 heures pour les cellules B des îlots de Langerhans.

Moyennant un temps de coloration d'environ 18 heures, il est possible d'utiliser la même solution de fuchsine-paraldéhyde pendant plusieurs mois (la solution est gardée au réfrigérateur et utilisée

sans filtration préalable). La coloration s'effectue donc de nuit, sans agitation.

Pour alléger la charge de travail, il est possible de colorer en même temps les fibres élastiques (poumons, aorte, peau) et les cellules B des îlots de Langerhans. Aucune surcoloration ni empâtement des fibres élastiques n'est à craindre.

• Réaction au P.A.S.

- Acide periodique 10 mn
- Eau courante 10 mn
- Eau permutée 10 s
- Réactif de Schiff 20 mn
- Eau permutée 10 s
- Eau courante 10 mn
- Trichrome de Masson voir ci-après

• Coloration trichromique de Masson

Après coloration par la fuchsine-paraldéhyde ou par le P.A.S., les lames subissent le traitement suivant :

- Trioxyhématéine ferrique de Hansen 5 à 20 mn
- Eau de ville 1 mn
- Eau carbonatée 2 mn
- Eau permutée 15 s
- Fuchsine acide-ponceau de xylydine 10 mn
- Eau permutée 1 mn
- Orangé G - acide phosphomolybdique 5 mn
- Eau permutée 1 mn
- Bleu d'aniline 2 mn
- Eau permutée 1 mn
- Déshydratation (alcool et toluène) et montage entre lame et lamelle.

Dans les manuels de techniques histologiques, il est fait mention d'une eau

acétifiée à 1 % pour les différents lavages. L'eau permutée dont nous disposons (cartouches Prolabo) fournit une eau à pH légèrement acide convenant parfaitement.

RÉSULTATS OBTENUS

Fuchsine-paraldéhyde et trichrome de Masson

Mise en évidence des fibres élastiques

Les fibres élastiques sont colorées en bleu-violet par la fuchsine-paraldéhyde et se détachent très bien du collagène coloré par le bleu d'aniline.

• Poumons

Le parenchyme pulmonaire renferme des fibres élastiques au niveau des parois alvéolaires et au niveau de la plèvre. A l'état normal, les fibres élastiques alvéolaires sont à peine visibles. Elles deviennent abondantes dans certaines fibroses pulmonaires.

• Aorte (et artères)

La paroi des artères renferme des fibres élastiques en quantité plus ou moins importante. Leur examen est surtout intéressant au niveau de l'aorte pour déceler leur rupture. L'aorte est une artère de type élastique comportant une limitante élastique interne peu développée apparaissant discontinue sur des sections transversales. La média est constituée de lames élastiques concentriques anastomosées et de quelques fibres musculaires et collagènes distribuées dans de la substance amorphe.

Tandis que dans l'aorte (Chien), les fibres élastiques présentent un aspect discontinu, dans les grands troncs pulmonaires (Lapin), les artères présentent des

fibres élastiques continues, distribuées parallèlement entre elles.

• Peau

Le derme renferme de très fines fibres élastiques apparaissant sous forme de fragments de petites tailles.

Mise en évidence des sécrétions cytoplasmiques

• Îlots de Langerhans

Les granules des cellules B apparaissent colorés en bleu sombre, les autres cellules insulaires étant normalement colorées en rose par la fuchsine acide-ponceau de xylydine. La déplétion des cellules B en cas de diabète est facilement objectivable. L'appréciation de la fréquence des cellules B, visualisables par leur granulation, est basée sur l'ensemble des îlots présents sur la section du parenchyme examiné. Cette fréquence varie en fonction du niveau de coupe des îlots. On sait que la libération d'insuline est accompagnée de la dégranulation des cellules B.

Les cellules B ne sont pas disposées d'une façon identique chez les différentes espèces. Chez le Rat, les cellules B constituent la population la plus importante des îlots de Langerhans. Ces cellules sont distribuées en cordons enserrant des sinus sanguins et occupent la partie centrale des îlots. Les granulations cytoplasmiques, colorées par la fuchsine-paraldéhyde, apparaissent dans le cytoplasme particulièrement concentrées dans la partie de la cellule jouxtant les capillaires. Chez la Souris, la proportion de cellules B par rapport aux autres cellules apparaît plus importante que chez le Rat. Chez le Chien, il existe de nombreux îlots de Langerhans de formes et de tailles irrégulières. Les cellules B apparaissent surtout concentrées à la périphé-

rie. Chez le Singe, les cellules B se trouvent aussi groupées à la périphérie des îlots.

• Mastocytes

Des mastocytes, caractérisés par la granulation bleue de leur cytoplasme, peuvent être observés dans le derme cutané ainsi que dans les ganglions lymphatiques. Leur nombre et l'importance de leur granulation peuvent être modifiés lors de certains états physiopathologiques (inflammation, réactions allergiques, etc.).

• Cellules mucipares

Bien que leur mise en évidence soit surtout pratiquée par le réactif de Schiff, les cellules mucipares de l'épithélium trachéo-bronchique et celles de certaines régions gastro-intestinales (glandes fundiques gastriques et côlon) peuvent être visualisées par la fuchsine-paraldéhyde.

Réaction au P.A.S. et trichrome de Masson

Mise en évidence des cellules mucipares

Le mucus est coloré en rouge généralement intense.

• Tractus digestif

Bien que le réactif de Schiff colore l'ensemble des cellules mucipares, l'intensité de la coloration n'est pas identique pour les cellules des différents niveaux du tube digestif. Chez le Chien, par exemple, les cellules de la muqueuse pylorique profonde et celles de la muqueuse fundique apparaissent moins intensément colorées que les cellules de la paroi pylorique ou les cellules à pôle muqueux ouvert de l'intestin.

Il est possible d'apprécier une augmentation de la quantité de mucus accolé à la surface de l'épithélium glandulaire ou une prolifération des cellules mucipares.

• Tractus respiratoire

Les cellules mucipares sont observées au niveau des fosses nasales, de la trachée et des grosses bronches. Une irritation de l'épithélium peut provoquer un encombrement muqueux des choanes des fosses nasales et des lumières trachéo-bronchiques.

Mise en évidence des pigments chromolipoïdes

Les pigments chromolipoïdes sont des pigments intracellulaires constitués de protéines et de lipides (triglycérides, cholestérines, etc.) renfermant des acides gras polyinsaturés. Les pigments chromolipoïdes (céroïdes et lipofuscines) traduisent une peroxydation des lipides, les lipofuscines étant souvent considérées comme des pigments d'usure. On peut en observer au niveau de la zone réticulée cortico-surrénalienne, au niveau des cellules de Leydig, des neurones, etc. Certaines substances médicamenteuses (chloroquine, amiodarone, érythromycine, gentamicine, etc.) peuvent être responsables de leur formation dans le cytoplasme de certaines cellules.

D'autres méthodes que celles utilisant la fuchsine-paraldéhyde ou le réactif de Schiff peuvent être employées pour la mise en évidence des fibres élastiques, des cellules B des îlots de Langerhans et des cellules mucipares. Pour mémoire citons :

- pour les fibres élastiques, l'orcéine, la résorcine-fuchsine basique de Weigert, l'hématéine de Verhoeff ;

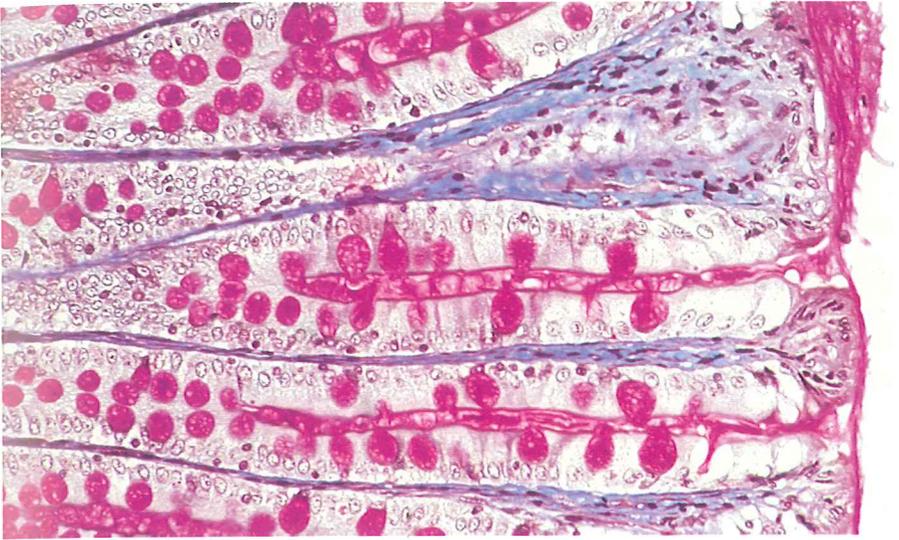


Fig. 1 : Côlon - Chien P.A.S./Trichrome de Masson

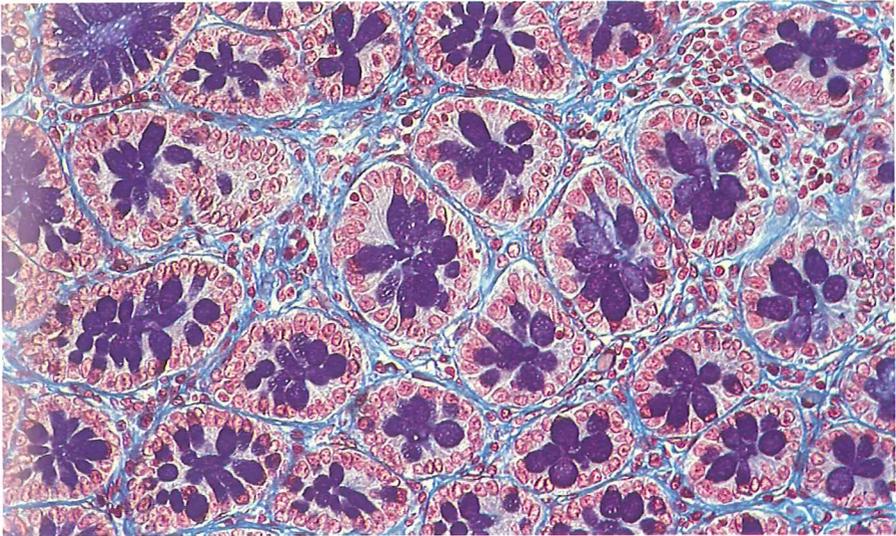


Fig. 2 : Côlon - Rat Fuchsine-paraldéhyde/Trichrome de Masson

- pour les cellules B des îlots de Langerhans, l'hématoxyline chromique, la thionine-paraldéhyde ;

- pour les cellules mucipares, le bleu alcian.

Nous pensons que, pour un laboratoire, les meilleures techniques sont celles dont il possède la maîtrise par une utilisation en routine. Il y a donc intérêt à ne pas multiplier les techniques de coloration.

RÉFÉRENCES

1. MOWRY R.W., LONGLEY J.B. et EMMEL V.M. : Only aldehyde fuchsin made from pararosanilin stains pancreatic B cell granules and elastic fibers in unoxidized microsections : problems caused by mislabelling of certain basic fuchsins. Stain Technology, 1980, 55, 91-103.
2. SIOU G. et DIAZ J. : Coloration tétrachromique pour l'examen du pancréas endocrine. Rev. Fr. Histotechnol., 1989, 2, n° 1, 39-43.
3. MARTOJA R. et MARTOJA M. : Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson Edit., Paris 1967, un vol., 345 pages.
4. GABE M. : Techniques histologiques. Masson Edit., Paris 1968, un vol., 1113 pages.

ÉTUDE CINÉTIQUE DU MYÉLOME TECHNIQUE DE DOUBLE MARQUAGE

M. RADAL, E. URSULE, R. LAVAILL, N. LEQUEUX

Laboratoire des Technologies Nouvelles - Centre Val d'Aurelle - 34094 MONTPELLIER

Introduction

L'étude cinétique des myélomes est réalisée par la technique du double marquage visualisant les plasmocytes sécrétants en phase proliférative.

Principe

Réalisation sur une même préparation de deux immunomarquages avec deux anticorps monoclonaux de spécificité différente :

- Ki67 (Dako) qui marque les cellules en cycle (phases G1 - S - G2 - M).
- Kappa ou Lambda (Amersham) qui met en évidence les chaînes légères des immunoglobulines des plasmocytes sécrétants.

Matériel et méthode

A partir d'un prélèvement de moelle osseuse, les cellules sont extraites par gradient de densité (Ficoll) puis étalées à l'aide d'une cytocentrifugeuse (environ 40 000 cellules par lame). Les lames sont

ensuite fixées dans un mélange Alcool/ Acétone (v/v) à 4°C pendant 10 minutes puis conservées à -20°C.

Technique

Un immunomarquage révélé par la peroxydase est suivi d'une technique révélée par la phosphatase alcaline.

BIOTINE-STREPTAVIDINE- PEROXYDASE

- Réhydratation TRIS pH 7,2*
- Blocage des peroxydases endogènes H2O2 à 1,5 %
- Rinçage TRIS
- AcM primaire Ki67 utilisé au 1/25 - 40 minutes
- anti-souris biotynilé (Amersham) 1/25 - 30 mn
- Rinçage TRIS + lait*
- Complexe Streptavidine-Peroxydase au 1/100 - 30 mn
- Révélation Amino-Ethyl-Carbazole 20 mn*
- bain d'eau distillée.



Figure 1 : 1 plasmocyte proliférant - 1 plasmocyte non proliférant

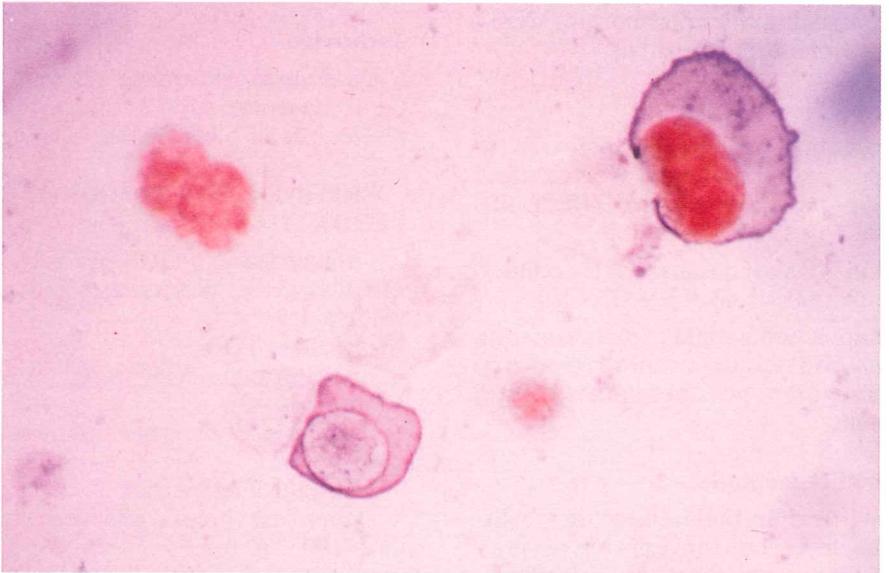


Figure 2 : 1 plasmocyte proliférant - 1 plasmocyte non proliférant - 1 cellule proliférante non plasmocytaire.

PHOSPHATASE-ALCALINE

- TRIS pH 7,5
- AcM Kappa ou Lambda (Amersham) 40 minutes
- Rinçage TRIS + lait
- Anti-souris (Dako) au 1/15 - 30 mn
- Rinçage TRIS + lait
- Complexe Alcaline-Phosphate anti Alcaline-Phosphatase au 1/15 pendant 30 mn
- Révélation Naphthol ASMX Fast Blue B - 20 mn*
- Bain d'eau distillée
- Pas de contre coloration
- Montage au glycergel.

Résultats

Coloration nucléaire en rouge (peroxydase) du Ki67.

Coloration cytoplasmique violette (phosphatase) du Kappa ou Lambda.

Les résultats s'expriment en pourcentage des plasmocytes proliférants par rapport à la population plasmocytaire sécrétante.

Analyse des résultats sur 31 cas de myélomes (voir tableau ci-après).

Conclusion

Cette étude montre qu'il existe une corrélation entre la cinétique du myélome et l'activité de la maladie. Il semblerait utile de tenir compte de cette information dès le diagnostic.

Cependant il est nécessaire de faire intervenir d'autres paramètres, car ce seul critère est insuffisant pour évaluer le pronostic.

- Étude des plasmocytes en phase S (AcM Bu1, Amersham).

- Quantification de l'ADN des plasmocytes (Réaction de Feulgen).

- Expression de la glycoprotéine de chimiorésistance (AcM C. 219, Centocor).

Révélation des peroxydases

Dissoudre 15 mg d'AEC dans 3,6 ml de diméthylformamide (Merck). Ajouter 72 ml de Tampon Acétate pH 5,2, extemporanément ajouter 100 µl de H2O2 30 %. Filtrer avant l'emploi.

Tampon Acétate pH 5,2

Acide acétique 0,1 M 180 ml

POURCENTAGE DE PLASMOCYTES EN CYCLE

Myélome au diagnostic n=12	Myélome stable n=4	Myélome en progression n=10	Myélome en progression leucémique n=5
6 % (2-20)*	1 % (0-3)*	5 % (0-25)*	13 % (3-86)*
Malades récemment arrivés au service	pas de plasmocytes proliférants		tous les malades décédés < 3 mois

* Valeurs extrêmes

Acétate de Na 0,1 M 820 ml
Ajuster le pH à 5,2

Révélation des phosphatases alcalines

Naphtol AS-MX Phosphate (Sigma)
2 mg
Diméthylformamide 0,2 ml
Tampon TRIS 0,1 M pH 8,2 9,8 ml
Lévamisole 1 M (Sigma) 10 µl
Fast-Blue TR salt (Sigma) 10 mg

Tous les anticoprps sont dilués dans du tampon TRIS.

* Tampon TRIS (Merck) 0,05 M pH 7,2
Tampon TRIS + Lait (1 % Régilait)

IMMUNOCYTOCHIMIE DES CELLULES ENDOCRINES DE LA PROSTATE CHEZ LE CHIEN

Ch. JOBIT, M. ANDREU & B. LEBLANC

Laboratoires PFIZER - Centre de Recherche - BP 159 - 37401 AMBOISE CEDEX

La présence de cellules endocrines dans la prostate n'a été mise en évidence que relativement récemment, en particulier chez l'homme et chez le cobaye (1-2-3). Celles-ci sont moins bien connues que celles du tube digestif ou de l'appareil respiratoire qui ont fait l'objet de nombreux travaux, notamment, dans le cadre des concepts de système endocrinien diffus, de système A.P.U.D. ou de système neuroendocrinien (4-5-6).

Cependant, des études immunocytochimiques récentes qui portaient sur des tissus normaux ou sur des lésions prolifératives de la prostate chez l'homme, ont révélé toute l'importance que pouvaient avoir les cellules endocrines prostatiques (1-3-7-8-9). Par analogie avec ce que l'on sait des cellules endocrines gastrointestinales, on peut leur supposer un rôle dans la régulation de l'activité secré-

toire et/ou du renouvellement cellulaire de la glande prostatique en liaison avec l'innervation (10). D'autre part, il semble que les carcinomes prostatiques avec une différenciation neuroendocrine aient une agressivité accrue, ce qui pourrait avoir des implications importantes sur le diagnostic, le pronostic ou le traitement des tumeurs prostatiques chez l'homme (9-11).

Le but de la présente étude est de démontrer pour la première fois, par des techniques immunocytochimiques classiques l'existence de cellules endocrines dans la prostate du chien. L'étude a porté sur des prostates normales de jeunes chiens et sur quelques cas de lésions prolifératives de la prostate chez des animaux plus âgés.

Matériel

- 18 prostates normales de chien Beagle en provenance de l'élevage Pfizer (Sandwich, U.K.).

- 3 lésions prolifératives de la prostate de chien en provenance du Laboratoire d'Histo-Cytopathologie Vétérinaire (D^r Lagadic), 13, rue de Rouen, 94700 Maisons-Alfort.

Méthode

Les prélèvements, après une fixation au formol neutre à 10 % tamponné (prostates normales) ou au liquide de Bouin (lésions prostatiques), ont été recoupés transversalement, déshydratés, clarifiés, inclus en paraffine et coupés à 4 µm.

Les sections ont été traitées pour l'immunocytochimie par la méthode peroxydase anti-péroxydase (PAP) selon Burns (12) en utilisant les sérums anti-sérotonine, chromogranine A, « Neuron Specific Enolase » (NSE), somatostatine, calcitonine, « Calcitonin gene-related peptide » (CGRP) et la diaminobenzidine (DAB) comme chromogène (tableau n° 1) et colorées en routine par l'hémalum-éosine (HE).

Résultats

L'immunocytochimie a révélé la présence de quelques cellules isolées avec une immunoréactivité positive dans tous les prélèvements de prostates normales examinés (tableau n° 2). La coloration HE de routine ne permettait pas de les visualiser.

Les immunosérums anti-sérotonine et antichromogranine A ont donné des résultats comparables. Ils ont marqué des cellules isolées dans l'épithélium urétral

ou dans l'épithélium glandulaire prostatique, surtout en région profonde dans les gros canaux périurétraux à proximité de l'urètre. L'immunosérum antisomatostatine n'a marqué que peu de cellules dans de rares cas. Les immunosérums anti-NSE, anti-calcitonine et anti-CGRP ont donné des résultats négatifs. Morphologiquement les cellules marquées sont soit des cellules pyriformes en position basale avec un prolongement cytoplasmique en région apicale qui semble aller au contact de la lumière bordée par l'épithélium (type ouvert) (Fig. 1), soit des cellules pyriformes avec un prolongement cytoplasmique longeant la basale de l'épithélium (type dendritique) (Fig. 2), soit des cellules plus arrondies (type fermé) (Fig. 3), soit des cellules fusiformes (fig. 4).

Parmi les 3 lésions prolifératives de la prostate (2 adénocarcinomes et 1 hyperplasie), seul un adénocarcinome présentait des cellules dispersées relativement nombreuses, avec une immunoréactivité positive pour la sérotonine ou la chromogranine A ainsi que localement quelques cellules marquées par l'antisérum anticalcitonine. Les cellules marquées par la sérotonine ou la chromogranine A sont morphologiquement identiques à celles décrites précédemment ; elles sont localisées en région basale des structures glandulaires cancéreuses (Fig. 5). Les cellules marquées par la calcitonine, par contre, apparaissent plus cuboïdales, moins intensément colorées. Elles sont situées dans la couche cellulaire la plus basale de l'épithélium tumoral pluristratifié (Fig. 6). Le marquage subsiste après absorption préalable de l'anticorps par la calcitonine.

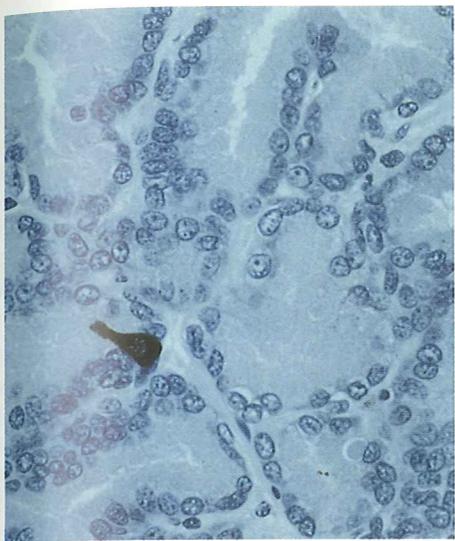


Figure 1 Épithélium glandulaire prostatique - Sérotonine

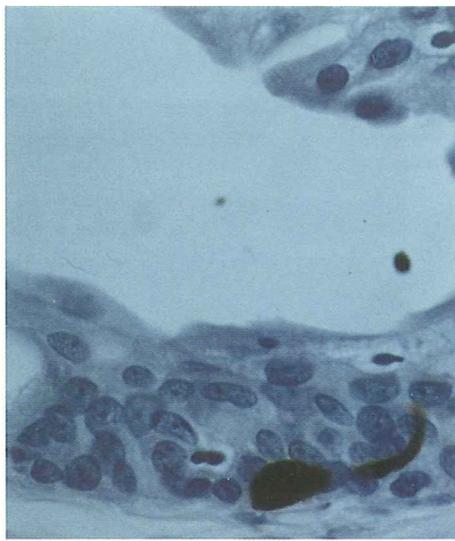


Figure 2 Épithélium de l'urètre prostatique - Sérotonine

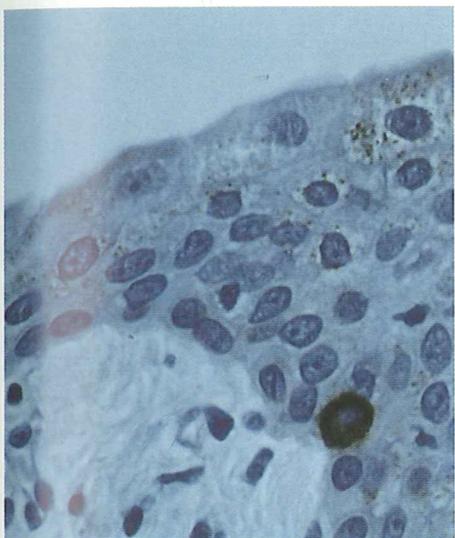


Figure 3 Épithélium de l'urètre prostatique - Chromogranine A

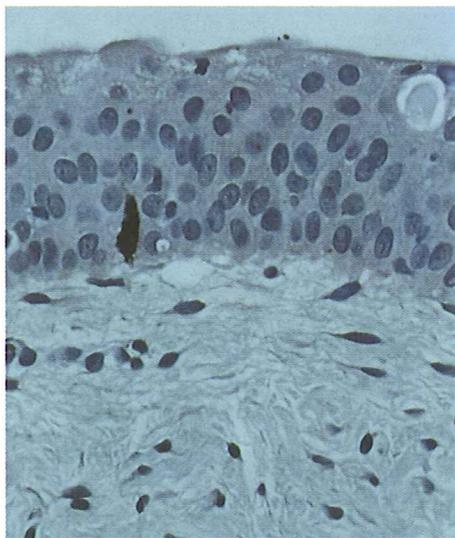


Figure 4 Épithélium de l'urètre prostatique - Somatostatine

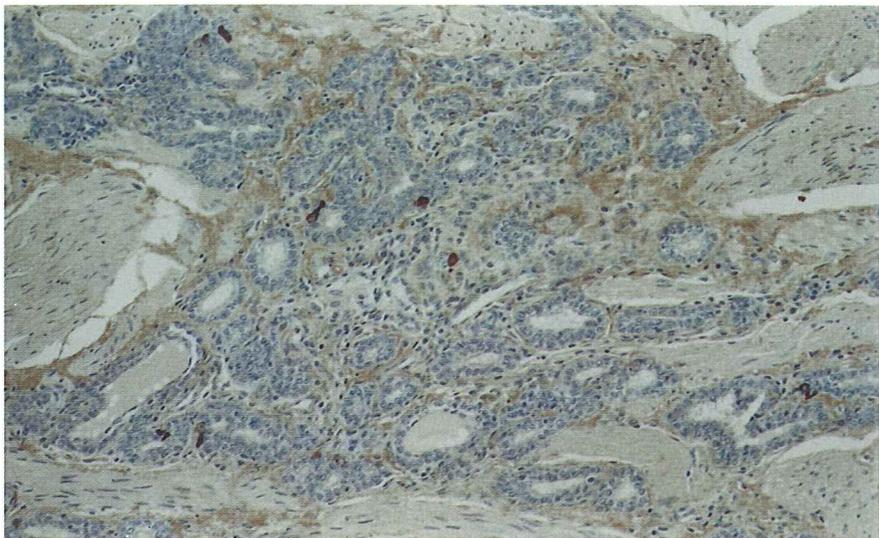


Figure 5 Adénocarcinome prostatique - Chromogranine A

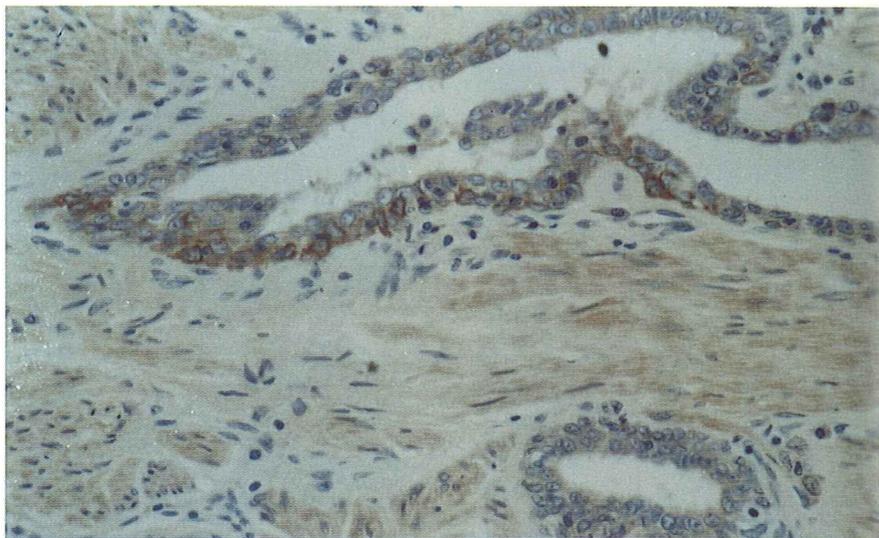


Figure 6 Adénocarcinome prostatique - Calcitonine.

Discussion

Dans la présente étude, nous avons utilisé des antisérums primaires d'origine commerciale, dirigés contre des antigènes d'origine humaine, bovine ou de rats. L'utilisation adéquate de témoins positifs et de témoins négatifs montre que ces antisérums gardent leur spécificité chez le chien, comme c'est le plus souvent le cas (13-14).

Sur le plan de la réalisation pratique, la mise en œuvre de la technique PAP ne présente ici pas de difficultés particulières, si ce n'est que, puisque les structures marquées sont peu nombreuses et de faible taille (quelques cellules isolées), l'adéquation de la durée du temps de révélation par la DAB ne peut être contrôlée sous le microscope.

Ce travail met en évidence pour la première fois la présence de cellules endocrines dans la prostate du chien comme cela a déjà été démontré chez l'homme et chez le cobaye. La morphologie et la localisation de ces cellules sont les mêmes dans les trois espèces. Cependant nous avons trouvé relativement peu de cellules endocrines sur les prélèvements que nous avons étudiés, comparativement à ce qui est rapporté dans la littérature chez l'homme ou le cobaye. Ceci peut être lié au jeune âge des chiens étudiés puisque l'on sait que chez l'homme et le cobaye, le nombre de cellules endocrines dans la prostate augmente avec l'âge (1-2-3).

Les caractéristiques immunocytochimiques des cellules endocrines de la prostate sont globalement identiques dans les trois espèces (tableau n° 3) (1-2-3).

Les antisérums antisérotonine et antichromogranine A marquent le plus grand nombre de cellules alors que les

autres antisérums ne marquent que peu ou pas de cellules. L'absence de marquage peut soit correspondre à des variations d'espèce, soit être liée au relativement faible nombre de prélèvements étudiés et au petit nombre de cellules marquées en cas de résultats positifs. Dans ce contexte, les résultats négatifs obtenus dans notre travail avec la NSE apparaissent plus singuliers.

Chez l'homme et le cobaye, la NSE est en effet rapportée comme un bon marqueur des cellules endocrines de la prostate au même titre que la sérotonine ou la chromogranine A (2-3). L'examen des témoins positifs comme la présence de structures nerveuses positives pour la NSE dans les sections de prostates que nous avons étudiées, montre que l'absence de marquage n'est probablement pas due à une déficience de la technique ou à une absence de réaction croisée pour l'antigène testé.

Un adénocarcinome sur les trois lésions prolifératives de la prostate étudiées, possédait des cellules avec une immunoréactivité positive pour la sérotonine et la chromogranine A ainsi que pour la calcitonine. Ce résultat positif encourageant, laisse supposer que les tumeurs de la prostate du chien, peuvent représenter un bon modèle de pathologie comparée. Les cellules marquées par la calcitonine diffèrent morphologiquement des cellules endocrines marquées par la sérotonine ou la chromogranine A. La persistance du marquage après absorption montre qu'il s'agit d'un artefact. Cet exemple souligne l'une des difficultés majeures liées à l'interprétation des marquages obtenus en immunohistochimie.

Tableau 1

CARACTÉRISTIQUES DES ANTISÉRUMS PRIMAIRES

Antisérums primaires	Origine	N° catalogue	N° de lot	Immunogènes	Utilisation	Organes témoins de Chien
Sérotonine	PENINSULA	61066	800237	Sérotonine	60 mn TA au 1/1000	Iléon
Chromogranine A	INCSTAR	20085	8818023	Chromogranine SP1 bovine	60 mn TA au 1/100	Pancréas
Neuron specific enolase	DAKO	A589	047	NSE bovine gamma/gamma	120 mn TA au 1/1000	Thyroïde
Somatostatine	DAKO	A566	113	Somatostatine humaine	60 mn TA au 1/200	Pancréas
Calcitonine	DAKO	A576	054-P	Calcitonine humaine	90 mn TA au 1/200	Thyroïde
Calcitonin gene related peptide	AMERSHAM	RPN-1842	13	CGRP synthétique de rat	90 mn TA au 1/1000	Thyroïde
* TA = température ambiante						
MÉTHODE PAP				CONTRÔLES		
<ul style="list-style-type: none"> - Lames déparaffinées : xylène, alcool absolu - Méthanol avec 1 % H₂O₂ (110 vol.), pendant 30 mn, eau, tampon - Sérum normal de chèvre. 1/10 pendant 30 mn (NORDIC) - Antisérums primaires de lapin - Rinçage tampon - Sérum de chèvre anti-Ig de lapin 1/20 pendant 30 mn (NORDIC) - Rinçage tampon - Complexe PAP de lapin. 1/50 pendant 30 mn (NORDIC) - Rinçage tampon - DAB (D5637, Sigma) 50 mg % avec 1 goutte H₂O₂ (110 vol.) pendant 6 à 18 mn selon l'antisérums - Rinçage tampon, contre-coloration et montage habituel. 				Substitution de l'antisérums primaire par : <ol style="list-style-type: none"> 1 - Tampon 2 - Sérum normal de lapin 1/1000 (NORDIC) Absorption : [16 h 00 à +4°C sous agitation] <ol style="list-style-type: none"> 1 - Anticalcitonine (225 µg pour 200 µl au 1/200) 2 - Somatostatine (9.96 µg pour 1 ml au 1/200) TAMPON Tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 NaCl 29%, Triton × 100 5‰, BSA, 1‰ (dilutions et rinçages).		

Tableau 2
RÉSULTATS

Race	Age	HE	Sérotonine	Chromogranine A	NSE	Somatostatine	Calcitonine	CGRP
Beagle	5 mois	immature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	5 mois	immature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	5 mois	immature	U+ G+	- G+	-	-	-	-
Beagle	5 mois	immature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	6 mois	mature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	8 mois	mature	- -	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	9 mois	mature	U+ -	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	9 mois	mature	U+ -	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	11 mois	mature	U+ -	U+ G+	-	G+(3c)	-	-
Beagle	11 mois	mature	U+ -	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	12 mois	mature	U+ -	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	12 mois	mature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	13 mois	mature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	14 mois	mature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Beagle	15 mois	mature	U+ G+	U+ -	-	-	-	-
Beagle	15 mois	mature	U+ G+	U+ G+	-	U+(1c)	-	-
Beagle	5 ans 1/2	mature	U+ G+	U+ G+	-	G+(1c)	-	-
Beagle	6 ans	mature	U+ G+	U+ G+	-	-	-	-
Berger Allemand	7 ans	hyperplasie	-	-	-	-	-	-
Beauceron	6 ans	adénocarcinome	++	++	-	-	+*	-
Berger	12 ans	adénocarcinome	-	-	-	-	-	-

- + = marquage de quelques cellules isolées
 ++ = marquage de quelques cellules relativement plus nombreuses
 U = épithélium urétral
 G = épithélium glandulaire
 - = pas de cellules marquées
 * = marquage non spécifique

Tableau 3

**CARACTÉRISTIQUES IMMUNOCYTOCHIMIQUES
DE CELLULES ENDOCRINES DE LA PROSTATE NORMALE**

	Homme	Cobaye	Chien
Sérotonine	+++	+++	++
Chromogranine A	+++	+++	++
NSE	+++	+++	-
Somatostatine	+	-	+
Calcitonine	+	-	-
CGRP	NE	NE	-
Bombesine	+	-	NE

NE = non étudié
 +++ = nombreuses cellules marquées
 ++ = quelques cellules marquées
 + = peu de cellules marquées
 - = pas de cellules marquées

RÉFÉRENCES

- FETISSOF F., DUBOIS M.P., ARBEILLE-BRASSART B., LANSON Y., BOIVIN F. & JOBARD P. : Endocrine cells in the prostate gland, urothelium and Brenner tumors. Immunohistological and ultrastructural studies. Virchows Arch. [Cell Pathol], 1983, **42**, 53-64.
- DI SANT'AGNESE P.A., DAVIS N.S., CHEN M. & De MESY JENSEN K.L. : Age-related changes in the neuroendocrine (endocrine-paracrine) cell population and the serotonin content of the Guinea pig prostate. Lab. Invest., 1987, **57**, 6, 729-736.
- DI SANT'AGNESE P.A., De MESY JENSEN K.L., CHURUKIAN C.J. & AGARWAL M.M. : Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells. Distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains. Arch.Pathol.Lab.Med., 1985, **109**, 607-612.
- DELVERDIER M., CABANIE P. & VAN HAVERBEKE G. : Le système endocrinien diffus. Revue Méd. Vét., 1988, **139**, 12, 1171-1179.
- PAGES A. - Le système endocrinien diffus (S.E.D.). Annales d'anatomie pathologique, tome 19, n° 4, pp. 335-352, 1974.
- PEARSE A.G.E. : APUD : concept, tumours, molecular markers and amyloid. Mikroskopie, 1980, **36**, 257-269.
- DI SANT'AGNESE P.A. : Calcitoninlike immunoreactive and bombesinlike immunoreactive endocrine-

- paracrine cells of the human prostate. Arch.Pathol.Lab.Med., 1986, **110**, 412-415.
8. DI SANT'AGNESE P.A. & De ME-SY JENSEN K.L. : Somatostatin and/or somatostatinlike immunoreactive endocrine-paracrine cells in the human prostate gland. Arch. Pathol.Lab.Med., 1984, **108**, 693-696.
 9. TURBAT-HERRERA E.A., HERRERA G.A., GOREI., LOTT R.L., GRIZZLE W.E. & BONNIN J.M. : Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas. A retrospective autopsy study. Arch. Pathol. Lab. Med., 1988, **112**, 1100-1105.
 10. McNEAL J.E. : Normal histology of the prostate. Am.J.Surg. Pathol., 1988, **12**, 8, 619-633.
 11. DI SANT'AGNESE P.A. : Neuroendocrine differentiation and prostatic carcinoma. The concept « Comes of Age ». Arch. Pathol. Lab. Med., 1988, **112**, 1097-1099.
 12. BURNS J. : Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. Histochem., 1975, **43**, 291-294.
 13. HOLSCHER M.A., DAVIS B.W., WILSON R.B., HUNT K.L. & BERRY K.K. : Ectopic thyroid tumor in a dog: thyroglobulin, calcitonin, and neuron-specific enolase immunocytochemical studies. Vet.Pathol., 1986, **23**, 778-779.
 14. MOORE F.M., KLEDZIK G.S., WOLFE H.J. & DELELLIS R.A. : Thyroglobulin and calcitonin immunoreactivity in canine thyroid carcinomas. Vet.Pathol., 1984, **21**, 168-173.

UTILISATION DE LA MORPHOMÉTRIE DANS L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ PHARMACOLOGIQUE CUTANÉE DES RÉTINOÏDES

P. ROSSIO - M. DANGE - J. FERRACIN - A. CHATELUS

CIRD GALDERMA

Route des Lucioles - Sophia Antipolis - 06565 VALBONNE CEDEX

MOTS CLÉS

Analyse d'image, acné, souris rhino, rétinoides.

RÉSUMÉ

Les effets comédolytiques et hyperplasiques des rétinoides sont quantifiés grâce à un modèle animal appelé : « La Souris Rhino ». Une technique histologique classique est utilisée pour la visualisation des différentes structures cutanées à mesurer. L'étude morphométrique est réalisée par un appareil semi-automatique : le MOP-Vidéoplan.

INTRODUCTION

Le Centre International de Recherche Dermatologique Galderma (CIRD GALDERMA) a pour vocation la recherche de nouveaux produits actifs dans le traitement des maladies dermatologiques. L'acné fait partie d'un de ses thèmes de recherche. La famille des rétinoides est déjà connue dans le **traitement de l'acné** avec comme précurseur l'acide tout-trans rétinoinique utilisé depuis plus d'une vingtaine d'années.

De nombreux tests pharmacologiques sont nécessaires pour l'évaluation de ces produits. L'étude de l'**effet comédolytique des rétinoides** est un des tests retenus pour mettre en évidence l'effet pharmacologique cutané de cette gamme de

produit (1). Ce test utilise un modèle animal particulier, la **souris Rhino**.

L'utilisation de techniques nouvelles telles les **mesures morphométriques** nous permet de quantifier l'effet pharmacologique des différents traitements.

Après une présentation de la souris Rhino, l'étude morphométrique va être développée afin de justifier l'utilisation, la validité et l'intérêt de cette méthode. On s'appuiera sur l'exemple de l'acide tout-trans rétinoïque qui fait figure de produit de référence actuellement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèle animal

La souris Rhino hr^{rh}/hr^{rh} doit son appellation à Howard en 1940 (2). C'est une souris mutante, le gène Rhino étant un allèle récessif du gène hairless. Nous ne pouvons pas distinguer les souris mutantes homozygotes des souris hétérozygotes, de la naissance jusqu'à l'âge de 15-17 jours. Leur aspect physique à l'âge adulte est caractérisé par une peau très plissée, l'absence de poils et un tegument anormal.

Lors de l'observation histologique de la peau de cette souris, on note la présence de **comédons épidermiques et de kystes dermiques** (figure 1). Il est à noter que d'autres anomalies histologiques sont décrites sur certains organes après l'âge de deux mois (foie, rate, thymus, nœux lymphatiques, glomérules rénaux, œil).

L'intérêt de ce modèle réside dans la présence de ces comédons, utricules remplis de matériel corné et dont l'aspect histologique est proche des lésions rétentionnelles acnéiques humaines, sans avoir

toutefois les symptômes majeurs de l'inflammation. En effet cette souris est dépourvue de bactéries « Propionibacterium acnès ».

Traitement

Le but de cet article n'étant pas de donner des résultats sur l'effet de produits, mais de décrire l'utilisation d'une technique morphométrique, nous présentons le traitement avec l'Aberel gel® afin de visualiser l'expression des résultats quantitatifs.

- Produit : 50 µl d'Aberel gel® commercialisé à 0,025 %. P/P (témoin positif).

- Zone traitée : milieu du dos (2,5 cm²).

- Nombre d'animaux par lot : 6 (animaux mâles et femelles).

- Durée : 3 semaines à raison de 5 jours de traitement par semaine.

Technique histologique

- Les « punch-biopsies » de 6 mm de diamètre sont fixés pendant 24 heures minimum dans le formol à 10 % tamponné à pH 7.2-7.4 (10 ml de formaldéhyde solution à 36-40 % pour 90 ml de tampon soude-phosphate-fixateur de Carson).

- Les biopsies sont coupées en deux par le milieu, avant d'être incluses en paraffine (la jonction dermo-épidermique doit être incluse bien perpendiculairement à l'angle de coupe).

- Pour chaque bloc on réalise 3 coupes de 5 µm d'épaisseur espacées de 150 µm + ou - 5 µm, étalées sur une même lame.

- On réalise une coloration à l'Hémalun-Phloxine-Safran (réf. Histochimie

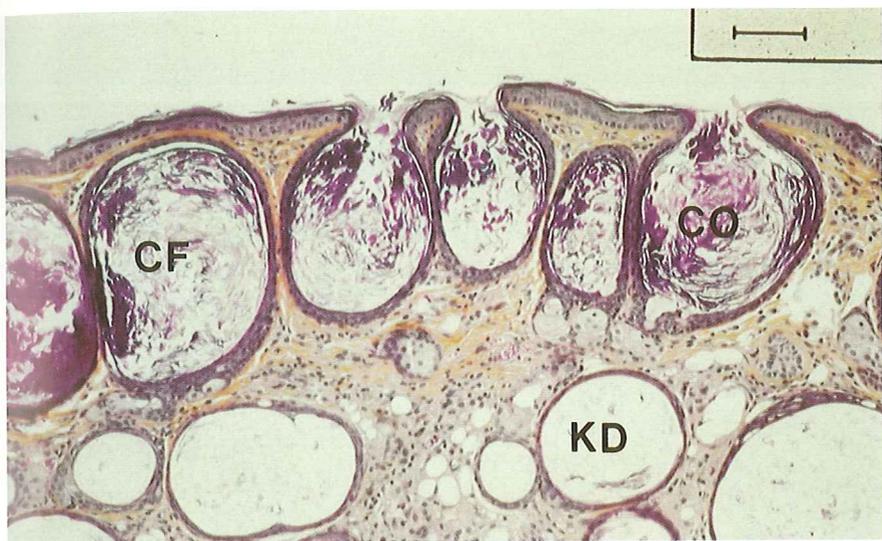


Figure 1 : Histologie de la peau du dos de souris rhino (H.P.S./X 125)
CO comédon ouvert - CF comédon fermé - KD kyste dermique.

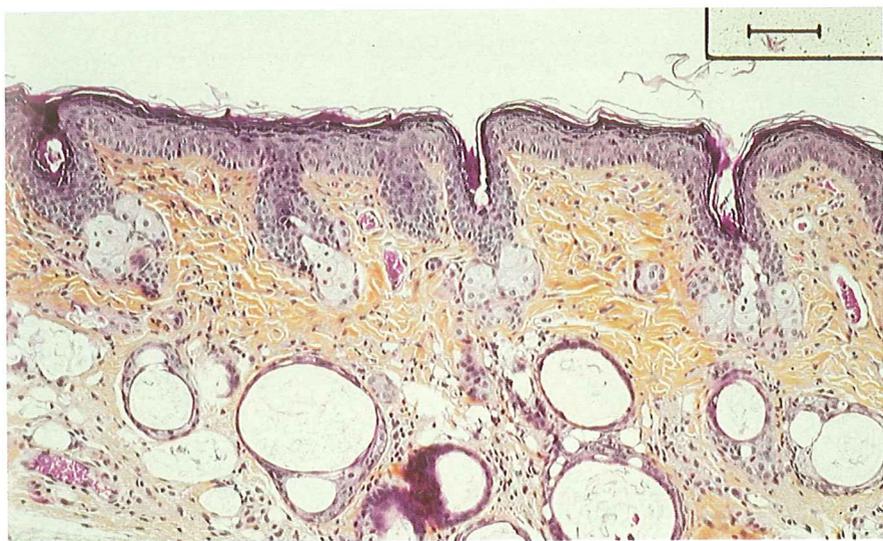


Figure 2 : Histologie de la peau de souris rhino après traitement topique à l'Aberel® 0,025 % pendant 3 semaines (H.P.S./X 125)

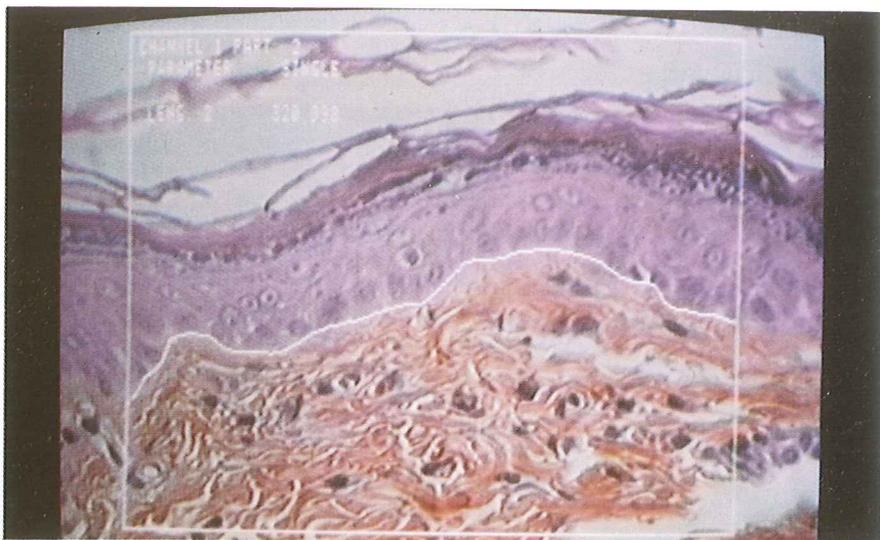


Figure 3 : Photographie de l'écran vidéo lors de la mesure de la jonction dermo-épidermique



Figure 4 : Photographie de l'écran vidéo lors de la mesure de l'épaisseur épidermique

normale et pathologique. P. Ganter-G. Jolles).

Appareillage morphométrique

L'analyse quantitative à l'aide de micromètres a déjà été utilisé par les équipes de C. Bonne (3) et R. Ashton (4) pour évaluer l'effet d'agents comédolytiques. La particularité de notre étude est d'avoir réalisé des mesures semi-automatiques, avec un appareillage de type MOP-Vidéoplan commercialisé par Kontron.

On peut voir sur la figure 7 les différents appareils nécessaires connectés entre eux :

- Microscope,
- Caméra,
- Ecran vidéo,
- Ordinateur MOP-Vidéoplan,
- Table à digitaliser,
- Imprimante.

On fait la mise au point sur la lame placée sur la platine du microscope. Son image est visualisée sur l'écran par l'intermédiaire de la caméra vidéo. En déplaçant le curseur sur la table à digitaliser, on souligne les éléments à mesurer. L'ordinateur intègre ces mesures et les restitue en mesures métriques grâce à une calibration faite préalablement à l'aide d'abaques.

PARAMÈTRES MESURÉS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les rétinoides, dérivés de la vitamine A, ont pour effet de réduire le matériel corné présent dans le canal folliculaire (propriétés kératolytiques). (5).

Les mesures sont destinées à établir ce pouvoir comédolytique dans le modèle

animal souris Rhino, en utilisant comme témoin positif l'Aberel gel®. En pratique un produit est dit comédolytique lorsqu'il provoque la diminution de la taille des utricules ; le stade suivant étant celui d'une expulsion progressive du comédon (comédo-expulsion. Figure 2). Lorsque le produit est très actif on peut arriver à une disparition quasi-totale des comédons épidermiques. Les rétinoides provoquent parallèlement une acanthose épidermique.

Pour rendre compte de ces différents changements morphologiques, les paramètres suivants sont mesurés :

- soit visuellement au microscope

Nombre de comédons épidermiques ouverts à la surface (figure 1).

Nombre de comédons épidermiques fermés à la surface (figure 1).

Nombre de kystes dermiques (figure 1).

- soit à l'aide du vidéoplan

Longueur de la jonction dermo-épidermique (figure 3).

Epaisseur de l'épiderme (figure 4).

Diamètres comédoniens d et D (figures 5 et 6).

Pour une biopsie, les mesures sont faites sur les trois coupes espacées de 150 µm et cumulées, de façon à limiter les artefacts de coupe.

A partir de ces données brutes les paramètres calculés sont les suivants :

- **Nombre de comédons épidermiques par unité de longueur basale,**

- **Profil comédonien $r = d/D$ (reflet de la taille et de la forme des utricules),**

- **Epaisseur de l'épiderme (reflet de l'hyperplasie).**

En pratique les mesures sont faites lot par lot et animal par animal. A 1 animal

correspond 1 lame, soit 3 coupes à mesurer sur toute leur longueur.

On respecte l'ordre suivant :

1. L'appareil est calibré en fonction de l'objectif utilisé, à l'aide d'un abaque.

2. Mesure de d et D sur une première coupe (tous les comédons ouverts).

3. Mesure de la longueur basale correspondante.

4. On fait successivement les mêmes mesures sur les deux autres coupes de la même lame.

5. Visuellement au microscope, on compte sur l'ensemble des trois coupes le nombre de comédons épidermiques ouverts à la surface, le nombre de comédons fermés et le nombre de kystes dermiques. On saisit ces valeurs dans l'ordinateur.

6. Ensuite l'appareil intègre ces différentes données et cumule le nombre de comédons ouverts et la longueur totale mesurée sur les trois coupes.

7. Mesure de l'épaisseur épidermique pour les trois coupes correspondant aux longueurs de basales mesurées.

Ces mesures sont transférées sur un ordinateur qui va permettre de faire les moyennes par lot d'animaux et les calculs statistiques.

La figure 8 montre les paramètres exploités qui sont :

- Le nombre de comédons ouverts/cm de longueur basale (N.O.C./CM).

- Le nombre de comédons épidermiques/cm de longueur basale (N.E.C./CM).

- Le nombre de comédons dermiques/cm de longueur basale (N.D.C./CM).

- Le nombre total de comédons/cm de longueur basale (N.T.C./CM).

- L'épaisseur épidermique (thick).
- Les diamètres d (orifice) et D (utricule).

- $r = d/D$ calculé sur chacun des comédons.

VALIDATION DU TEST

On doit prendre toutes les précautions pour s'assurer que le test est reproductible et représentatif de l'effet observé. Pour cela nous avons :

• standardisé au maximum :

- Le prélèvement en faisant un « punch-biopsie » ;

- La préparation histologique de l'échantillon (la longueur mesurable est à peu près toujours la même, ainsi que l'angle de coupe) ;

- La mesure (façon de souligner les éléments à mesurer à l'aide du curseur) ;

• Limité les artefacts de coupe en mesurant 3 coupes espacées de 150 μm ;

• Fait systématiquement des lots témoins appropriés (témoin négatif, témoin positif) ;

• Contrôlé, à la mise en place du test, que les mesures étaient cohérentes avec les observations histologiques visuelles.

• Fait des tests de variabilité dans le temps sur différentes études (figure 11).

• Fait les tests statistiques appropriés.

EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Sur les figures 9 et 10 on peut voir un exemple d'exploitation des résultats (effet de l'Aberel gel®).

La figure 9 montre l'effet de l'Aberel gel® sur le nombre de comédons épidermiques par unité de longueur basale.

Mesure de d et de D
Photographie de l'écran vidéo

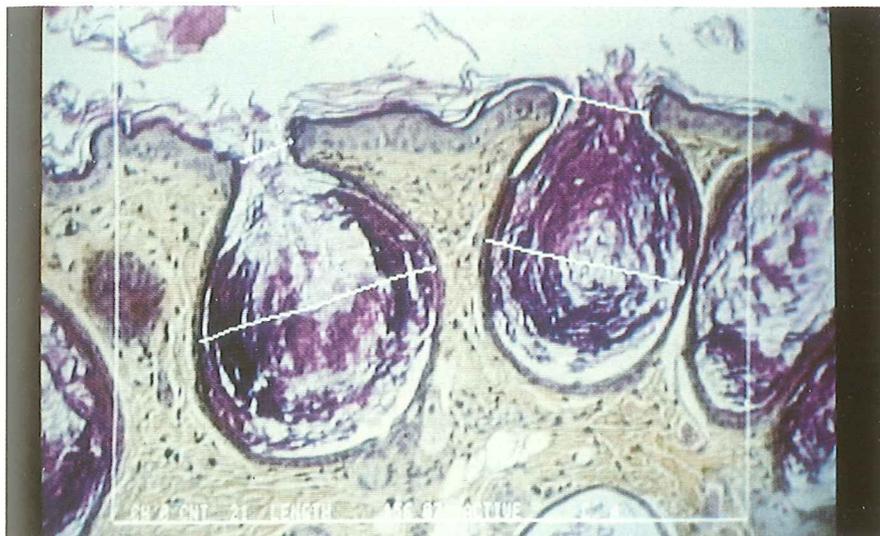


Figure 5 : Souris rhino témoin



Figure 6 : Souris rhino traitée à l'Aberel gel®

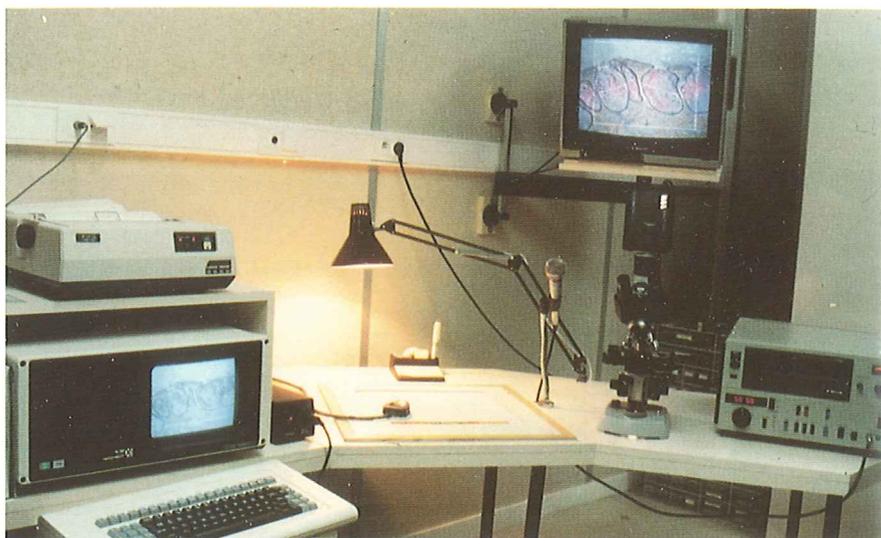
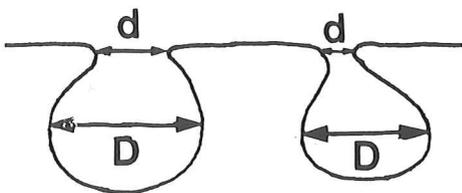


Figure 7 : Appareillage de mesure MOP-Vidéoplan

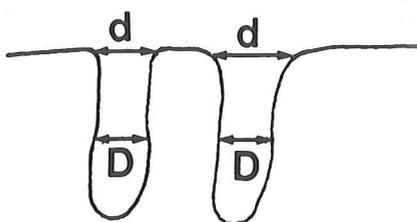
La figure 10 rend compte de l'effet de l'Aberel gel® sur le profil comédonien. Pour l'étude de l'activité des rétinoïdes, le paramètre r est particulièrement représentatif.

Les différentes représentations de « $r = d/D$ » sont les suivantes :

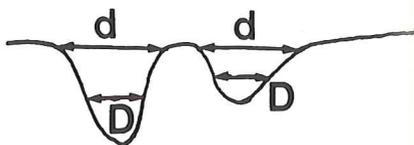
PRODUIT NON ACTIF $r < 1$



PRODUIT ACTIF $r \geq 1$



PRODUIT TRÈS ACTIF $r \gg 1$



CALCULS SOURIS RHINO

Compound	Dose	Véhicule	N.O.C.	N.O.C./CM	N.E.C.	N.E.C./CM	N.D.C.	N.D.C./CM	N.T.C.	N.T.C./CM	LENGTH	THICK.	r=d/D	d	D			
			44	29	105	70	72	48	177	118	1.50	17.23	0.64	56	108			
			41	23	118	66	90	50	208	116	1.80	18.64	0.84	86	122			
			43	31	110	79	47	34	157	112	1.40	14.69	0.71	52	92			
			49	27	116	64	87	48	203	113	1.80	17.55	0.62	59	121			
			32	25	90	69	39	30	129	99	1.30	20.88	0.87	67	96			
			33	28	81	68	52	43	133	111	1.20	20.77	0.84	62	83			
						40	27	103	69	65	42	168	111	1.50	18.29	0.75	64	104
						3	1	6	2	9	3	14	3	0.10	0.96	0.05	5	7
						« t » Test												
			Aberel 0.025 %			23	13	63	35	105	58	168	93	1.80	50.36	1.60	44	29
19	14	73				52	45	32	118	84	1.40	40.40	1.31	38	30			
10	8	68				57	74	62	142	118	1.20	37.83	1.58	54	35			
25	18	63				45	80	57	143	102	1.40	44.20	1.47	54	39			
32	17	94				49	80	42	174	92	1.90	51.41	1.61	56	38			
42	26	80				50	106	66	186	116	1.60	40.28	1.53	47	31			
						25	16	74	48	82	53	155	101	1.55	44.08	1.63	49	34
						4	2	5	3	9	5	10	6	0.11	2.31	0.05	3	2
						« t » Test												

Figure 8 : Calcul des paramètres - tableau comparatif entre l'Aberel gel® et le témoin acétone.

Figure 9

Effet comédolytique de l'Aberel® gel 0,025 %

t Test : N.S. non significatif ;

* P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001

 ACÉTONE N.O.C./CM

 ABEREL N.O.C./CM

 ACÉTONE N.E.C./CM

 ABEREL N.E.C./CM

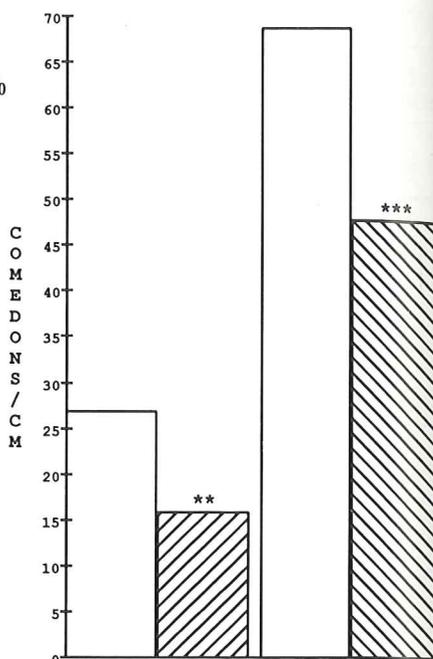
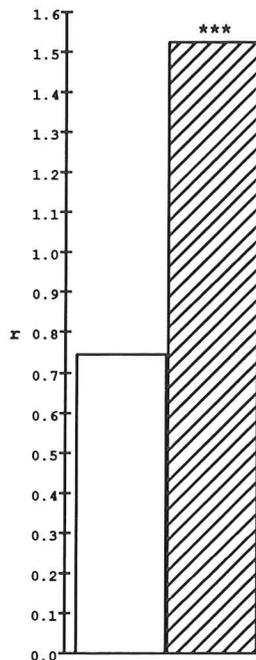


Figure 10

Effet de l'Aberel gel® 0,025 % sur le profil comédonien

($r = d/D$)

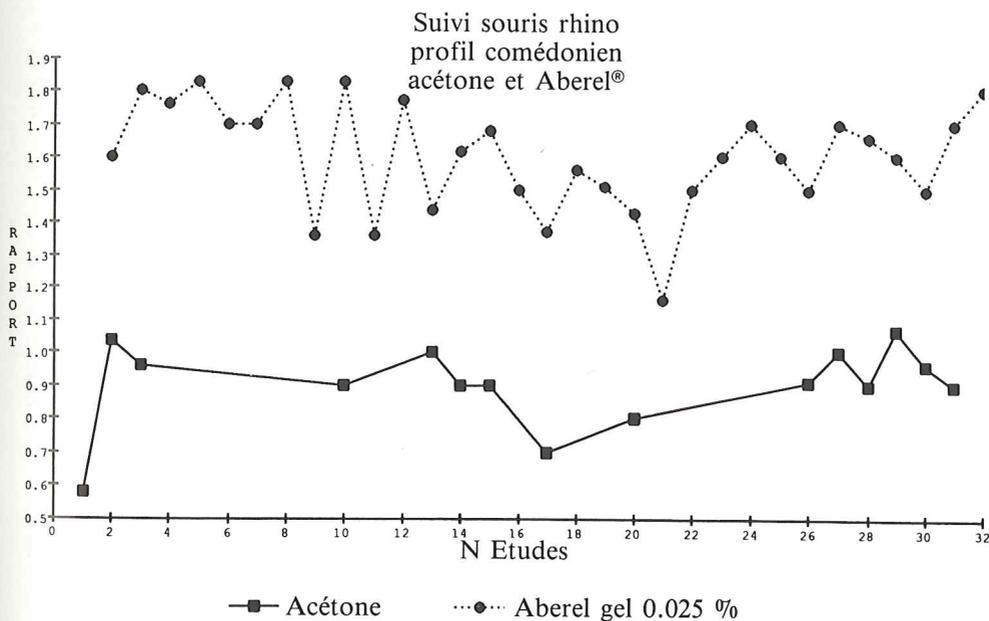
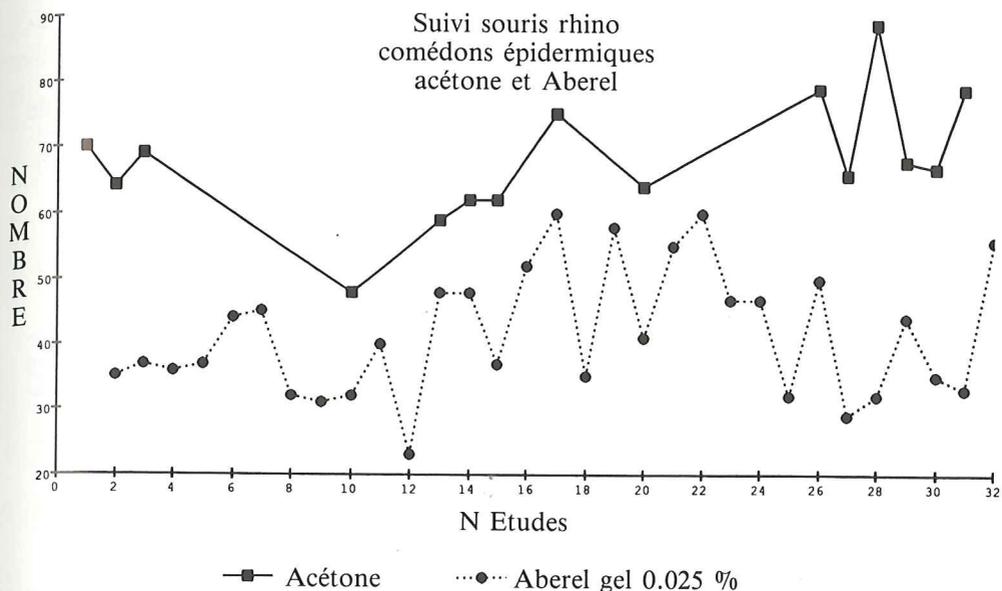
 ACÉTONE

 ABEREL

t Test N.S. non significatif

* P < 0,05 - ** P < 0.01 - *** P < 0.001

Figure 11 : Variabilité des mesures dans le temps, sur des études différentes



Ces résultats montrent que l'Aberel gel® possède un pouvoir comédolytique important pour les raisons suivantes :

- Le nombre de comédons épidermiques diminue significativement.

- Dans un même temps la structure des comédons change. Le profil r augmente significativement, ce qui signifie que les comédons n'ont plus la forme d'origine. En examinant les colonnes des mesures d et D sur la figure 8, on constate que cette variation est due à une diminution importante de D alors que d reste proche des valeurs témoins. La majorité des comédons sont rétrécis sous l'effet de l'hyperplasie pour être ensuite expulsés.

CONCLUSIONS

De nombreuses étapes sont nécessaires à l'élaboration des résultats. Celles-ci doivent être exécutés avec rigueur si l'on veut que l'étude soit validée (traitement, prélèvement, préparation histologique, mesure). Des lots témoins (positifs et négatifs) valideront les résultats de l'étude.

Si nous respectons tous ces stades, la technique d'analyse possède de nombreux avantages :

- La précision des résultats quantitatifs par rapport aux observations histologiques qualitatives.

- La possibilité de faire des calculs statistiques et de réaliser des courbes.

- La possibilité de comparer différents produits entre eux, d'apprécier un effet dose, d'étudier une cinétique.

Malgré l'utilisation du vidéoplan la méthode reste lourde à plusieurs niveaux :

- Coupes sériées lors de la préparation histologique.

- Mesures.

- Transfert des données sur un ordinateur central pour l'exploitation des résultats.

Kontron vient de sortir une nouvelle génération de vidéoplan qui devrait résoudre les deux derniers points cités ci-dessus.

REMERCIEMENTS

Je remercie Chantal Delain et Chantal Piedagnel pour l'aide technique qu'elles m'ont apportée dans la réalisation de cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CHATELUS A., CARON J.-C., SHROOT B., EUSTACHE J., HENSBY C.N. : Structure-activity relationships between retinoids using the topical Rhino mouse comedolytic model. *Pharmacology and the skin.* 1989, Vol 3, 144-148.
2. A. HOWARD : « Rhino », an allele of hairless in the Rhino mouse. *J. Hered.* 1940, **31**, 467-470.
3. C. BONNE et al. : A new model for the assay of comedolytic activity. *Int. J. of cosmet. Sci.* 1981, **3**, 23-28.
4. R. ASHTON et al. : Histologic changes in the skin of the Rhino mouse (hr/hr) induced by retinoids. *J. of Invest. Dermatol.* 1984, **82**, 632-635.
5. L. H. KLIGMAN et al. : The effect on Rhino mouse skin of agents which influence keratinisation and exfoliation. *J. of Invest. Dermatol.* 1979, **73**, 354-358.

INTRODUCTION

A LA MICROSCOPIE ANALYTIQUE : SONDE ÉLECTRONIQUE DE CASTAING, ANALYSEUR PAR ÉMISSION IONIQUE SECONDAIRE ET SONDE RAMAN-LASER

Michel TRUCHET et Roger MARTOJA

*Laboratoire d'Histophysiologie fondamentale et appliquée,
Université Pierre et Marie Curie,
12 rue Cuvier - 75005 PARIS*

INTRODUCTION

Depuis les origines de la microscopie, les histologistes se sont efforcés de compléter les examens morphologiques par une détermination de la composition chimique, élémentaire aussi bien que moléculaire, des structures décrites. L'ensemble des techniques mises au point constitue l'histochimie, et certaines de ces méthodes, comme la caractérisation du fer³⁺ par la réaction de Perls ou la mise en évidence des polysaccharides par la réaction de Hotchkiss-Mac Manus (acide périodique-Schiff) sont d'un usage très courant et sont très fiables. Cependant, il est loin d'en aller de même pour tou-

tes, et le besoin d'utiliser des méthodes basées sur un principe physique à caractère universel se faisait sentir depuis longtemps. Quelques tentatives avaient eu lieu dans l'entre-deux guerres, notamment la microspectrophotométrie à étincelle de Gerlach ou de Policart et Morel (*in 1*), mais l'insuffisance de l'arrière-plan technologique de l'époque avait voué ces tentatives à l'échec.

Ce n'est qu'après la deuxième guerre mondiale, en partie grâce aux progrès techniques considérables qui avaient accompagné le conflit, que Raymond Castaing réussit, le premier, à construire un microscope analytique véritablement

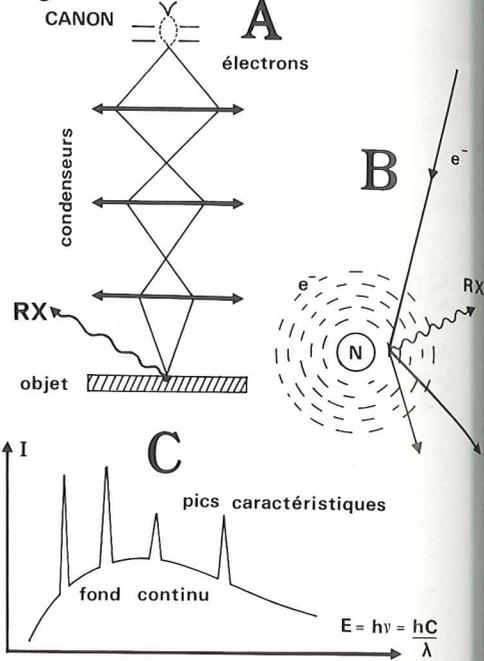
performant : la microsonde électronique (2). Deux autres microscopies analytiques devaient naître dans les quinze années suivantes de ce laboratoire exceptionnellement fécond : la perte d'énergie des électrons (3) et l'émission ionique secondaire (4). Avec l'avènement des lasers, d'autres types de microscopies analytiques allaient apparaître ailleurs : les sondes laser-spectromètre de masse, en Allemagne (5) et en France (6), ainsi que la sonde laser-Raman en France (7). Depuis, d'autres types encore de microscopies analytiques sont apparus, acoustiques, RMN ou Auger. C'est donc une vaste panoplie qui s'offre aujourd'hui à l'historien, bien que ces méthodes n'aient pas toutes donné lieu à des applications biologiques. Celle qui en a suscité le plus est la sonde électronique, davantage d'ailleurs dans sa version anglo-saxonne à sélection d'énergie (EDS) que dans le montage initial de Castaing à dispersion de longueur d'onde.

Cet article est consacré à cette méthode, qui sera comparée à l'émission ionique et à la diffusion Raman.

SONDE ÉLECTRONIQUE DE CASTAING

Un faisceau d'électrons, produit par un canon triode, est focalisé sur la surface d'un échantillon par deux ou trois condenseurs (fig. 1-A), comme dans la colonne d'un microscope électronique à balayage (8, 9). Sous l'impact de ces électrons, ceux qui occupent les couches profondes (K, L, M) des atomes présents dans le volume irradié, sont arrachés ; lors de leur remplacement, des cascades de déséxcitation radiatives aboutissent à l'émission de photons (fig. 1-B). Les

Figure 1



énergies de ces photons correspondent à celles des électrons des couches profondes ; or, la nature chimique des éléments est fonction de leur numéro atomique, ou nombre de charges (Z)^{*} : les énergies de liaison des électrons profonds dépendent également du nombre de charges. Ces énergies ont des valeurs finies, c'est-à-dire bien déterminées, qui ne varient que par sauts ou QUANTA ; leurs valeurs les situent dans la région du spectre électromagnétique appelé rayons X, ou RX. Il suffit donc de mesurer ce rayonnement X pour connaître la nature chimique des éléments présents dans le volume irradié. Cette méthode est donc une méthode d'ANALYSE ÉLÉMENTAIRE.

Les pics caractéristiques des éléments se détachent d'un fond continu, ou

FIGURE 1 : Principe de la microanalyse par sonde électronique. A - Schéma de l'instrument ; B - Excitation des atomes (N : noyau ; e^- : électrons) ; C - Spectre d'émission de rayons X.

FIGURE 2 : Différents modes de spectrométrie des rayons X et types d'échantillons. A - Spectrométrie en dispersion de longueur d'onde (selon Castaing). B - Spectrométrie à sélection d'énergie (mode anglo-saxon, désigné le plus souvent par ses initiales en langue anglaise, E.D.S.) ; C - Echantillons « massifs », avec diffusion des électrons et échantillons minces, sans diffusion.

FIGURE 3 : Schéma de l'analyseur ionique et présentation des résultats qu'il fournit. A - Schéma de principe. Un faisceau d'ions primaires (O_2^+ , Ar^+ ou Cs^+) est focalisé sur la surface d'un objet, tel qu'une coupe histologique ; sous l'impact de ces ions, la surface se pulvérise et émet des atomes et des groupes atomes, dont certains ont perdu ou gagné un ou plusieurs électrons. Ce sont les **ions secondaires**. Ces ions sont accélérés par une tension régnant entre l'objet et une lentille électrostatique ; celle-ci forme une image agrandie de la surface de l'objet à l'aide de tous les ions capturés. Un diaphragme, dit de « cross-over » et un diaphragme de champ servent de fentes d'entrée pour un **spectromètre de masse** dont le champ magnétique fait éclater l'image initiale en autant d'images qu'il y a de charges spécifiques, $\frac{m}{e}$, différentes. Une fente de sélection isole une seule masse et un dispositif approprié permet d'observer l'image, de la photographier ou de la numériser. Une variation continue de l'induction magnétique fait défiler devant les fentes de sorties toutes les masses et permet d'acquérir des spectres de masse, couvrant toute la classification périodique.

B - Exemple d'image ionique ($^{40}Ca^+$, branchie de petite moule d'eau douce).

C - Exemple de spectre de masse, limité à la région des masses 12 à 52, avec l'indication des principaux éléments détectés ; les autres pics sont dus à des ions polyatomiques (CH à 13, C_3 à 36, PO à 47, etc...).

FIGURE 4 : Schéma d'un microscope à effet Raman. La lumière monochromatique cohérente émise par le laser est focalisée à la surface de l'objet par le jeu d'une optique de couplage et de l'objectif du microscope. La lumière diffusée par le point illuminé est reprise par l'objectif et transmise par l'intermédiaire d'une optique de transfert (adaptation d'ouverture numérique) à un spectromètre Raman, muni d'un détecteur mono - ou multicanal simultané. Un dispositif approprié, le plus souvent informatisé, restitue le **spectre de vibration moléculaire** qui permet d'identifier le corps illuminé. La séparation des faisceaux laser/diffusé est assurée par une **lame semi-transparente**. L'observation de l'objet et le pointage du laser se font sur un écran pour éviter les accidents liés au laser, après escamotage du miroir de renvoi vers l'optique de transfert.

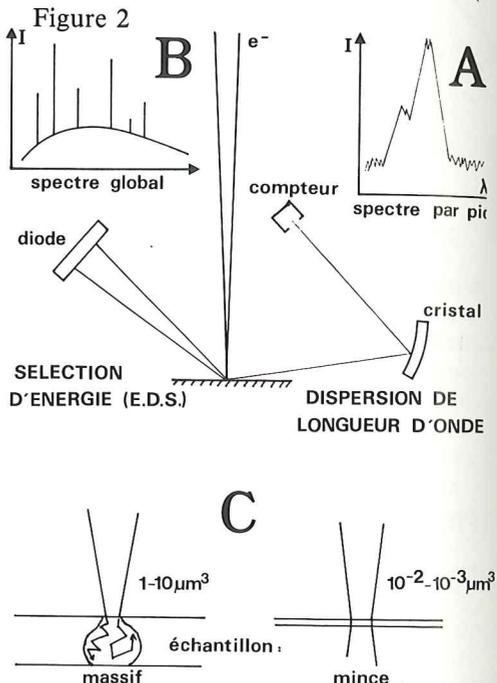
« bremsstrahlung » (fig. 1-C), causé par le freinage des électrons incidents dans la matière de l'échantillon, d'où son autre nom de rayonnement de freinage. Il s'agit d'un signal *non caractéristique* : il limite la détectivité de la méthode.

Actuellement, la plus petite tache de focalisation qui ait donné lieu à une analyse est de 1,5 nm ; dans la pratique courante, les surfaces analysées vont de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres.

Cet instrument peut être associé à un microscope photonique ou à un microscope électronique, en balayage de surface, en transmission classique ou en transmission par balayage (8, 9, 10). Pour l'historien, il s'agit donc aussi bien d'un moyen d'analyse élémentaire à l'échelle structurale qu'à l'échelle ultrastructurale. Il faut cependant rappeler que la détectivité est limitée : il faut, dans la plupart des cas, une concentration de 500 à 1 000 ppm dans le volume excité pour obtenir un signal caractéristique. En biologie (11), en dehors des éléments diffusibles (Na, K et Cl), ce niveau de concentration n'est généralement atteint que lorsqu'il y a accumulation locale d'un ou de plusieurs éléments ; cet appareil ne permet donc d'étudier que les BIOACCUMULATIONS, normales, expérimentales ou pathologiques.

La détermination de l'énergie des photons peut être faite selon deux types de spectrométries : à sélection d'énergie ou par dispersion de longueur d'onde. Ce dernier procédé est le plus ancien : c'est celui utilisé par Castaing dès 1950. Le rayonnement est dispersé par un cristal monochromateur selon l'angle de Bragg, et un compteur de type Geiger-Müller,

mais monté en régime proportionnel, délivre un signal dont l'amplitude est proportionnelle au nombre de photons qu'il reçoit chaque fois que le monochromateur isole un rayonnement (fig. 2-A). La résolution spectrale de ce montage est excellente, et l'analyse qualitative est donc particulièrement fiable ; seuls quelques cas d'indétermination subsistent, par exemple pour V et Ti ou pour Ag et Cd. En spectrométrie à sélection d'énergie (fig. 2-B), le récepteur est un simple semi-conducteur (généralement Si-Li) relié à une chaîne de comptage



multicanale dans laquelle les rayonnements sont rangés par ordre croissant d'énergie. Ces spectromètres permettent d'acquérir très rapidement (quelques dizaines à quelques centaines de secon-

des) le spectre complet. Ils présentent donc un avantage considérable sur les spectromètres de Castaing qui travaillent élément par élément ; le pilotage automatique par ordinateur des spectromètres à cristaux a toutefois réduit cet inconvénient dans les dernières années. En sélection d'énergie, la résolution spectrale est franchement mauvaise (20 fois moindre qu'en spectrométrie à cristaux) et les risques d'interférences ne sont pas négligeables, surtout dans le cas d'échantillons de composition complexe, comme c'est souvent le cas en biologie.

Dans les deux types de spectrométrie, la proportionnalité entre l'intensité du signal X et le nombre d'atomes qui l'émettent autorise une analyse quantitative ; cependant, les facteurs qui influent sur cette proportionnalité ne peuvent pas toujours être connus avec une précision suffisante dans le cas des échantillons biologiques. Une analyse semi-quantitative consistant à faire les rapports d'abondance entre deux éléments d'un même point analysé est toutefois possible, et maintenant bien au point (12). Longtemps objet de controverse, la limite de détectivité dans les deux types de spectrométrie dépend de l'appareillage lui-même ; il semble actuellement que l'avantage soit à la spectrométrie à dispersion de longueur d'onde.

Compte tenu de leurs avantages respectifs, il est aujourd'hui préférable de disposer d'instruments conçus pour recevoir les deux types de spectromètres : c'est la règle qui doit guider le choix de l'utilisateur si les problèmes de coût ne sont pas limitatifs.

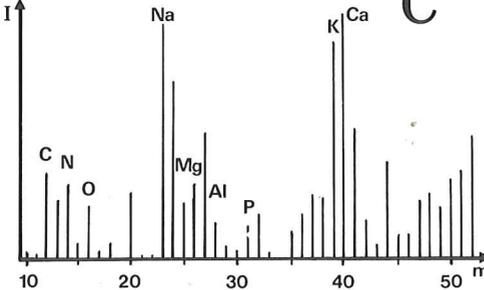
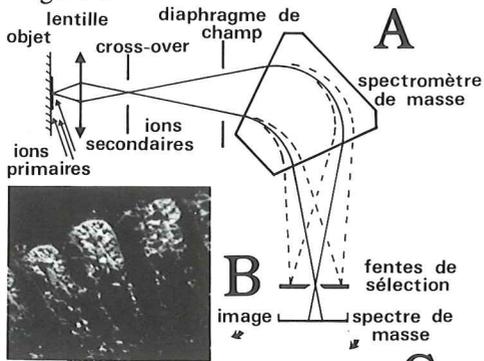
En biologie, selon que l'analyse se fait en microscopie photonique ou électronique, l'épaisseur des échantillons est très

différente. Lorsque l'épaisseur de la coupe est de un à plusieurs micromètres (résolution image micrométrique), la taille de sonde est de l'ordre du micromètre : l'échantillon est « massif » au regard de la sonde, dont tous les électrons se dispersent dans la matière de la coupe (fig. 2-C). Il y a DIFFUSION, et le volume analysé peut atteindre $10 \mu\text{m}^3$. Au contraire, lorsque la coupe n'excède pas 100 nm (0.1 μm), la plupart des électrons ne font que traverser l'échantillon, sans diffusion ; le volume analysé peut être alors couramment d'un centième de micromètre-cube (10 femto*-grammes), ou moins encore.

ANALYSEUR PAR ÉMISSION IONIQUE SECONDAIRE (fig. 3)

Ce microscope permet, comme la sonde électronique, l'analyse élémentaire : il se situe donc dans le même domaine d'application. Il s'en distingue toutefois par plusieurs particularités essentielles. D'une part, la résolution image, strictement limitée au micromètre, en fait un instrument d'analyse à l'échelle de la seule microscopie photonique. L'appareil, de par sa conception, n'interroge pas un point de l'échantillon, comme c'est le cas pour la sonde, mais une surface assez vaste (jusqu'à un quart de millimètre carré) pour laquelle il fournit des IMAGES de distribution des éléments identifiés (13). Cette cartographie élémentaire permet l'exploration d'un échantillon inconnu, où la localisation de l'élément n'est pas soupçonnée *A PRIORI*. Basé sur la spectrométrie de masse, l'instrument en possède les avantages : grande rapidité d'exploration du tableau périodique, analyse isotopique, identification d'éléments dont la pré-

Figure 3



sence n'était pas soupçonnée. Il en a aussi les inconvénients : à une même masse, des ions caractéristiques d'un élément peuvent se superposer à des combinaisons polyatomiques d'éléments plus légers. Il en résulte une complication de l'analyse qualitative, l'identification des éléments ne pouvant se faire qu'avec des spectromètres de masse assez puissants pour séparer les ions interférents, et après un long et patient travail d'identification des combinaisons polyatomiques. L'analyse quantitative au sens propre du terme n'est pas possible, les lois qui relient l'intensité d'émission à la concentration dans le volume pulvérisé n'étant pas encore connues avec précision ; seule une *évaluation* des teneurs peut être effectuée. Les limites de détection varient considérablement d'un élé-

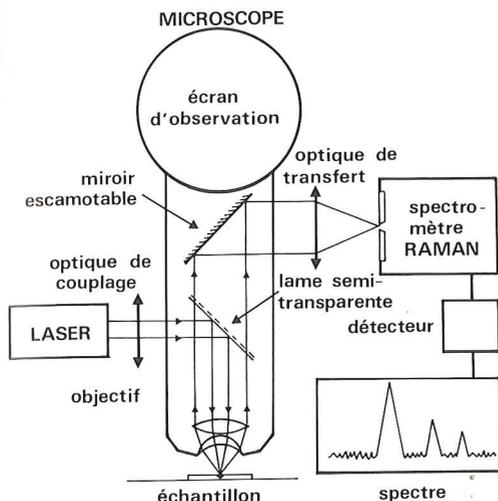
ment à l'autre et selon le mode opératoire, notamment la nature des ions primaires. C'est ainsi que l'or, très peu détectable sous bombardement d'oxygène peut être décelé à de très faibles concentrations sous bombardement de césium ; il en va de même pour le cuivre, l'iode, le phosphore et divers autres éléments. Pour les alcalins, les alcalino-terreux, et quelques éléments comme F ou Al, la détectivité est excellente et des concentrations inférieures à $10^{-9} \text{ng} \cdot \text{ng}^{-1}$ peuvent, dans certains cas, être décelées. Contrairement à la sonde électronique, l'analyseur ionique n'a donc pas besoin d'une concentration locale importante, et cet instrument permet d'étudier aussi bien les cas de bioaccumulation que ceux où les éléments sont en faible concentration dans l'échantillon analysé (14, 15, 16).

Cartographie et excellente détectivité pour certains éléments sont donc, avec l'analyse isotopique, les avantages essentiels de l'analyseur ionique sur la sonde électronique.

SONDE LASER RAMAN (fig. 4)

Les deux méthodes précédemment décrites possèdent une caractéristique commune : l'analyse élémentaire. Avec le microscope à effet Raman, ou sonde Raman, inventée par Michel Delhaye et réalisée par Paul Dhamelincourt, à Lille en 1973 (17), c'est le domaine de l'analyse MOLECULAIRE qui est abordé en microscopie analytique. Cet instrument est donc, par définition, complémentaire des précédents ; ceux-ci indiquent quels sont les éléments présents dans le volume analysé, le dernier indique la combinaison chimique dans laquelle ils sont engagés, et même, dans une certaine mesure, l'état physique.

Figure 4



La méthode utilisant une source d'excitation photonique, la plus petite taille illuminée correspond à la limite de diffraction, légèrement supérieure à la longueur d'onde. Les lasers les plus employés émettant dans la région visible du spectre électromagnétique (0.4 à $0.8 \mu\text{m}$ de longueur d'onde), la résolution est donc micrométrique, et la méthode est du domaine de la microscopie photonique.

Des efforts sont faits actuellement pour porter la méthode à l'échelle ultra-structurale par installation de la sonde dans un microscope électronique, la taille de la région excitée restant, bien entendu, du domaine micrométrique (18). En utilisant des sources ultra-violettes atmosphériques ($0,2$ à $0,4 \mu\text{m}$) ou sous vide ($0,1$ à $0,2 \mu\text{m}$), la taille de la sonde peut être réduite jusqu'à $0,15 \mu\text{m}$, mais il est peu probable d'aller au-delà. La méthode ne peut donc pas atteindre des structures aussi petites que celles qu'interroge la

sonde électronique. Par ailleurs, la détectivité est particulièrement mauvaise en Raman spontané : pratiquement, il faut que le produit soit pur dans le volume illuminé et, pour les sondes de faible volume, il faut qu'il s'agisse d'un produit ayant un bon coefficient de diffusion. En théorie, donc, TOUTE substance peut fournir un spectre Raman, et la méthode est universelle (19) ; en pratique, les structures qui délivrent un spectre sont peu nombreuses. Actuellement, ce sont surtout les structures minéralisées et les bioaccumulations puriques qui peuvent être étudiées (20, 21) mais les progrès de la spectrométrie Raman, en France et à l'étranger, sont continus, et des développements de cette microscopie moléculaire si prometteuse peuvent être espérés dans la prochaine décennie.

CONCLUSION

La microscopie analytique, spécialité nouvelle il y a vingt ans, est en pleine expansion et diversification rapide ; peu de méthodes ont cependant donné lieu à des applications biologiques. Parmi celles qui ont été citées, la plus ancienne est aussi la plus utilisée, vraisemblablement en raison de l'avance qu'elle possède. La microscopie par perte d'énergie des électrons qui, faute de place, n'a pas été abordée ici est également très prometteuse, mais soulève encore de grandes difficultés en biologie. L'utilisation performante de ces instruments, pour la plupart très sophistiqués et très coûteux à l'achat et à l'usage, demande aux biologistes un important effort de mise à niveau de leurs connaissances en physique ; espérons, par des articles comme celui-ci, les convaincre de l'intérêt qu'il y a à faire cet effort, car les résultats

qu'on peut obtenir sur des cellules ou des tissus le justifient.

* Z = 1 pour l'hydrogène, 2 pour l'hélium, 3 pour le lithium, 4 pour le beryllium, 5 pour le bore, 6 pour le carbone, etc... jusqu'à 92 pour l'uranium.

** 1 femtogramme = 10^{-15} g

RÉFÉRENCES

1. LISON L. *Histochimie et cytochimie animales*. Gauthier-Villars, ed., Paris, 1960, 1, 103-104.
2. CASTAING R. *Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle, chimique et cristallographique*. Thèse Doc. Etat, Univ. Paris, ONÉRA ed., Paris, 1952.
3. CASTAING R. EL HILI A. et HENRY L. *Microanalyse par images électroniques filtrées*. C. R. Acad. Sc. Paris, B. 1965, 261, 3999-4002.
4. CASTAING R. et SLODZIAN G. *Microanalyse par émission ionique secondaire*. J. Micr., 1962, 1 (6), 395-410.
5. HILLENKAMP F., UNSOLD E., KAUFMANN R. and NITSCHKE R. *High sensitivity laser micropobe mass analyser (LAMMA)*. App. Phys., 1975, 8, 341-348.
6. ELOY J.-F. *Recent developments in laser microprobe mass spectrometry (LPMS)*. Proc. 5th Int. Symp. « High purity materials in science and technology », Dresde, 1980.
7. DELHAYE M. and DHAMELIN-COURT P. *Raman Microprobe and Microscope with laser excitation*. J. Raman Spectrosc., 1975, 3, 33-43.
8. MAURICE F., MENY L. et TIXIER R. *Microanalyse et Microscopie électronique à balayage*. Ecole d'été de Saint-Martin d'Hères, sept. 1978, Les Editions de Physique, Ed. Orsay.
9. EBERHARDT J.-P. *Méthodes physiques d'étude des minéraux et des matériaux solides*. Douin ed., Paris, 1976.
10. BENOIT D., GRILLON F., MAURICE F., ROINEL N., RUSTE J. et TIXIER R. *Microanalyse par sonde électronique : spectrométrie de rayons X*. A.N.R.T., Ed., Paris, 1987.
11. QUINTANA C. et HALPERN S. *Microanalyse X en biologie*. S.F.M.E., Ed., Paris, 1983.
12. BALLAN-DUFRAŒAIS C., RUSTE J. and JEANTET A.Y. *Quantitative electron probe microanalysis on insects exposed to mercury. I. Methods. And approach on the molecular form of the stored mercury ; possible occurrence of metallo-thionein-like proteins*. Biol. Cell, 1980, 39 (3), 317-324.
13. SLODZIAN G. *Etude d'une méthode d'analyse locale chimique et isotopique utilisant l'émission ionique secondaire*. Thèse Doc. Etat, Masson Ed., Paris, 1964.

14. TRUCHET M. Application de la microanalyse par émission ionique secondaire aux coupes histologiques : localisation des principaux isotopes de divers éléments. *J. Microscopie Biol. Cell.*, 1975, **24** (1), 1-22.
15. BURNS M. Applications of secondary ion mass spectrometry (SIMS) in Biological Research : A review. *J. Microscopie*, 1982, **127**, 237-249.
16. TRUCHET M. Etude de deux nouvelles méthodes d'analyse histologique : analyse élémentaire par émission ionique secondaire et analyse moléculaire par diffusion Raman ; méthodologie et exemples d'application. Thèse Doc. Etat, Univ. P. et M. Curie, Paris, 1982.
17. DHAMELIN COURT P. Etude et réalisation d'une microsonde moléculaire à effet Raman ; quelques domaines d'application. Thèse Doc. Etat, Univ. Sc. et Tech. de Lille, 1979.
18. TRUCHET M. et DELHAYE M. Couplage d'une sonde Raman-laser et d'une sonde de Castaing dans un microscope électronique. *J. Microsc. Spectrosc. Electron.*, 1988, **13**, 167-175.
19. ALIX A.J.P., BERNARD L. and MANFAIT M. Spectroscopy of Biological Molecules. John Wiley & Sons, Chichester, 1985.
20. BALLAN-DUFRANÇAIS C., TRUCHET M. and DHAMELIN COURT P. Interest of Raman Laser Microprobe (MOLE) for the Identification of Purinic Concretions in Histological Sections. *Biol. Cell.*, 1979, **36** (1), 51-58.
21. TRUCHET M., MARTOJA M., MARTOJA R. et BALLAN-DUFRANÇAIS C. Applications de la MOLE à l'identification de composés puriques et de sels minéraux sur coupe histologique. *Actual. Chim.*, avril 1980, 15-18.