

LOCALISATION DES RECEPTEURS AMPA/KAÏNATE DANS LES ORGANES PERIPHERIQUES CHEZ *XENOPUS LAEVIS* PAR IMMUNOHISTOCHIMIE

J. ESTABEL et J.M. EXBRAYAT

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

INTRODUCTION

Les récepteurs du glutamate ont été très étudiés dans le système nerveux (1). Ces récepteurs présentent cependant d'autres localisations qui leur confèrent diverses fonctions telles que leurs implications dans la régulation hormonale (pancréas et glandes adrénales chez le rat) (2). Par immunohistochemie, Gill *et al* ont montré la présence de tels récepteurs sur différents types cellulaires comme les kératinocytes humains, les myocardiocytes, les cellules des bourgeons du goût, de l'adénohypophyse, de la glande pinéale et dans divers organes tels que les organes génitaux, le rein, le foie et la rate chez les rongeurs (2, 3). Ces tissus périphériques contenant des récepteurs peuvent être les cibles potentielles pour des molécules toxiques (4, 5, 6).

La localisation des sous-unités des récepteurs du glutamate peut alors être corrélée aux effets des intoxications par des agonistes du glutamate comme l'acide domoïque par exemple. Ce dernier provoque

des perturbations gastro-intestinales, un collapsus cardio-vasculaire, une arythmie cardiaque et des lésions cérébrales (2)

La localisation de ces sous-unités est également intéressante à connaître dans le but de mener *in vivo* des études de toxicologie chez des têtards de *Xenopus laevis*. Les Amphibiens Anoures et notamment les têtards représentent en effet un matériel de choix pour évaluer les effets de molécules toxiques (5). *Xenopus laevis* est une espèce couramment utilisée dans divers domaines de la biologie. Le but de ce travail a été de mettre en évidence, par immunohistochemie, la présence de récepteurs AMPA/kaïnate dans les organes périphériques de cette espèce.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel Biologique

Les têtards de *Xenopus laevis* ont été obtenus par fécondation *in vitro*. La fécon-

dation se fait avec des femelles à maturité sexuelle. La ponte est induite par injection dans les sacs lymphatiques dorsaux de 500 U.I. de H.C.G. Le sperme est récupéré par prélèvement des testicules chez un mâle. La fécondation est réalisée à sec dans des boîtes de Pétri en mettant en contact les œufs et le sperme. Après 72 heures à +20°C, les têtards éclosent et sont nourris avec du velouté de cresson (Knorr) tous les jours.

Préparation des Tissus

Les têtards sont fixés dans du paraformaldéhyde à 4 % refroidi, puis inclus en paraffine. Les coupes sont réalisées à 5 µm puis collées sur des lames Superfrost® plus.

Une coloration topographique, le trichrome de Masson-Goldner, est appliqué sur une lame toutes les cinq d'une série de coupes.

Immunohistochimie

L'utilisation du complexe streptavidine-biotine a permis l'amplification du marquage. Le kit de révélation utilisé est le LSAB 2 (Dako), basé sur l'action de la peroxydase sur un mélange de peroxyde d'hydrogène et de diaminobenzidine (DAB). Les récepteurs du glutamate ont été mis en évidence par application d'un Ac anti-GluR2/3 (2 µg/mL) (Chemicon)

Pour chaque manipulation, des témoins négatifs par omission des Ac sont réalisés afin de vérifier la spécificité des Ac et la validité du Kit.

Mode opératoire

- Incuber les coupes déparaffinées 5 mn

dans le mélange P.B.S. + H₂O₂ (110 vol) à 3%. Cette étape permet le blocage des peroxydases endogènes. Rincer au P.B.S.

- Appliquer l'Ac primaire : 30 mn à température ambiante. Rincer au PBS: 2 x 5 mn
- Appliquer l'Ac secondaire: 30 mn à température ambiante. Rincer au PBS: 2 x 5 mn
- Appliquer le complexe Streptavidine-Peroxydase : 30 mn à température ambiante. Rincer au PBS: 2 x 5 mn
- Ajouter la solution Substrat - Chromogène: 10 mn à température ambiante. Rincer à l'eau distillée
- Contre-colorer à l'hématoxyline: 1 mn à température ambiante
- Rincer à l'eau distillée. Monter au Crystal Mount®. Laisser polymériser minimum 1h à 60°C. Observer. Les zones marquées sont colorées en brun.

RÉSULTATS

Les témoins négatifs ne présentent pas de marquage ni de bruit de fond. Les peroxydases endogènes ont été correctement bloquées.

Les marquages ont été réalisés à deux stades de développement: stades 50 et 54. Pour ces deux stades, les marquages sont localisés sur les mêmes organes. Le marquage obtenu est cytoplasmique. Ce marquage peut être observé dans certains compartiments cellulaires comme le pôle apical des entérocytes. Les marquages sont plus ou moins intenses suivant les organes observés.

Les muscles squelettiques et cardiaques

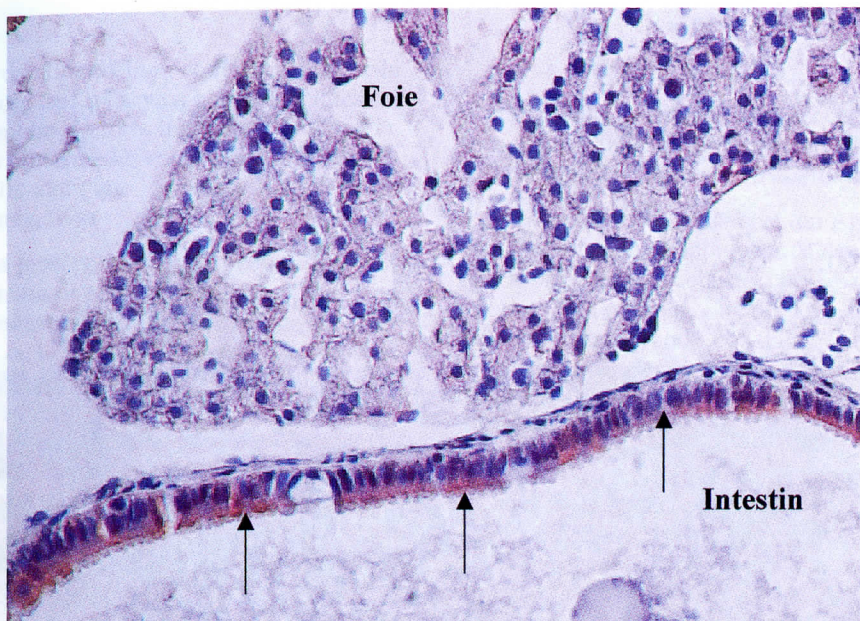


Figure 1: Marquage GluR2/3 dans les cellules intestinales (Stade 50).

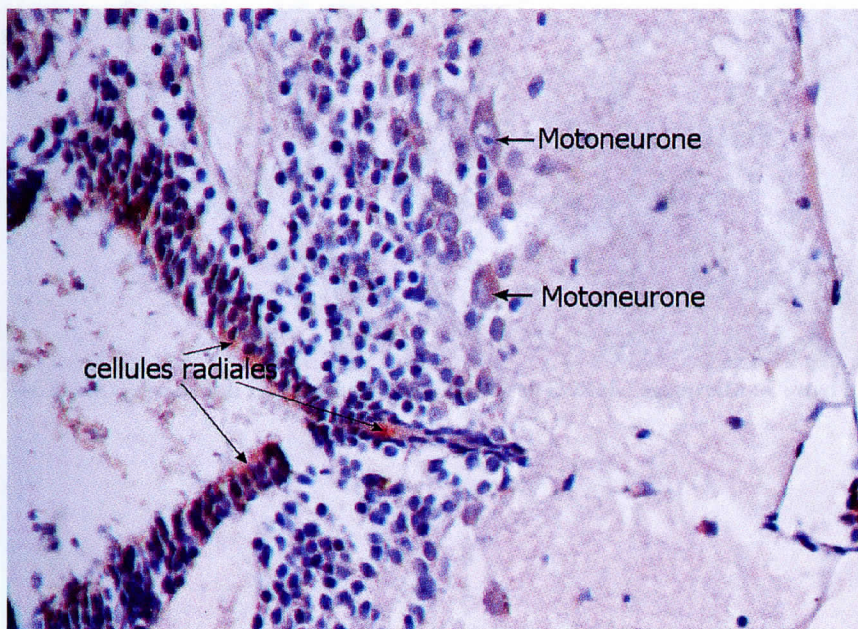


Figure 2: Marquage GluR2/3 dans la médulla oblongata (stade 54)

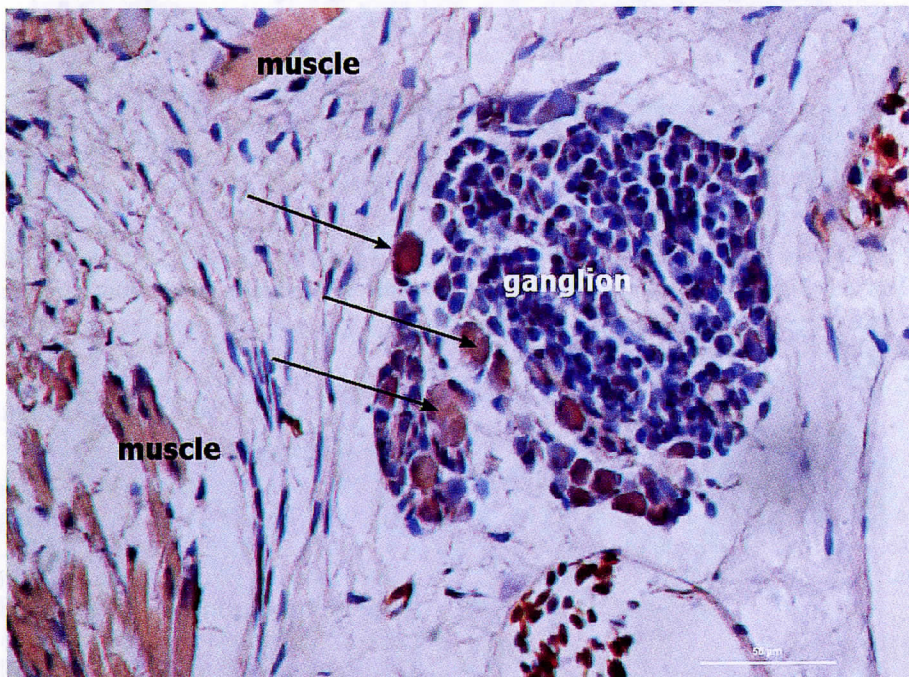


Figure 3 : Marquage GluR2/3 des cellules ganglionnaires et des muscles (Stade 54)

ainsi que l'épithélium de certaines zones du tube digestif (pharynx, estomac et intestin) présentent de forts marquages (Figure 1). Dans l'intestin, les entérocytes sont GluR_{2/3} positifs alors que les cellules caliciformes sont négatives.

La peau présente également des cellules fortement marquées. Certains organes sont totalement négatifs comme le foie, les branchies ou le cartilage (Figure 1). Ces organes peuvent servir de témoins internes négatifs pour valider l'immunomarquage. Des marquages sont également observés dans les tubules rénaux. Dans le système nerveux central (SNC), les cellules radiales péri-ventriculaires, les motoneurones et les cellules ganglionnaires présentent un marquage (Figures 2 et 3).

CONCLUSIONS

Cette étude a permis de localiser certaines sous-unités (GluR_{2/3}) des récepteurs AMPA/Kainate chez les têtards de *Xenopus laevis*.

Ces résultats obtenus chez un Amphibien Anoure sont à rapprocher de ceux qui ont été précédemment obtenus chez les mammifères (3,4), ce qui montre qu'il existe certainement une grande constance dans la répartition, chez les Vertébrés, de ces molécules, par ailleurs particulièrement conservées au cours de l'évolution biologique.

L'examen de têtards mis au contact de molécules agonistes ou antagonistes du glutamate devrait permettre de mettre en évidence si ces molécules ont une quelconque effet sur la répartition des récepteurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. KÖNIG N. ; POLUCH S.; ESTABEL J.; DURAND M.; DRIAN M. J.; EXBRAYAT J.M. 2001. Jpn. J. Pharmacol. 86(1) :1-17.
2. GILL SS, PULIDO OM, MUELLER RW, MCGUIRE PF (1998) Brain Res Bull 46(5):429-434.
3. GILL SS, MUELLER RW, MCGUIRE PF, PULIDO OM (2000) Toxicol Pathol 28(2):277-284.
4. GILL SS, PULIDO OM (2001) Toxicol Pathol 29(2):208-223.
5. DEVILLERS J. ET EXBRAYAT J.-M. (1992). Gordon and Breach Science Publishers, Philadelphia.
6. QIN P, POURCHO RG (2001) Brain Res 890:211-221.

DE L'ADIPOCYTE A L'OBESITE, DE CRO-MAGNON A LA MONDIALISATION

A. GÉLOËN

UMR 585, INSERM / INSA de Lyon (affiliée au CNRS)

Physiopathologie des lipides et membranes

Bât. L. Pasteur, 20 Avenue A. Einstein, 69621 Villeurbanne Cedex, France.

En ce début de XXI^e siècle, l'obésité est une pathologie qui prend une ampleur sans précédent dans les pays occidentalisés. Certains auteurs n'hésitent pas à parler d'épidémie pour évoquer l'augmentation très rapide de cet état. Bien que l'obésité ne soit pas, au sens strict une pathologie, elle est étroitement associée à l'apparition de certaines pathologies graves comme le diabète de type II, les maladies cardio-vasculaires, l'hypertension et certains cancers. De telle sorte que l'espérance de vie des personnes obèses est inférieure à celles qui ont une masse corporelle proportionnée à leur taille. Cette observation est mise à profit par les compagnies d'assurances américaines qui font payer les assurances vie en fonction du rapport de la taille/masse corporelle. En dehors de cet épiphénomène du libéralisme, il est vrai que l'incidence croissante de l'obésité pose un problème de santé publique qu'il est urgent de résoudre. L'objectif de cet article est d'expliquer en termes simples les mécanismes qui président à la mise en place d'une surcharge adipeuse.

Dans une seconde partie, nous verrons, en considérant l'évolution de l'Homme, pourquoi la fréquence de l'obésité augmente précisément dans le contexte socio-culturel qui est le nôtre et pourquoi, malgré les progrès spectaculaires des connaissances en particulier en biologie moléculaire, il est fort peu probable d'identifier un gène responsable de l'obésité.

Les tissus adipeux. Les Mammifères possèdent deux types de tissus adipeux. Un tissu adipeux brun très riche en mitochondries qui est spécialisé dans la production de chaleur et un tissu adipeux blanc qui est spécialisé dans la mise en réserve des lipides. Le tissu adipeux brun joue un rôle important dans le maintien de la température interne (homéothermie) surtout à la naissance qui est pour le nouveau-né un stress thermique. En effet, il passe du ventre maternel à 37°C à la salle d'accouchement dont le confort thermique est calculé pour les adultes et non pour les nouveau-nés. La capacité thermo-

génique du tissu adipeux brun est assurée par la présence d'une protéine appelée découplante car elle provoque un découplage entre oxydations et phosphorylations dans la membrane interne des mitochondries. Le second mécanisme qui assure une forte production de chaleur à ce tissu est une augmentation importante du nombre de ses cellules. Nous avons utilisé cette capacité de prolifération cellulaire pour étudier les mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire dans le tissu adipeux brun de rats soumis au froid.

Sur la piste des cellules souches. Afin d'identifier la nature de cette prolifération et d'identifier les cellules adipeuses souches, nous avons injecté de la thymidine tritiée à des rats exposés au froid depuis 2 jours en sachant que cela correspondait au pic de prolifération cellulaire (Bukowiecki et al. 1986¹). Notre objectif était de marquer le plus grand nombre de cellules souches, puis en sacrifiant les animaux au cours de l'exposition prolongée au froid, nous voulions en suivant la thymidine tritiée, étudier le devenir des cellules marquées initialement. Les animaux témoins étaient conservés à la neutralité thermique. Les animaux expérimentaux ont été exposés à 4°C. Tous les animaux ont reçu une dose de thymidine exactement après 44 heures d'exposition au froid, ce qui correspond au pic de prolifération cellulaire. Ils ont été ensuite sacrifiés 4 heures, deux, six et quinze jours, après avoir reçu la thymidine tritiée, ce qui correspond à 2, 4, 8 et 17 jours d'exposition au froid. Après le sacrifice, le tissu adipeux brun interscapulaire a été prélevé, fixé et

coupé en section semi-fines (0,5µm) pour être étudié en microscopie photonique. La thymidine tritiée a été révélée par une émulsion photosensible (Kodak, NTB2). Quatre types cellulaires principaux ont été identifiés d'après des caractéristiques morphologiques : les cellules endothéliales des capillaires sanguins, les cellules interstitielles non différenciées (Figure 1), les préadipocytes contenant de petites inclusions lipidiques (Figure 2) et les adipocytes bruns contenant de nombreuses vacuoles lipidiques, tout l'espace cytoplasmique est occupé par des mitochondries (Figure 3). Les résultats mettent en évidence que les cellules endothéliales (Figure 4) incorporent rapidement la thymidine tritiée. Le marquage des cellules endothéliales reste constant tout au long de l'exposition au froid. A part les cellules endothéliales, la population de cellules qui incorpore le plus rapidement la thymidine tritiée sont les cellules interstitielles, de petites cellules non différenciées qui sont situées dans les interstices des adipocytes, raison pour laquelle nous les avons appelées interstitielles (Figure 5). Cependant la radioactivité diminue progressivement dans ces cellules au cours de l'exposition au froid, sans toutefois disparaître complètement en fin d'expérience. Un pic d'accumulation de thymidine apparaît dans les préadipocytes deux jours après l'injection de thymidine puis la fréquence des préadipocytes marqués diminue et devient nulle en fin d'expérience. Enfin le nombre des adipocytes bruns marqués augmente de plus en plus au cours de l'exposition au froid. Rappelons que la thymidine ne reste présente que quelques heures dans l'organisme après son injection. La seule expli-

¹BUKOWIECKI L. J., GÉLOËN A., and A.J. COLLET. Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *Am. J. Physiol.* 250, C880-C887, 1986.



Figure 1 : Photographie en microscopie électronique d'une cellule interstitielle du tissu adipeux brun. Noter l'absence de gouttelette de triglycérides, le noyau allongé avec la chromatine condensée, l'espace cytoplasmique restreint le faible nombre de mitochondries et l'abondance du reticulum endoplasmique. (agrandissement 28 000).

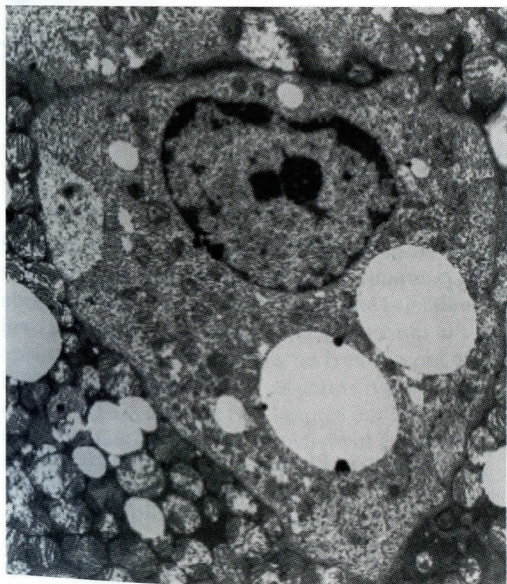


Figure 2 : Photographie en microscopie électronique d'un préadipocyte du tissu adipeux brun. Ce type cellulaire est caractérisé par la présence de quelques gouttelettes lipidiques, la présence de quelques mitochondries et des espaces cytoplasmiques sans organites cellulaires (agrandissement 16600).

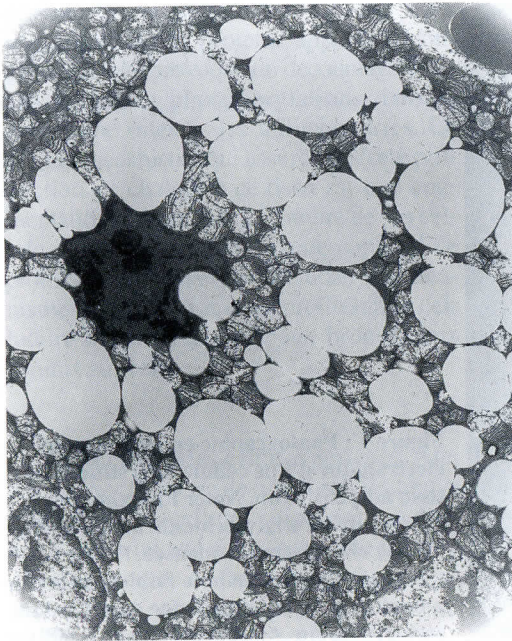


Figure 3 : Photographie en microscopie électronique d'un adipocyte brun. Noter l'abondance de gouttelettes lipidiques. A l'exception des inclusions lipidiques, tout l'espace cytoplasmique est occupé par des mitochondries (agrandissement 11300).



Figure 4 : Photographie en microscopie électronique d'une cellule endothéliale. Le prolongement cellulaire définit l'espace capillaire dans lequel on observe un globule rouge. (agrandissement 14 000).

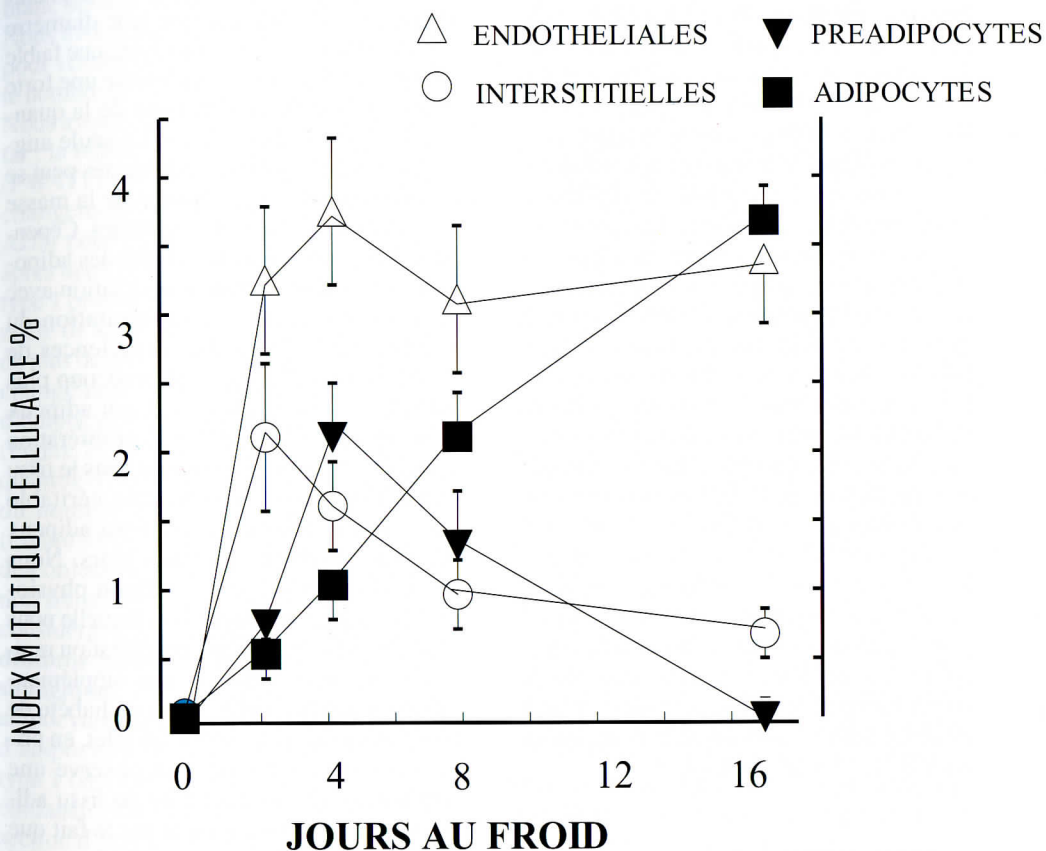


Figure 5 : L'index mitotique cellulaire est le nombre de noyaux ayant incorporé la thymidine tritiée, exprimé en pourcentage, pour chaque type cellulaire. Les animaux témoins sont placés à la neutralité thermique, ils ont reçu une injection de thymidine tritiée quatre heures avant le sacrifice (jour 0). Les animaux exposés au froid ont reçu une injection de thymidine tritiée 44 heures après le début de l'exposition au froid. Ils ont été sacrifiés 4 heures, deux, six et quinze jours après l'injection de thymidine. Les points représentent les moyennes \pm SEM pour quatre animaux, au moins 800 noyaux ont été comptés par animal. Les résultats mettent en évidence que les cellules endothéliales incorporent rapidement la thymidine tritiée. Le marquage des cellules endothéliales reste constant pendant toute la durée de l'exposition au froid. Les cellules interstitielles sont marquées rapidement (jour deux). Le marquage diminue ensuite. Le marquage des préadipocytes augmente transitoirement (maximum jour 4) puis diminue et disparaît complètement. Le marquage des adipocytes différenciés augmente sans cesse tout au long de l'exposition au froid, alors que la thymidine tritiée n'est plus présente dans l'organisme.

cation rationnelle de ces observations est que les cellules endothéliales des capillaires sanguins se divisent pour donner des cellules endothéliales. Pour les cellules adipeuses, le mécanisme est plus complexe, les cellules interstitielles sont les cellules souches qui se divisent, une partie des cellules filles se différencient en préadipocytes, ce qui explique le marquage des préadipocytes alors qu'il n'y a plus de thymidine circulante dans l'organisme. Les préadipocytes se transforment ensuite en adipocytes bruns dont le marquage augmente sans cesse au cours de l'expérience. Ce travail a permis de mettre en évidence l'existence de cellules souches présentes en permanence dans le tissu adipeux brun. Il existe un continuum des cellules souches aux adipocytes en passant par les préadipocytes. Toutes les étapes intermédiaires de la transformation sont observables *in vivo* (Géloën et al. 1990²). Il est important de se souvenir que ces cellules souches sont à tout moment capables de se diviser en réponse aux stimuli appropriés et de donner des cellules adipeuses (Géloën et al. 1992³). Si cette cascade de prolifération et de différenciation est plutôt salutaire dans le tissu adipeux brun, qu'en est-il du tissu adipeux blanc ?

L'augmentation de la masse du tissu adipeux blanc peut être spectaculaire, ce qui se traduit par l'obésité. Cette augmentation de la masse du tissu adipeux blanc résulte de deux mécanismes différents.

D'abord une augmentation de la taille des adipocytes. Les adipocytes peuvent être schématiquement représentés par des sphères (Figure 6), c'est-à-dire que leur diamètre est une fonction cubique du rayon, une faible augmentation du rayon représente une forte augmentation du volume donc de la quantité de triglycérides stockés. La seule augmentation de la taille des adipocytes peut se traduire par une augmentation de la masse corporelle de plusieurs kilogrammes. Cependant, l'augmentation de la taille des adipocytes se produit en intime association avec un autre mécanisme, l'augmentation du nombre des cellules. Les expériences de prolifération cellulaire sont beaucoup plus difficiles à réaliser dans le tissu adipeux blanc que dans le brun, car la prolifération cellulaire est un processus lent dans le tissu blanc alors qu'on observe une véritable explosion cellulaire dans le tissu adipeux brun en seulement quelques jours. Nous avons donc utilisé une condition physiopathologique particulière dans laquelle nous pouvions bénéficier d'une prolifération rapide des adipocytes blancs : une supplémentation en insuline après un mois diabète de type I (Géloën et al. 1989⁴). En effet, en privant d'insuline des rats, on observe une diminution très spectaculaire du tissu adipeux blanc. Ceci s'explique par le fait que l'absence d'insuline diminue très fortement l'utilisation du glucose par les tissus insulino-sensibles ce qui est interprété par l'organisme comme un jeûne avec comme conséquence la mobilisation des réserves

²GÉLOËN A., A.J. COLLET, G. GUAY and L.J. BUKOWIECKI. In vivo differentiation of brown adipocyte in adult mice : an electron microscopic study. Am. J. Anat. 188, 366-372, 1990.

³GÉLOËN A., A.J. COLLET and L.J. BUKOWIECKI. Role of sympathetic innervation in brown adipocyte proliferation. Am. J. Physiol. 263, R1176-R1181, 1992.

⁴GÉLOËN A., P. E. ROY and J.L. BUKOWIECKI. Regression of white adipose tissue in diabetic rats. Am. J. Physiol. 257, R547-R553, 1989.

lipidiques. Cette mobilisation des lipides peut-être extrême puisqu'après un mois de diabète de type I non traité, le tissu adipeux blanc semble avoir disparu complètement. Nous avons donc profité de cette opportunité pour vérifier ce qui est un véritable dogme : le nombre des adipocytes ne diminue jamais. Nous avons donc mesuré chez des rats Wistar : la masse de tissus adipeux paramétrial (PWAT) et rétro-péritonéal (RPWAT), les changements de masse et de contenu en ADN pour évaluer le nombre de cellules, après deux et quatre semaines de diabète de type I provoqué par l'injection intrapéritonéale de streptozotocine. Malgré une perte de plus de six fois de la masse de tissu aucun changement du nombre de cellules donc d'adipocytes ne se produit dans le PWAT (Figure 7). On observe une diminution de la quantité d'ADN, suggérant une diminution du nombre d'adipocytes dans le RWAT (Figure 8), cependant dans des conditions si draconiennes (un mois de diabète de type I non traité) qu'à toute fin pratique on peut considérer que **le nombre d'adipocytes ne diminue jamais dans les conditions physiologiques**. La figure 9 montre la taille des adipocytes chez un rat témoin (A) et celle d'adipocytes après un mois de diabète de type I (B). On comprend aisément la discordance entre ce que l'on observe à la dissection d'un rat diabétique : la quasi disparition du tissu adipeux blanc, et ce que l'on mesure : pas ou une faible diminution de l'ADN, c'est-à-dire du nombre d'adipocytes. La privation en insuline induit une très forte diminution des triglycérides stockés dans les adipocytes, mais leur nombre ne diminue pas. Nous avons voulu stimuler le tissu adipeux des rats diabétiques pour induire une augmentation du nombre des adipocytes en les traitant avec de l'insuline. L'insuline est une hormone lipogénique qui stimule fortement l'accumulation des tri-

glycérides dans les adipocytes. De cette façon, nous espérons augmenter rapidement la taille et induire une augmentation du nombre des adipocytes. Notre objectif était d'identifier, les cellules souches du tissu adipeux blanc. Nous avons traité les animaux diabétiques type I depuis un mois recevant de l'insuline avec de la thymidine tritiée quatre heures avant le sacrifice qui a été réalisé après un, quatre et huit jours de traitement avec l'insuline. Nous avons observé une augmentation rapide de la masse du tissu PWAT dès le premier jour de traitement des animaux mais la thymidine ne s'est incorporée dans les cellules interstitielles qu'après quatre jours de traitement. Ceci signifie que les adipocytes doivent d'abord atteindre une taille critique pour que le recrutement de nouveaux adipocytes à partir des cellules souches interstitielles se produise. En conclusion, les travaux réalisés sur les tissus adipeux blancs et brun montrent que le mécanisme de prolifération cellulaire met en jeu une population de cellules souches interstitielles qui se divisent et dont une partie des cellules filles se transforment en préadipocytes qui se transforment en adipocytes. Comme **les cellules souches sont présentes en permanence dans le tissu adipeux blanc, elles sont capables de proliférer à tout instant** en réponse aux stimuli appropriés, c'est-à-dire que le nombre des adipocytes peut toujours augmenter. Par contre, le nombre des adipocytes ne diminue vraisemblablement jamais de façon significative dans les conditions physiologiques.

Si l'augmentation de la taille des adipocytes provoque le recrutement de nouveaux adipocytes et de cette façon une augmentation de la masse du tissu adipeux, **pourquoi la taille des adipocytes augmente-t-elle ?** Il faut, pour bien comprendre

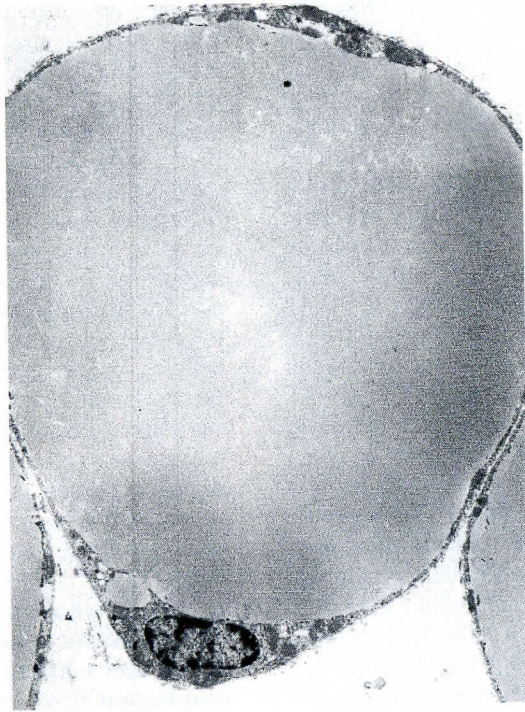


Figure 6 : Photographie en microscopie électronique d'un adipocyte blanc.
Noter l'importance de la gouttelette lipidique unique qui occupe l'essentiel de l'espace cellulaire, l'espace cytoplasmique limité, la rareté des mitochondries (agrandissement 4000).

MASSE DU PWAT

CONTENU EN ADN

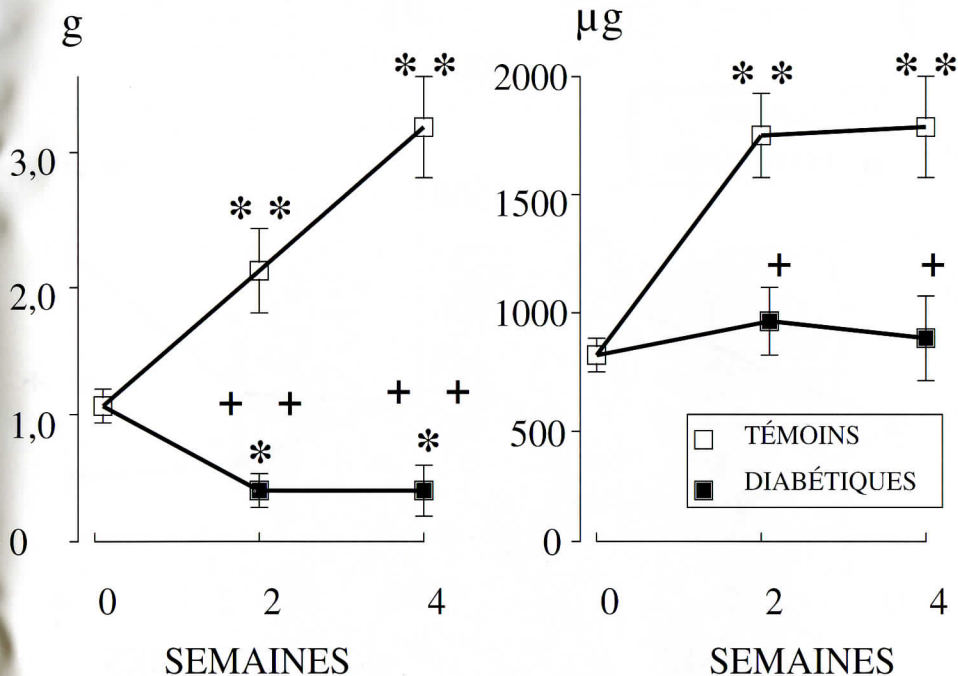


Figure 7 : Evolution de la masse du tissu adipeux blanc paramétrial de rat témoins et diabétiques de type I au cours du temps. Les valeurs représentent des moyennes \pm SEM (n=10). Noter que la quantité d'ADN n'est pas diminuée après un mois de diabète (* indique une différence significative entre témoins et diabétiques, + indique une différence entre deux et quatre semaines pour un même groupe).

MASSE DU RWAT

CONTENU EN ADN

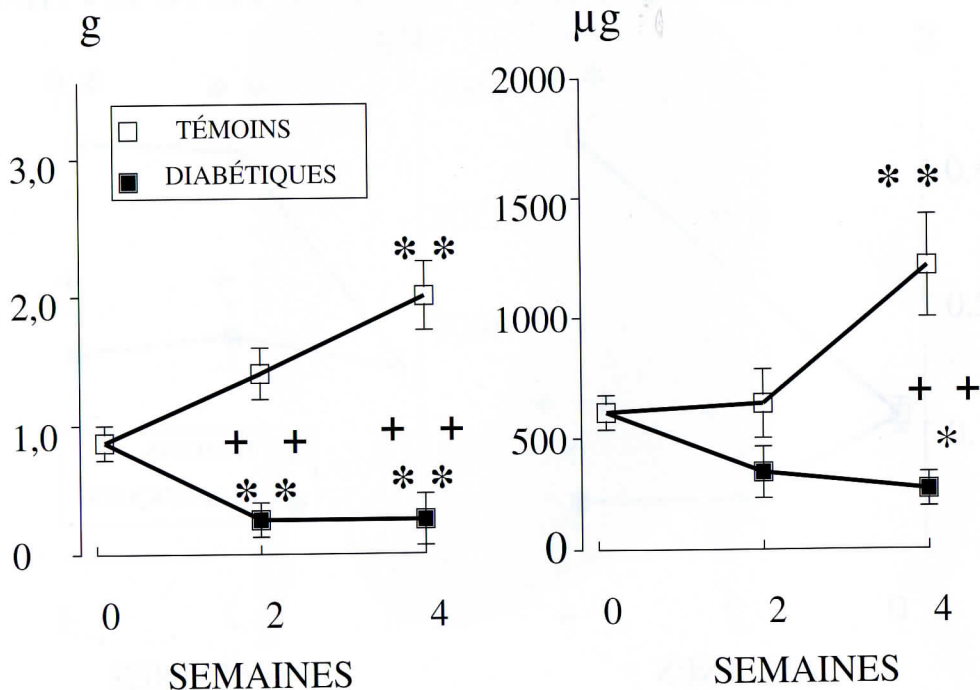


Figure 8 : Evolution de la masse du tissu adipeux blanc rétro-péritonéal de rat témoins et diabétiques de type I au cours du temps. Les valeurs représentent des moyennes \pm SEM (n=10). Noter que la quantité d'ADN est diminuée après un mois de diabète. RWAT (* indique une différence significative entre 0 versus 2 et 4 semaines pour un même groupe, + indique une différence entre les deux groupes).

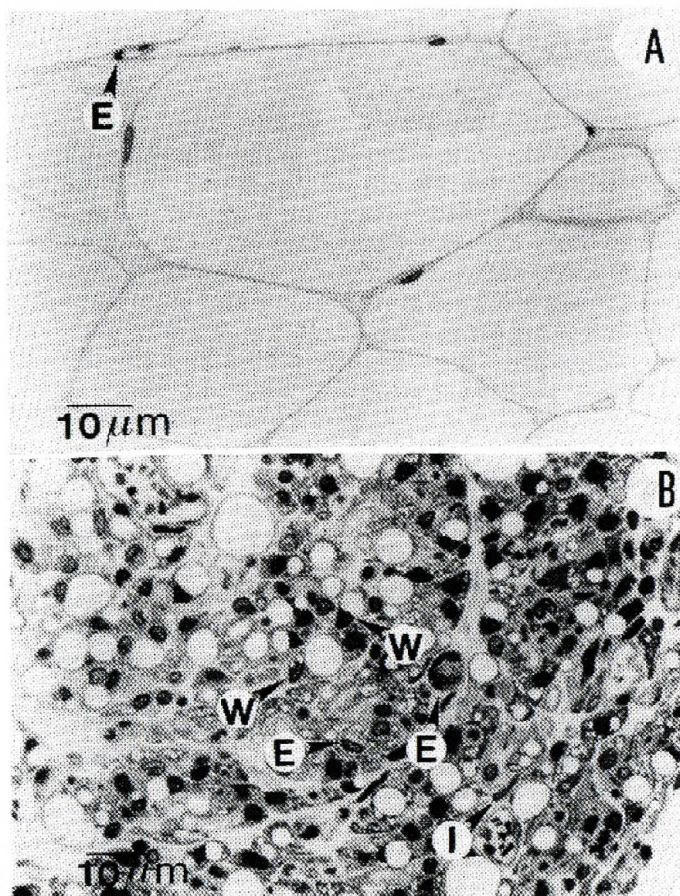


Figure 9 : Section en microscopie photonique du tissu adipeux blanc paramétrial de rat témoin (A) et après un mois de diabète de type I (B).

cela, quitter l'échelle cellulaire et se placer à un degré d'intégration plus complexe, celui de l'organisme entier. La masse corporelle d'un individu est le résultat d'un équilibre entre les apports caloriques de sa ration alimentaire et sa dépense énergétique. Un apport calorique supérieur aux dépenses conduit inévitablement à mettre en réserve les calories ingérées qui ne seront pas dépensées et donc à une augmentation de la masse corporelle. Un déficit de l'apport calorique par rapport aux dépenses résulte immanquablement en une diminution de la masse corporelle. Il ne s'agit pas là de biologie mais de physique, plus précisément de la première loi de la thermodynamique qui dit : "au cours d'un processus quelconque, l'énergie peut changer de forme mais ne peut être ni créée ni détruite". Cela signifie qu'aucun dérèglement hormonal ou nerveux ne peut créer de l'énergie et que les kilos de graisse accumulés résultent d'une prise alimentaire supérieure aux dépenses énergétiques. Sachant cela, on comprend aisément que l'on peut grossir en mangeant seulement 600 kcal par jour, si on n'en dépense que 400 et que l'on peut maigrir en mangeant 6000 kcal par jour si on en dépense 6500. Ce qui est important, ce n'est pas seulement ce que l'on mange mais aussi ce que l'on dépense.

La quantité de calories ingérées et la valeur de la dépense énergétique sont des paramètres importants. Il en est de même de la nature des calories ingérées. Un homme adulte d'environ 70 kg est constitué de 2000 kcal de glucides, 40 000 kcal de protéines et 125 000 kcal de lipides. Un apport

quotidien équilibré est constitué d'environ 1000 kcal de glucides, 1000 kcal de lipides et 500 kcal de protéines. Les protéines sont pour l'essentiel constitutives du cytosquelette cellulaire et à ce titre jouent peu de rôle dans la surcharge pondérale. Les glucides ingérés journalièrement représentent la moitié de la quantité de sucres stockés dans l'organisme. On comprend que ce n'est pas en mangeant trop de sucres que l'on peut devenir obèse, d'autant plus que chez l'homme les glucides participent peu à la lipogenèse dans les conditions normales (Hellerstein 1996⁵). Les lipides ingérés quotidiennement représentent moins de 1 % des lipides en réserve dans l'organisme. Il est très difficile pour un système de régulation biologique, d'assurer une précision inférieure à 1 %. L'excès de lipides ingérés journalièrement est stocké dans la masse des lipides de l'organisme. Cet excès passe inaperçu au jour le jour, mais il est inexorablement mis en réserve dans les adipocytes. Une légère déviation de la consigne de régulation de la masse grasse de seulement 10 g par jour (ce qui est infime pour un homme de 70 kg) résulte en une accumulation d'un peu moins de 4 kg de graisse par an et de 40 kg en dix ans. C'est donc surtout l'excès de lipides ingérés qui est propice à l'engraissement. Même si nous n'avons pas l'impression de manger très gras, les graisses "cachées", c'est-à-dire présentes à notre insu sont extrêmement abondantes, notamment dans les plats préparés. Pire encore, par facilité et mesure d'économie, l'industrie alimentaire utilise en majorité des graisses saturées dont de nombreuses études ont montré les effets délétères sur la santé.

⁵HELLERSTEIN M. K. Synthesis of fat in response to alterations in diet : insights from new stable isotope methodologies. *Lipids* 31 : S117-125, 1996.

FAST FOOD = NÉFASTE FOOD

Pourquoi l'alimentation rapide est-elle globalement néfaste pour la santé ? Pour plusieurs raisons, d'abord parce qu'il s'agit d'une alimentation hyperlipidique, premier point négatif important. Les aliments sont en général très palatables, c'est-à-dire agréables au goût ce qui favorise l'excès de la prise alimentaire. Les usagers réguliers de la restauration rapide sont rapidement amenés à manger presque uniquement des aliments hypercaloriques contenant peu de vitamines et peu de fibres. L'assimilation de ces aliments est plutôt rapide et la sensation de satiété ne dure pas. La rythmicité des repas est brisée, la diversité alimentaire n'est plus respectée.

Pourquoi est-il difficile de diminuer sa prise alimentaire ?

Manger est une activité fondamentale, précoce, fortement chargée de valeurs émotionnelles. Le nourrisson qui tète le sein maternel a une relation fusionnelle à la mère. Certains psychanalystes n'hésitent pas à faire remonter à la petite enfance les causes d'un rapport pathologique à la prise de nourriture. Chez l'adulte, la prise de nourriture garde une valeur sociale importante. Nous avons tous fait l'expérience de la difficulté de refuser une invitation à partager un repas, ou de se contenter d'une ration diététique. Manger est un plaisir auquel il est d'autant plus difficile de résister que l'industrie alimentaire sait préparer des aliments agréables à manger. Combien de pâtisseries et autres friandises n'ont-elles pas été sacrifiées sur l'autel de nos frustrations quotidiennes ?

Car manger est aussi un exutoire. Or si l'équilibre nerveux s'y retrouve, la balance énergétique se déplace vers l'excès de prise calorique. Le drame de notre époque est que tout nous engage à manger plus, alors qu'en même temps, tout nous amène à dépenser moins d'énergie. Pour assurer le contrôle de la masse corporelle, il vaudrait mieux en cas de frustration se faire un petit quinze cent mètres au pas de course que d'exterminer la première religieuse à portée de main ou la dernière tranche de pâté en croûte qui sommeille dans le réfrigérateur. Hélas, nous savons tous que nos penchants naturels ne nous font pas préférer la course, et cela ne change pas à mesure que l'âge avance.

Et le génome dans tout ça ?

Oui, le génome humain est séquencé et aucune révélation n'est venue clamer la découverte d'un gène responsable de l'obésité. Comment cela se fait-il ? La première réponse est que les acteurs principaux de la régulation de la masse corporelle : la prise alimentaire, l'aptitude à mettre en réserve les lipides, la dépense énergétique sont des fonctions complexes régies par des ensembles de gènes et non par un seul. Il est vraisemblable que la masse corporelle soit sous l'emprise d'une myriade de gènes réagissant à une constellation de causalités qui résulte en une aptitude plus ou moins forte à devenir obèse dans certaines conditions. Des études de métabolisme réalisées sur de vrais jumeaux suggèrent que la part génétiquement transmissible de la masse grasse est de l'ordre de 25 à 30% (Bouchard 1992⁶). Bien sûr, nous ne sommes pas tous égaux devant l'obésité, nous avons tous en mémoi-

⁶BOUCHARD C. Genetic aspects of human obesity. In Obesity Ed by P. Björntorp and B. N. Brodoff J.B. Lippincott Company Ed. p343-351, 1992.

re telle personne qui ne cesse de manger des quantités pharaoniques des pires aliments sans grossir alors qu'une autre prend des kilos aux plus petits excès. Avant de conclure à la toute puissance d'un gène, il faut se demander si cette personne qui mange tant n'a pas une activité physique tout aussi débordante que son appétit. Quant à la personne qui grossit si vite en mangeant si peu, en sachant que l'énergie ne se crée pas de façon spontanée (voire premier principe de la thermodynamique) et que la graisse c'est de l'énergie, on peut se demander si ses excès alimentaires sont aussi minimes qu'elle le prétend et si son activité physique n'est pas plus faible encore que ses apports énergétiques. Il se peut également que l'on ingère beaucoup de calories sans s'en rendre compte. Savez-vous combien il y a de calories dans un hamburger, bien gras, même s'il n'en a pas l'air ?

La seconde réponse tient dans le fait que les préférences alimentaires et la pratique des activités physiques dépendent de facteurs environnementaux et/ou culturels qui ne sont que très indirectement voire pas du tout sous la dépendance de gènes. En effet, l'indice de masse corporelle (masse en kg/taille en m au carré) est selon les études de 75 à 90 % indépendant de facteurs génétiques (Bouchard et al. 1992).

Pourquoi tant d'obèses maintenant ?

Pourquoi l'obésité se développe t-elle de façon si prépondérante en ce moment-ci de notre développement socio-économique ? Pour comprendre parfaitement ceci, il est bon de faire un petit détour par le passé, le passé lointain même.

Dès son apparition il y a environ trente mille ans, Homo sapiens était cueilleur et chasseur. Lorsque la chasse était bonne, la

nourriture était abondante. Lorsque la chasse n'était pas fructueuse, il ne restait que la cueillette pour assurer un minimum d'apport énergétique. Lors des mauvaises saisons : peu de fruits, pas de graminées, pas d'animaux à chasser, seuls les individus suffisamment fort et gras pouvaient survivre à des périodes de jeûne assez longues pour que soit la chasse redevienne bonne soit les cueillettes permettent de survivre. A l'inverse, lorsque la chasse était bonne il y avait beaucoup à manger pendant une courte période. Par ailleurs, il fallait marcher beaucoup, souvent courir pour échapper aux prédateurs ou attraper des proies, il faisait froid, autant de sources de dépenses énergétiques. **Les conditions de vie préhistorique demandaient de fournir beaucoup d'énergie et offraient peu de ressources énergétiques.** La succession de périodes de diète longues et d'abondance alimentaire courtes, a sélectionné les organismes les plus prompts à mettre en réserve de l'énergie c'est-à-dire de la graisse et leur a permis de survivre. Plus un organisme est gras, plus il est capable de survivre longtemps à la disette. Pendant toute la préhistoire, devenir gras facilement était un avantage adaptatif, une chance de survivre plus longtemps et de plus transmettre l'ensemble de ses gènes. Pendant plusieurs milliers d'années, Homo sapiens a grandi et pris une apparence athlétique mais son bagage génétique s'est orienté vers une mise en réserve d'énergie très efficace et une dépense énergétique la plus économique possible car telles ont été les conditions de la survie de l'espèce.

Aujourd'hui le paysage a changé. **Pour l'homme moderne, les conditions de vie dans les pays occidentalisés (là où l'obésité sévit) offrent beaucoup d'apports énergétiques et demandent peu d'efforts**

physiques. Des millions de kilocalories sont à notre portée au prix, comme seul effort physique, d'ouvrir la porte d'un réfrigérateur. Les aliments sont disponibles en quantité illimitée pour une activité physique quotidienne réduite voire minimale (comme par exemple devant la télévision). Beaucoup d'apports alimentaires pour peu d'exercice, que va-t-il en résulter ? Vous grossissez. Que se passe-t-il lorsqu'un organisme a une aptitude (même faible) à mettre facilement en réserve de l'énergie ? Avec le temps vous devenez obèse. C'est exactement ce qui est en train de se passer dans la population Américaine où plus de 50% des individus sont en surcharge pondérale. Succombant peu à peu aux sirènes de l'Ouest lointain, la "francitude" singe avec de plus en plus d'application les mauvaises habitudes alimentaires et comportementales de ses lointains cousins. Les mêmes causes provoquant les mêmes effets, il est prévisible que le français moyen finira, vingt ans après l'américain, aussi obèse que lui... s'il ne réagit pas. Déjà douze pour cents des enfants français sont obèses, et l'on sait qu'un enfant obèse a toutes les chances de devenir un adulte obèse, s'il ne change pas radicalement son rapport avec la nourriture.

Pire encore, nous avons vu précédemment que le nombre des adipocytes ne diminue pas, c'est-à-dire que maigrir entraîne seulement une diminution de la taille des adipocytes, les cellules restantes sont prêtes à se recharger en lipides dès les premiers excès alimentaires. Un ex-obèse devra donc toujours contrôler sa prise alimentaire sous peine de reprendre très vite des kilos. Ce qui, il y a quelques millénaires a permis à l'Homme de survivre est devenu aujourd'hui un bien pénible fardeau. Faut-il pour autant se résoudre à la vie monastique par temps de carême ?

Que faire ? Là comme en toute chose, un peu de bon sens permettrait d'éviter bien des écueils. Pour éviter d'avoir à maigrir, il vaut mieux éviter d'avoir des kilos à perdre. Vous avez compris, je l'espère, que votre masse corporelle dépend de deux paramètres importants sur lesquels vous avez tout pouvoir : votre prise alimentaire et votre dépense énergétique. Il faut lutter contre les tentations quotidiennes : trop manger, ne pas bouger. Limitez vos apports énergétiques. Il n'est pas question de se priver, mangez ce que vous aimez mais sans excès. Maintenez une activité physique, rien de tel qu'une petite marche avant d'aller se coucher au lieu de somnoler devant la télévision.

Vous avez des kilos à perdre. Les régimes magiques n'existent pas, s'ils fonctionnent c'est qu'ils réduisent les calories que vous ingérez. Malheureusement, ils sont souvent synonymes de contraintes et lorsque ces épreuves ne sont plus supportées, le patient déçu a une fâcheuse tendance à assouvir ses frustrations sur tous les aliments qui passent à sa portée, entraînant l'effet inverse du régime. Les régimes ont un autre inconvénient majeur. La restriction calorique qu'ils provoquent amène le corps à diminuer sa dépense énergétique. Là encore il s'agit d'un mécanisme d'adaptation qui a permis dans les temps ancestraux à Homo sapiens de survivre en anticipant des périodes de disettes. Il est donc d'autant plus difficile de maigrir que la restriction calorique est forte et brutale, et pourtant il n'y a pas d'autre façon que la restriction calorique pour maigrir. Soyez donc assuré d'une chose, on ne maigrit pas sans effort, c'est-à-dire sans une ferme volonté de maigrir. Cela étant dit, il faut utiliser à vos propres fins les particularités de votre corps pour l'amener à ce que vous voulez. La quantité totale de lipides dans un organisme

humain est importante. L'apport quotidien de lipides représente un très faible pourcentage de cette masse (environ 1000 kcal soit moins de 1% des lipides de l'organismes). Ces chiffres sont si différents que l'organisme n'est pas capable de mesurer précisément de faibles variations de ces quantités. Pour maigrir, il suffit simplement de diminuer légèrement les apports quotidiens en lipides de telle sorte que l'organisme ne se rende pratiquement pas compte de cette différence. Il suffit de diminuer d'un quart l'apport en lipides, sans les remplacer par des apports d'autres natures évidemment. L'inconvénient de cette méthode c'est qu'elle demande du temps pour maigrir. L'avantage c'est qu'elle n'est pas pénible. Prenez conscience de ce que vous mangez, évitez les excès : un croissant le dimanche matin cela suffit, (faut-il absolument en manger deux, trois...) diminuez le beurre sur vos tartines, l'huile dans l'assaisonnement de vos salades, et surtout bougez. De temps en temps résistez à la facilité de l'ascenseur et prenez les escaliers, allez à la découverte de votre ville à pied, visitez les musées, apprenez à danser, redécouvrez les plaisirs des promenades champêtres.... Les occasions de bouger ne manquent pas... N'oubliez jamais qu'il est plus facile de ne pas prendre de calories que de les perdre.

Cette dernière partie dépasse un peu mon propos. Je m'en serais voulu de vous laisser dans la noirceur aride des équations énergétiques sans proposer en guise de conclusion une solution pour maigrir. En écrivant

ces lignes je ne cesse d'être surpris par l'absurdité de nos attitudes. Après trente mille ans d'évolution chaotique, Homo sapiens connaît depuis quelques décennies une période de paix et de prospérité (sur une petite partie de la planète). Comme imprégnés de milliers d'années de jeûnes et de disette, les Homo sapiens contemporains se goinfrent semblant incapables de se rassasier. Tiré de son laboratoire un chercheur vous dit ce qu'il a compris, mais en fait il ne dit rien d'autre que : prenez conscience de ce que vous êtes, de ce que vous faites, des lois de la nature.

Parfois je pense aux tout premiers Homo sapiens, je suis sûr qu'un soir un ancien du groupe s'est assis à l'entrée de sa grotte en regardant le ciel étoilé. Il s'est dit qu'un jour personne n'aurait plus peur des tigres et qu'il y aurait à manger pour tout le monde, tout le temps. Peut-être a-t-il songé qu'il serait possible de soigner les blessures, les maladies. Il n'a certainement jamais imaginé une période où il y aurait tellement à manger que tout le monde serait obèse. Aujourd'hui la prospérité nous expose aux pathologies associées à l'obésité. Certains penseront que le destin de l'homme est d'errer entre le manque et l'excès. Dans l'époque fascinante où nous avons le privilège de vivre, la quête de connaissance nous donne une chance de comprendre. Il appartient à chacun de choisir l'essentiel. Notre santé fait partie de cet essentiel, c'est-à-dire des raisons pour lesquelles il vaut la peine de s'émouvoir et de mettre en œuvre ce qu'il faut pour la préserver.

MICRODISSECTION TISSULAIRE : TECHNIQUES ET APPLICATIONS

Jean-Yves SCOAZEC

*Service Central d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, INSERM U45,
Hôpital Edouard Herriot, Lyon, et Plate-forme d'Histopathologie du Petit Animal
(ANIPATH), Génomorphe Rhône-Alpes*

*Correspondant : Jean-Yves SCOAZEC, Service Central d'Anatomie
et Cytologie Pathologiques, Hôpital Edouard Herriot, 69437 LYON cedex 03*

INTRODUCTION

Les techniques de microdissection tissulaire ont pour objectif de sélectionner et d'isoler sous contrôle morphologique des cellules ou des groupes de cellules à partir d'un échantillon tissulaire complexe et de recueillir le matériel prélevé afin de réaliser des études de biologie moléculaire (1). Le développement des techniques de microdissection est une conséquence indirecte de la généralisation et de la standardisation des techniques de PCR qui ont permis de diminuer la quantité de matériel nécessaire pour réaliser des études de biologie moléculaire mais, en contrepartie, ont accru l'exigence de pureté du matériel examiné, afin d'éviter les risques de contamination (2).

Les techniques de microdissection tissulaire sont essentiellement utilisées pour l'analyse de lésions complexes ou des tissus hétérogènes, dans lesquels plusieurs populations cellulaires coexistent, parfois de façon très intriquée (1, 2). C'est ainsi que, dans ce qu'il est convenu d'appeler une

tumeur, les cellules tumorales coexistent avec des cellules non tumorales, comme les cellules du stroma tumoral (fibroblastes, cellules endothéliales) et les cellules inflammatoires. Cette hétérogénéité est mal prise en compte par les techniques classiques de préparation tissulaire utilisées en biochimie ou en biologie moléculaire, qui reposent sur la dissociation des tissus et leur homogénéisation ; ces techniques de préparation ne permettent d'obtenir qu'un matériel non sélectionné, ce qui peut gêner, voire fausser, l'interprétation des résultats. Une première façon de mieux cibler les techniques d'analyse biochimique ou moléculaire est d'enrichir le matériel examiné par des techniques de tri cellulaire, notamment par cytométrie en flux après marquage immunocytochimique. Ces techniques peuvent être facilement automatisées et permettent d'obtenir de grandes quantités de matériel mais elles ne sont pas applicables à toutes les lésions et ne permettent pas d'analyse topographique.

Les techniques de microdissection tis-

sulaire représentent une autre façon d'obtenir un matériel d'analyse sélectionné et enrichi, tout en respectant les critères de qualité et de pureté nécessaires pour une analyse ultérieure selon les techniques de la biologie moléculaire. Elles sont relativement simples à maîtriser et permettent d'obtenir une sensibilité très supérieure aux autres techniques de préparation tissulaire. Dans cette mise au point, nous présenterons successivement les principes des techniques de microdissection, les différentes méthodes disponibles, les conditions de préparation des prélèvements et les principales applications de la microdissection.

PRINCIPES DE LA MICRODISSECTION TISSULAIRE

Le principe général des techniques de microdissection tissulaire est simple. La technique de microdissection se décompose en trois phases principales : la sélection du matériel à prélever, le prélèvement proprement dit et le recueil du matériel prélevé.

La sélection de l'échantillon se fait toujours sous contrôle de la vue, au microscope. Pour faciliter le repérage du matériel à prélever, les colorations habituelles peuvent être utilisées sans difficulté si l'objectif est l'amplification de l'ADN (3); elles ne doivent être employées qu'avec précaution et après test préalable si l'objectif est l'étude des ARN. Il est également possible d'utiliser des techniques de marquage immunohistochimique, voire d'hybridation in situ, pour sensibiliser la mise en évidence de cellules d'identification morphologique difficile, ou peu nombreuses (4). Il faut cependant utiliser des techniques rapides, voire ultra-rapides, pour éviter la dégradation des constituants biochimiques.

Le prélèvement de la zone d'intérêt peut être réalisé selon plusieurs méthodes qui ont toutes leurs avantages et leurs inconvénients. Il doit répondre à deux exigences parfois contradictoires : la précision, qui conditionnera la spécificité des résultats obtenus par l'analyse moléculaire, et la nécessité d'obtenir une quantité suffisante de matériel, qui conditionnera la sensibilité des résultats.

Le recueil du matériel prélevé consiste à faire passer le matériel microdissecté dans un tampon d'extraction; c'est une étape essentielle qui doit bien contrôlée afin d'éviter la contamination du matériel, responsable d'amplifications non désirées.

LES PRINCIPALES METHODES ACTUELLES DE MICRODISSECTION

Il existe trois principales méthodes de microdissection : les techniques manuelles, les techniques assistées par micromanipulateur et les techniques assistées par laser. Ces dernières se sont rapidement répandues au cours de ces dernières années et tendent aujourd'hui à se substituer aux techniques assistées par micromanipulateur. Elles n'ont pas remplacé les techniques manuelles qui conservent encore aujourd'hui toutes leurs indications.

Les techniques manuelles

Dans les techniques manuelles, le prélèvement du matériel se fait à l'aide d'une pointe de dissection. Celle-ci, tenue à la main, permet de gratter les zones d'intérêt préalablement sélectionnées au sein de la coupe tissulaire, sous contrôle de la vue.

Les pointes de dissection les plus utili-

sées sont des pointes de verre ou des pipettes Pasteur étirées, du même type que celui utilisé dans les techniques de micromanipulation. L'extrémité de la pipette est cassée de manière à obtenir une surface de grattage relativement importante et de forme acérée. Rappelons que les pointes de dissection doivent être stérilisées avant chaque utilisation.

La technique de prélèvement est simple. Sous contrôle de la vue, au microscope, les territoires préalablement sélectionnés sont grattés à l'aide de la pointe à dissection. La précision du geste est évidemment fonction de nombreux paramètres : habileté et expérience de l'opérateur, capacités de concentration, appui correct de la main, ... Les manipulateurs expérimentés peuvent atteindre une précision de l'ordre de 100 μm .

Le recueil du matériel prélevé est également manuel. Les fragments détachés de la coupe sont récupérés sur l'extrémité de la pointe et déposés directement dans un flacon contenant un tampon d'extraction. Pour faciliter le recueil des fragments détachés, certains préconisent de prétraiter la coupe au glycérol ou encore, de travailler au sein d'un milieu de montage déposé sur la coupe.

Les techniques manuelles de microdissection sont simples, faciles à mettre en oeuvre, et peu coûteuses. Elles sont bien adaptées lorsque le niveau de précision requis est moyen et que la quantité de matériel nécessaire est relativement peu importante.

Les techniques de microdissection assistées par micromanipulateur

La différence principale entre les techniques de microdissection assistées par micromanipulateur et les techniques de

microdissection manuelles est le guidage de la pointe de dissection non pas par la main mais par un appareil de micromanipulation permettant de déplacer la pointe de dissection dans les trois axes de l'espace avec précision. Ces systèmes de guidage sont directement dérivés des appareils utilisés, notamment, dans le domaine de la biologie de la reproduction. Le guidage par micromanipulateur permet une précision de prélèvement très nettement supérieure à celle permise par les techniques manuelles. Son intérêt majeur est d'autoriser le prélèvement ciblé d'un petit groupe de cellules, voire d'une seule cellule (4).

Les pointes de dissection utilisées dans les techniques assistées par micromanipulateur sont habituellement beaucoup plus fines que celles utilisées dans les techniques manuelles. Il s'agit souvent de pointes ultra-fines de quelques μm . Le système de micromanipulation peut être simple, fixé sur la platine du microscope et manipulé à la main ou motorisé ; l'inconvénient de ces systèmes simples est l'importance des vibrations qui gênent considérablement les manipulations. Cet inconvénient est supprimé par les systèmes plus élaborés, dont les plus complexes sont les micromanipulateurs hydrauliques pilotés par ordinateur et implantés sur un support anti-vibrations.

Le prélèvement se fait sous contrôle de la vue. Le groupe de cellules ou la cellule d'intérêt sont découpés à l'aide d'une pointe fine, après avoir repoussé les cellules adjacentes.

Le recueil du matériel prélevé est manuel. Le groupe de cellules ou la cellule d'intérêt sont délicatement soulevés du support et aspirés avec une micropipette étirée. Après vérification de la présence du matériel prélevé dans la pipette, la pointe de cette

dernière est cassée et plongée avec son contenu dans le tampon d'extraction.

L'avantage majeur des techniques de microdissection assistée par micromanipulateur est d'autoriser des prélèvements très précis. Leur rendement est cependant très faible. Elles sont bien adaptées lorsque le niveau de précision requis est très élevé, de l'ordre de la cellule ou du groupe de cellules.

Les techniques de microdissection assistées par laser

Les techniques de microdissection assistées par laser, d'apparition relativement récente, sont basées sur des principes différents selon le système utilisé. Trois sont actuellement commercialisées en France: ce sont ceux que nous décrirons.

Le premier type de système (laser capture) utilise un laser infra-rouge chauffant, le recueil des fragments se faisant par capture sur un film thermosensible spécial (système Laser Capture Microdissection de Arcturus®) (5). La préparation histologique, préparée selon les techniques conventionnelles, est étalée sur une lame ordinaire et recouverte d'un film thermoplastique (Figure 1). Cette préparation est ensuite exposée à des impacts de diamètre pré-établi (7,5, 15 ou 30 μm) produits à l'aide d'un laser infra-rouge continu de 980 nm positionné au-dessus de la coupe. Ces impacts entraînent la fonte du film thermosensible qui adhère à la partie de la coupe tissulaire située en regard. Le film est ensuite décollé avec le matériel tissulaire qui y a adhéré. L'ensemble est directement plongé dans un tampon d'extraction.

Le second type de système est basé sur l'emploi de lasers ultra-violetts coupants, le

recueil du matériel se faisant par catapultage (système Laser Pressure Catapulting LPC de Palm®) (6) ou gravité (système Laser Microdissection System AS-LMD de Leica®). Les lasers employés sont des lasers UV-A pulsés de 337 nm, utilisés à la manière d'une pointe de dissection pour découper de manière très précise une zone d'intérêt au sein de la coupe tissulaire. Dans le système Palm, le laser est positionné au-dessous de la coupe, montée normalement (Figure 2); dans le système Leica®, il est positionné au-dessus de la coupe, montée à l'envers (Figure 3). Le contrôle du prélèvement se fait à l'aide d'un microscope droit (système Leica®) ou inversé (système Palm®). Dans les deux systèmes, à la fois la platine porte-objet et le faisceau laser sont pilotés par ordinateur. La précision du prélèvement peut être très élevée, de l'ordre de 2 μm .

Le recueil du matériel sélectionné se fait de manière différente selon le système. Dans le système Palm®, le recueil du matériel prélevé se fait par catapultage de la zone prédécoupée, sous l'action du laser, dans une goutte d'huile déposée sur une cupule positionnée au-dessus de la coupe (Figure 2). La cupule est ensuite immergée dans le tampon d'extraction. Dans le système Leica®, la récupération du matériel prélevé se fait par simple gravité dans une cupule remplie de tampon d'extraction et placée au-dessous de la coupe (Figure 3).

De nombreuses variantes techniques sont possibles. Dans certaines applications, c'est un large fragment tissulaire qui est découpé et prélevé, après que les cellules "indésirables" ont été préalablement détruites à l'aide du même laser: c'est ainsi que des cryptes coliques ont pu être prélevées en entier après destruction préalable des lymphocytes intra-épithéliaux. Dans d'autres applications au contraire, des cellules isolées

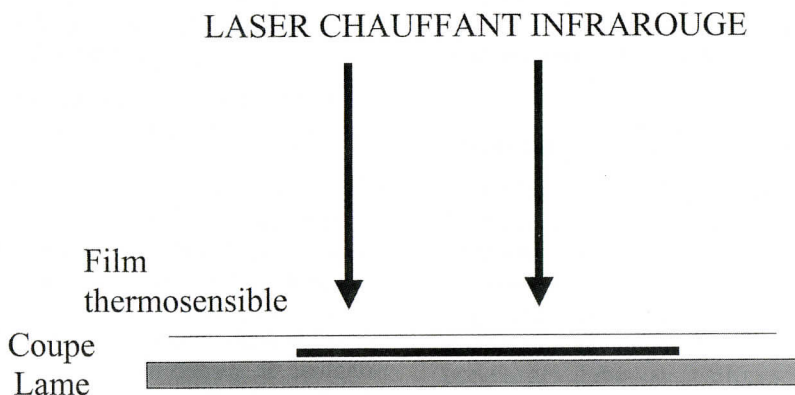


Figure 1 : Représentation schématique du principe de la capture laser.

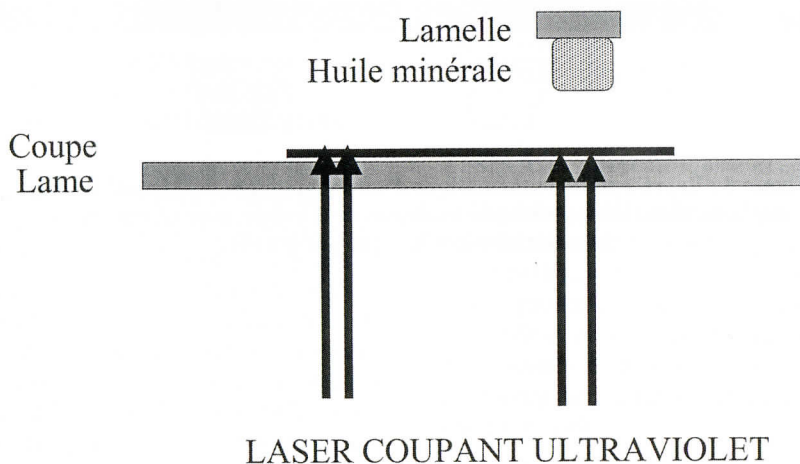


Figure 2 : Représentation schématique d'un des systèmes de microdissection par laser ultraviolet, positionné au-dessous de la coupe, avec récupération par catapultage dans une goutte d'huile minérale déposée sur une lamelle située au-dessus de la préparation histologique.

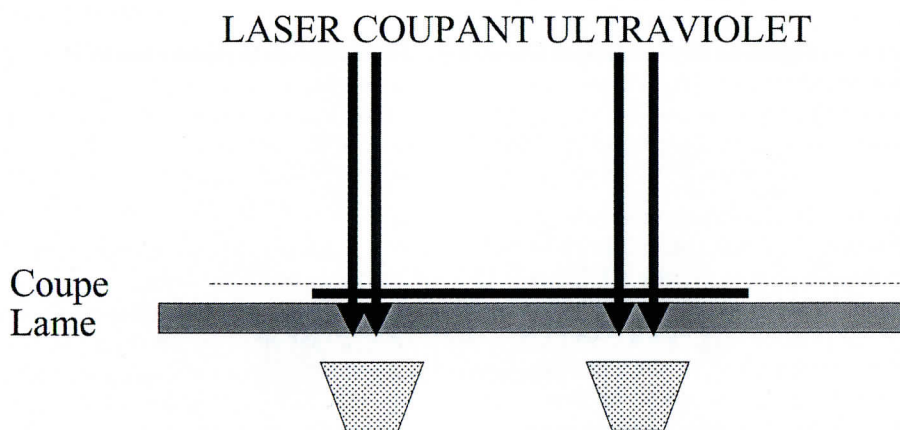


Figure 3 : Représentation schématique d'un des systèmes de microdissection par laser ultraviolet, positionné au-dessus de la coupe, avec récupération du matériel microdisséqué par gravité.

ou de petits groupes de cellules sont prélevés après destruction complète de toutes les cellules adjacentes.

Les techniques de microdissection tissulaire assistées par laser ont donc des avantages incontestables. Elles sont adaptées à la plupart des protocoles, aussi bien ceux qui exigent une grande précision dans le prélèvement, pouvant aller jusqu'au prélèvement monocellulaire, que ceux où la principale exigence est l'obtention d'une grande quantité de matériel. Elles ont également l'avantage de minimiser les risques de contamination en assurant un excellent contrôle du recueil du matériel prélevé. Leur inconvénient majeur réside dans le coût de l'investissement nécessaire, qui reste aujourd'hui encore élevé. Dans le système Arcturus, il s'y ajoute des frais de fonctionnement importants, liés à l'utilisation du film thermosensible spécifique, présenté sous forme de capsules à usage unique, à déposer à la surface de la coupe.

PREPARATION DES PRELEVEMENTS POUR LA MICRODISSECTION

En pratique, le choix du type de prélèvements doit surtout tenir compte des exigences des techniques de biologie moléculaire qui seront appliquées au matériel prélevé par microdissection (7). L'idéal est de disposer de matériel tissulaire congelé qui assure la meilleure sensibilité aux techniques de biologie moléculaire et permet d'étudier à la fois l'ADN et l'ARN. Si du matériel congelé n'est pas disponible, du tissu fixé peut être utilisé. Cependant, dans ces conditions, seul l'ADN pourra être étudié, à condition que le fixateur employé n'ait pas altéré les acides nucléiques. Le liquide de Bouin est donc proscrit. Le formol (tam-

ponné de préférence) ou l'AFA sont les fixateurs de référence. L'étude des ARN à partir de tissu fixé est généralement impossible.

Tissus congelés : précautions à prendre

Le conditionnement initial est essentiel. Un mauvais conditionnement initial du prélèvement peut en effet entraîner des artefacts ou des faux négatifs. C'est ainsi qu'un trop long délai entre le prélèvement proprement dit et sa congélation entraîne une perte et des altérations, parfois sévères, des ARN, voire de l'ADN. La chaîne de froid doit être maintenue après confection des coupes au cryostat, afin d'éviter la dégradation des ARN par l'activation des ARNases tissulaires. Les coupes doivent être bien déshydratées, notamment si une technique de microdissection assistée par laser est utilisée. En effet, la vaporisation de l'eau contenue dans les tissus sous l'effet du laser peut entraîner le décollement des coupes. Enfin, la microdissection doit être réalisée rapidement, avant que l'activation des ARNases tissulaires n'altère les ARN.

Tissus fixés : précautions à prendre

Le conditionnement initial est également important. La fixation doit être rapide, pour éviter la dégradation des acides nucléiques et des protéines. Une surfixation initiale risque de diminuer le rendement de l'extraction des acides nucléiques: une immersion prolongée dans le tampon d'extraction peut être nécessaire.

Les coupes utilisées pour la réalisation des techniques de microdissection manuelle sont réalisées selon les procédures habituelles, avec quelques aménagements. Il est indispensable de travailler avec des gants

et en utilisant du matériel (rasoirs, pinces,...) réservé à cet usage et régulièrement nettoyé, de manière à éviter les contaminations. Les lames doivent être propres et éventuellement traitées pour éviter la dégradation des acides nucléiques. Les coupes doivent être relativement épaisses de manière à permettre de récolter un matériel en quantité suffisante ; selon le protocole utilisé, l'épaisseur des coupes peut varier de 7-10 μm jusqu'à 25 μm . Il faut éviter les coupes trop fines, qui ne comportent que des "tranches" de cellules, entraînant des problèmes d'échantillonnage (perte de matériel génomique entraînant des anomalies artefactuelles).

APPLICATIONS DES TECHNIQUES DE MICRODISSECTION TISSULAIRE

La pathologie tumorale représente aujourd'hui le principal champ d'application des techniques de microdissection tissulaire mais d'autres domaines s'ouvrent progressivement à ces nouvelles méthodes d'analyse.

Applications en pathologie tumorale

L'utilisation d'une technique de microdissection tissulaire dans le cadre du protocole d'étude d'une pathologie tumorale peut répondre à plusieurs objectifs :

- enrichir le matériel d'étude en cellules tumorales, en éliminant les cellules stromales et les cellules inflammatoires, afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité des techniques de biologie moléculaire
- comparer des zones différentes ou des contingents cellulaires différents au sein d'une même tumeur (par exemple, la

composante intra-canalaire et la composante infiltrante d'un cancer du sein)

- comparer, à partir d'un même prélèvement, les cellules tumorales et les cellules normales du tissu péri-tumoral (par exemple, la zone tumorale et la muqueuse adjacente dans les cancers du côlon soupçonnés d'être associés à un syndrome de prédisposition génétique)
- analyser spécifiquement des zones dysplasiques ou des zones de carcinome in situ après les avoir sélectionnées au sein d'un prélèvement tissulaire hétérogène (par exemple, la composante infiltrante, la composante in situ et la composante dysplasique dans les adénocarcinomes développés sur muqueuse de Barrett).

Le génome tumoral a été la principale cible des études utilisant des techniques de microdissection tissulaire (1). A partir de matériel obtenu par microdissection, il est possible de rechercher des pertes d'hétérozygotie (comme dans les cancers du sein, du côlon, du poumon, de la prostate, du pancréas, de la vessie, et dans beaucoup d'autres exemples), de rechercher des modifications des séquences microsatellites, de mettre en évidence des mutations ponctuelles, de démontrer la clonalité d'une population tumorale. Plus récemment, des études du transcriptome (ensemble des ARN cellulaires) des cellules tumorales ont été réalisées à partir de matériel obtenu par microdissection de tissus congelés; la quantité d'ARN extraits est généralement suffisante pour permettre l'utilisation des techniques d'analyse les plus récentes, comme la PCR quantitative (8) ou les biopuces (9). Enfin, des études du protéome (ensemble des protéines cellulaires) ont également été rapportées à partir de matériel congelé et microdisséqué (10).

Autres applications

D'autres champs d'application des techniques de microdissection tissulaire ont été récemment explorés, comme en pathologie des greffes ou en pathologie obstétricale, où la microdissection permet de sensibiliser la recherche de microchimérismes (1), ou en biologie du développement, où la microdissection permet l'analyse de populations cellulaires sélectionnées à partir d'organes complexes.

CONCLUSION

Les techniques de microdissection tissulaire comblent une partie du terrain séparant les morphologistes des biologistes moléculaires. Elles permettent aux deux partenaires d'associer leurs compétences respectives pour définir les protocoles les plus efficaces et les plus complets pour l'étude de populations cellulaires sélectionnées. Si les techniques de microdissection assistées par laser apportent d'incontestables avantages, les techniques manuelles, faciles à mettre en oeuvre et ne nécessitant pas d'investissement coûteux, restent parfaitement utilisables lorsque le niveau de précision requis est faible ou moyen, ce qui est le cas dans de nombreux protocoles d'étude.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERTHEAU P., MEIGNIN V. & JANIN A.: Microdissection sur préparation histologique et cytologique: une approche de l'hétérogénéité tissulaire. *Ann. Pathol.*, 1998, 18, 110-119.
2. GOING J.J. & LAMB R.F.: Practical histological microdissection for PCR analysis. *J. Pathol.*, 1996, 179, 121-124.
3. GUPTA S.K., DOUGLAS-JONES A.G. & MORGAN J.M.: Microdissection of stained archival tissue. *J. Clin. Pathol. : Mol. Pathol.*, 1997, 50, 218-220.
4. D'AMORE F., STRIBLEY J.A., WU G., OHNO T., WU G., WICKERT R.S., DELABIE J., HINRICHS S.H. & CHAN W.C.: Molecular studies on single cells harvested by micromanipulation from archival tissue sections previously stained by immunohistochemistry or non isotopic in situ hybridization. *Lab. Invest.*, 1997, 76, 219-224.
5. BONNER R.F., EMMERT-BUCK M., COLE K., POHIDA T, CHUAQUI R., GOLDSTEIN S. & LIOTTA L.A.: Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, 1997, 278, 1481-1483.
6. BÖHM M., WIELAND I., SCHUTZE K. & RUBBEN H.: Microbeam MOMeNT - non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue. *Am. J. Pathol.*, 1997, 151, 63-67.
7. PLENAT F., ANTUNES L., HALLER T., PIET-OUNNOUGHENE M., KLEIN-MONHOVEN N., CHAMPIGNEULLE J., CHENAL P., BLAND V., GARCIA-PIMENTA F. & LABOUYRIE E.: La fixation formolée à l'aube du troisième millénaire. *Ann. Pathol.*, 2001, 21, 29-47.
8. SPECHT K., RICHTER T., MULLER U., WALCH A., WERNER M. & HOFER H.: Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am. J. Pathol.*, 2001, 158, 419-429.
9. KITAHARA O., FURUKAWA Y., TANAKA T., KIHARA C., ONO K., YANAGAWA R., NITA M.E., TAKAGI T., NAKAMURA Y. & TSUNODA T.: Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res.*, 2001, 61, 3544-3549.
10. VON EGGELING F., DAVIES H., LOMAS L., FIEDLER W., JUNKER K., CLAUSSEN U. & ERNST G.: Tissue-specific microdissection coupled with ProteinChip array technologies: applications in cancer research. *Bio-techniques*, 2000, 29, 1066-1070.

L'ETUDE DE LA SUBSTANCE MINERALE OSSEUSE PAR MICRO-ANALYSE X, DIFFRACTION DES RAYONS X ET MICRORADIOGRAPHIE QUANTITATIVE

FARLAY D., PANCZER G.* et BOIVIN G.

*INSERM Unité 403, Faculté de Médecine R. Laennec, Lyon, et Centre Technologique des
Microstructures (CMEABG), Université Claude Bernard-Lyon 1, Campus de la Doua, Villeurbanne,*

**Laboratoire de Physico-Chimie des Matériaux Luminescents, CNRS UMR 5620,
Université Claude Bernard-Lyon 1, Villeurbanne.*

*Auteur correspondant : INSERM Unité 403, Faculté de Médecine R. Laennec,
69372 Lyon Cedex 08, France (farlay@laennec.univ-lyon1.fr).*

INTRODUCTION

La substance minérale osseuse est un phosphate de calcium cristallisé sous forme d'apatite non stoechiométrique. Des éléments (fluor, strontium) contenus dans des substances à visée thérapeutique (traitement des ostéoporoses en particulier) peuvent réagir avec les cristaux d'apatite et engendrer des modifications cristallines. La distribution ionique osseuse peut être quantifiée par micro-analyse X (1). Les modifications cristallines (nature du minéral, paramètres de maille, cristallinité) sont précisées par diffraction des rayons X (1). Le degré de minéralisation du tissu osseux (DMB) est mesuré (changements des valeurs moyennes et des distributions des DMB) par microradiographie quantitative (2). L'intérêt de l'utilisation de ces trois méthodes est illustré par des résultats récents obtenus chez 30 singes traités avec du Strontium Ranelate (SR, Protos®), un sel de strontium évalué comme traitement potentiellement préventif et curatif de l'ostéoporose post-ménopausique (3-5).

Les effets osseux de SR comme traitement potentiellement préventif et curatif de l'ostéoporose post-ménopausique sont en cours d'évaluation clinique dans une étude de phase III. SR prévient la perte osseuse et augmente la masse osseuse et la résistance osseuse chez le rat, probablement par l'intermédiaire d'un effet "découplant" sur le remodelage osseux (diminution de la résorption osseuse et stimulation de la formation osseuse). Chez des singes traités pendant 13 semaines par SR (1), il a été montré que le strontium (Sr) est distribué dans le tissu osseux de façon hétérogène avec une concentration plus forte dans l'os nouvellement formé que dans l'os ancien, mais sans changement majeur de la substance minérale osseuse à l'échelle du cristal. L'action du Sr sur l'os n'est cependant pas entièrement élucidée, et ses interactions avec la substance minérale osseuse et le remodelage osseux sont en cours d'investigation chez des singes traités à long terme avec du SR. Facilement détectable par micro-analyse X, la distribution osseuse du Sr a pu être détec-

minée et une évaluation quantitative de l'incorporation de cet élément dans la substance minérale a été possible.

MATÉRIEL

Les prélèvements osseux iliaques ont été obtenus chez 30 singes *Macaca fascicularis* (14 mâles + 16 femelles) : a) 7 animaux témoins (non traités) b) 12 animaux sacrifiés à la fin de 52 semaines d'exposition au SR par administration orale répétée et ce aux doses de 200, 500 et 1250 mg/kg/jour, c) 11 animaux sacrifiés 10 semaines après l'arrêt d'une exposition de 52 semaines aux trois mêmes doses de SR que précédemment. Une partie des échantillons osseux non décalcifiés a été fixée dans l'alcool 80°, puis incluse dans du méthacrylate de méthyle. Ce matériel a ensuite été préparé pour la micro-analyse X et pour la microradiographie quantitative. L'autre partie des échantillons non décalcifiés a été traitée par la soude caustique pour enlever la matière organique, puis pulvérisée pour l'analyse par diffraction des rayons X.

MICRO-ANALYSE X

La micro-analyse X est un dispositif d'analyse dans lequel la surface polie d'un échantillon, bombardée par des électrons, émet principalement 2 types de signaux : un signal électronique avec des électrons secondaires (morphologie) et des électrons rétrodiffusés (ils donnent des images de contraste directement liées au numéro atomique moyen Z des minéraux mis en jeu), et un signal photonique (rayons X caractéristiques donnant la répartition qualitative et quantitative des éléments chimiques).

La micro-analyse X a été réalisée à l'aide d'une microsonde électronique Camebax

(Cameca) équipée d'un spectromètre dispersif en énergie, muni d'un détecteur d'éléments légers, Voyager III (Tracor). L'analyse a porté sur les éléments phosphore (P), calcium (Ca), strontium (Sr), oxygène, sodium et magnésium. Les éléments ont été analysés à chaque point de mesure (volume analysé = $1 \mu\text{m}^3$) et successivement sous une tension d'accélération de 15 kV et un courant d'émission de 0,67 nA. Dans ces conditions, il est possible d'analyser, pour les principaux éléments, les radiations $K\alpha$ du Ca, $K\alpha$ du P et $L\alpha$ du Sr. La radiation $K\alpha$ du Sr pourrait être détectée sous une tension de 25 kV mais cette dernière entraînerait une dégradation rapide de l'échantillon au site de mesure et cela fausserait l'analyse des autres éléments. Chaque mesure représentait un comptage de 100 secondes au même endroit. Sur chaque échantillon surfacé, 30 points différents ont été analysés dans l'os compact (15 dans l'os nouveau et 15 dans l'os ancien) et 30 points différents dans l'os spongieux. Pour chaque élément, les résultats sont exprimés en % pondéral (100 % correspondant à la somme des éléments analysés). Des images X (cartographies des distributions des principaux éléments analysés) et des images en électrons secondaires (morphologie de la zone analysée) illustrant l'analyse quantitative, ont été réalisées à l'aide du spectromètre dispersif en énergie. La comparaison de ces images permet de visualiser les sites préférentiels de fixation osseuse du Sr.

DIFFRACTION DES RAYONS X

La diffraction des rayons X permet de mesurer les distances inter-réticulaires des cristaux et donc d'identifier leur nature. La méthode utilisée est la méthode des poudres afin d'avoir statistiquement une représentation de toutes les familles de plans du cristal. Le profil des pics obtenus donne une

idée de la cristallinité de l'échantillon ; plus le pic est fin et mieux le matériel est cristallisé. Les distances inter-réticulaires sont spécifiques du réseau cristallin et permettent de calculer les paramètres de maille.

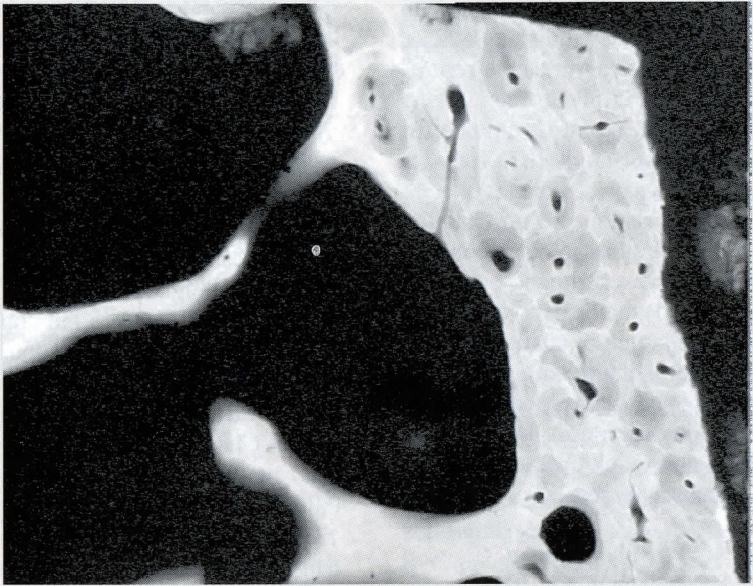
Le diffractomètre utilisé est un Siemens D500 du Centre Commun de Diffraction X Henri Longchambon (Université Claude Bernard-Lyon I, Campus de la Doua, Villeurbanne, France). Les spectres de diffraction ont été enregistrés entre 0 et $70^{\circ}2\theta$ à température ambiante à raison d'un comptage de 2 secondes tous les $0,2^{\circ}$. Le calibrage en angle se fait grâce au positionnement des raies du silicium aux valeurs de référence JCPDS (Joint Commitee for Powder Diffraction Standards). Tous les échantillons analysés présentent les raies de diffraction caractéristiques d'une apatite. Afin d'apprécier le plus précisément possible la teneur en Sr substituant, on a relevé les paramètres de maille de tous les standards JCPDS de structure apatitique et de composition intermédiaire entre le pôle Ca pur et le pôle Sr pur. Les valeurs des paramètres a et c des standards JCPDS sont ensuite représentés graphiquement en fonction du contenu strontique.

MICRORADIOGRAPHIE QUANTITATIVE

Chaque coupe de tissu osseux calibrée à $100 \pm 1 \mu\text{m}$ d'épaisseur a été microradiographiée avec un étalon d'aluminium, puis les niveaux de gris ont été mesurés avec un analyseur automatique d'images Biocom (2, 6, 7). La microradiographie de contact a été réalisée à l'aide d'une unité de diffraction Philips (Limeil Brévannes, France) PW 1830/40 équipée d'un tube à diffraction PW 2273/20 et d'une anode en cuivre. Cet équipement a été utilisé sous 25 kV et 25 mA.

Un filtre de nickel permet de réduire la radiation primitive polychromatique $K\alpha$ du cuivre en une radiation approximativement monochromatique de $1,54 \text{ \AA}$. La distance film-foyer est d'environ 30 cm. Des films Kodak puis Geola [émulsion haute résolution (plus de 3000 lignes/mm) VRP-M sensible au vert, Slavich International Wholesale Office, Vilnius, Lithuania] ont été utilisés. Le film a été exposé pendant 20 minutes, révélé dans une solution de Kodak D 19 pendant 5 minutes à 20°C sous agitation constante, puis fixé pendant 5 minutes à 20°C dans une solution d'hypam Ilford.

Pour l'évaluation quantitative de l'absorption des rayons X par le tissu osseux, un système de référence en aluminium de coefficient d'absorption connu a été exposé sur chaque microradiographie (l'aluminium est choisi à cause de son faible numéro atomique peu éloigné de celui de l'apatite). Le système de référence a été construit sous forme d'un escalier rectangulaire avec une série de marches constituées d'une à neuf couches d'aluminium ultrapur (99,5% ; Strems Chemical Ltd, Strasbourg, France). La masse d'une couche est de $0,003366 \text{ g/cm}^2$ et son épaisseur est de $12-13 \mu\text{m}$. Le DMB a été quantifié séparément dans l'os compact des corticales et dans l'os spongieux, en utilisant une nouvelle méthode automatisée de microdensitométrie sur microradiographies de contact. Un programme d'analyse automatique des niveaux de gris a été utilisé sur un Visiolab 1000® (Biocom, France), c'est-à-dire sur une station de travail en vraie couleur opérant sous microsoft Windows®. Une caméra 3 CCD capture l'image microscopique de la microradiographie. Chaque champ analysé sur l'écran est divisé en un maximum de 4350 petites zones carrées de $41 \mu\text{m}$ de côté (environ 100 pixels). Après calibration à l'aide du



Légende de la figure 1 : Microradiographie d'une coupe de tissu osseux humain, illustrant l'hétérogénéité des degrés de minéralisation.
Les zones les plus sombres correspondent aux zones les moins minéralisées, et les plus claires correspondent aux plus minéralisées.

système de référence en aluminium, la zone mesurée de tissu osseux a été automatiquement sélectionnée, puis les niveaux de gris ont été mesurés (seuls les carrés de mesure totalement situés dans l'os ont été pris en compte). Ensuite, les valeurs obtenues en niveaux de gris ont été converties en DMB grâce à la construction d'une courbe de calibration basée sur les valeurs obtenues à partir de l'étalon d'aluminium. Finalement, le DMB est exprimé en grammes de substance minérale par centimètre cube de tissu osseux et ajusté pour l'épaisseur précise de chaque partie de la coupe (Figure 1). Les résultats ont été mesurés séparément dans l'os compact, l'os spongieux, et l'os total (= compact + spongieux).

RÉSULTATS

Les contenus osseux en Sr, mesurés par microanalyse à rayons X et par dosage chimique, sont significativement corrélés ($r^2=0,90$; $p=0,0001$). Chez les singes témoins, seules des traces de Sr sont détectées et apparaissent distribuées de façon homogène. La substance minérale est très proche d'une apatite synthétique. Le Sr n'est détecté ni dans le tissu ostéoïde ni dans les cellules osseuses et médullaires. Chez les singes sacrifiés en fin de traitement, l'incorporation de Sr dans la substance minérale dépend de la dose de SR reçue ($p=0,0008$) et ce tant dans l'os compact que dans l'os spongieux. De plus, le Sr est distribué de manière hétérogène avec 1,5 à 2 fois plus de Sr dans l'os nouvellement formé que dans l'os ancien au niveau compact, et environ 1,5 fois plus dans l'os nouveau que dans l'os ancien au niveau spongieux. Chez les animaux sacrifiés 10 semaines après l'arrêt de l'exposition au SR, le Sr est encore bien détectable dans l'os et est distribué de façon hétérogène, mais la quantité de Sr est environ 2 fois moins abondante que chez les

autres animaux traités à la même dose mais sacrifiés immédiatement après la fin de l'exposition. Tant dans l'os compact que dans l'os spongieux, Sr est alors surtout présent dans l'os ancien et très peu dans l'os nouveau. Chez les différents singes, l'analyse cristallographique de la substance minérale révèle un spectre compris entre celui d'une apatite synthétique et celui d'une apatite faiblement strontiée. Ainsi, il y a rarement substitution de plus d'1,2 ion calcium par 1,2 ion Sr par maille élémentaire. Les paramètres de maille des cristaux et la cristallinité de la substance minérale ne sont pas modifiés significativement par la capture osseuse du Sr. Les DMB (moyennes et distributions) ne sont pas significativement différents dans les 4 groupes d'animaux et ce quelle que soit la structure osseuse et la durée du traitement. En résumé, les analyses cristallographique et microradiographique de la substance minérale montrent que les paramètres de maille des cristaux, la cristallinité de la substance minérale, et le DMB ne sont pas modifiés significativement par la capture osseuse de Sr.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus chez les singes traités pendant 52 semaines avec du SR, confirment définitivement la faisabilité, grâce à la micro-analyse X, de l'identification, de la localisation, et de la quantification de la captation minérale osseuse du Sr. Ils sont à rapprocher de ceux obtenus chez des singes traités pendant 13 semaines avec d'autres doses de SR (1) et chez des femmes ostéoporotiques traitées SR (8-10). L'ensemble de ces observations souligne aussi l'importance de la prise en compte de la dimension minérale du tissu osseux et en particulier l'évaluation microradiographique du degré de minéralisation osseuse.

Le Sr contenu dans le SR est capté par la substance minérale osseuse en fonction de la dose reçue et cette captation est plus élevée avec la plus forte dose de SR. En outre, cet élément est distribué de façon hétérogène. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que le Sr est non seulement incorporé à l'intérieur des cristaux apatitiques (substitution) mais aussi capté à la surface de ces cristaux (échange ou adsorption). Cependant la durée du traitement (52 semaines) permet une captation dans l'os nouveau et dans l'os ancien. Ceci se traduit, contrairement aux observations faites après 13 semaines d'exposition, par la faible différence entre ces deux types d'os et ce quelle que soit la dose administrée.

Une méthode biophysique comme la diffraction des rayons X permet d'obtenir des renseignements sur la quantité de substitutions ioniques, sur la perfection cristalline, et sur l'évolution des tailles de la maille élémentaire du cristal. Le Sr capté ne perturbe significativement ni la maille élémentaire du cristal ni la cristallinité des dépôts minéraux. Les substitutions ioniques sont globalement peu nombreuses et ces résultats confirment ceux obtenus après 13 semaines de traitement SR (1).

La clairance partielle du Sr osseux (diminution de moitié en moyenne), observée dans les trois groupes de singes traités SR et après un temps de 10 semaines, s'explique par une diminution significative de la quantité de Sr capté par l'os néoformé, sans diminution marquée du Sr dans l'os ancien. Cette clairance osseuse rapide confirme les

résultats obtenus chez le singe après 6 semaines d'arrêt de traitement (1).

En conclusion, Sr est capté par le tissu osseux où il est distribué de façon hétérogène. Cette captation dépend de la dose reçue et est plus abondante dans l'os nouveau que dans l'os ancien. L'hétérogénéité de la distribution du Sr et sa rapide clairance osseuse s'expliquent par des différences dans les moyens de sa captation osseuse (substitution ionique mais aussi adsorption et échanges de surface). Cependant, il n'y a de modification majeure ni du degré de minéralisation osseuse ni de la substance minérale au niveau cristallin. Ces observations confirment que SR peut être utilisé sans risques de perturbations minérales. Elles soulignent également l'intérêt potentiel de SR comme traitement anti-ostéoporotique avec simultanément augmentation de la formation osseuse et diminution de la résorption osseuse.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué en collaboration avec Brigitte PERRAT (Centre Technologique des Microstructures, Université Claude Bernard-Lyon 1, Campus de la Doua, Villeurbanne), Catherine SIMI et Annie BUFFET (Laboratoire d'Histodynamique Osseuse, Faculté de Médecine R. Laennec, Lyon), Agnès LALANDE, Isabelle DUPIN-ROGER et Isabelle TUPINON-MATHIEU (Institut de Recherches Internationales Servier, Courbevoie).

BIBLIOGRAPHIE

1. BOIVIN G., DELOFFRE P., PERRAT B., PANCZER G., BOUDEULLE M., MAURAS Y., ALLAIN P., TSOUDEROS Y., MEUNIER P.J. Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. *J. Bone Miner. Res.*, 1996, 11, 1302-1311.
2. BOIVIN G., MEUNIER P.J. The degree of mineralization of bone tissue measured by computerized quantitative contact microradiography. *Calcif. Tissue Int.*, 2002, 70, 503-511.
3. DAHL S.G., ALLAIN P., MARIE P.J., MAURAS Y., BOIVIN G., AMMAN P., TSOUDEROS Y., DELMAS P.D., CHRISTIANSEN C. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*, 2001, 28, 446-453.
4. MARIE P.J., AMMAN P., BOIVIN G., REY C. Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif. Tissue Int.*, 2001, 69, 121-129.
5. MEUNIER P.J., SLOSMAN D., DELMAS P.D., SEBERT J.L., BRANDI M.L., LORENC R., PORS-NIELSEN S., de VERNEJOL M.C., ROCES A., REGINSTER J.Y. Strontium ranelate: Dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis - a 2-year randomized placebo controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87, 2060-2066.
6. MEUNIER P.J., BOIVIN G. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. *Bone*, 1997, 21, 373-377.
7. BOIVIN G., CHAVASSIEUX P.M., SANTORA A.C., YATES J., MEUNIER P.J. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone*, 2000, 27, 687-694.
8. BOIVIN G., SCHENKER E., TUPI-NON-MATHIEU I., MEUNIER P.J. Uptake and distribution of strontium in human bone, evolution of the degree of mineralization after strontium ranelate administration. *J. Bone Miner. Res.*, 1999, 14 suppl. 1, S284.
9. BOIVIN G., FOOS E., TUPINON-MATHIEU I., MEUNIER P.J. Strontium deposition is dose dependent and does not alter the degree of mineralization of bone in osteoporotic patients treated with strontium ranelate. *J. Bone Miner. Res.*, 2000, 15 suppl. 1, S305.
10. BOIVIN G., FARLAY D., FOOS E., TUPINON-MATHIEU I., MAURAS Y., MEUNIER P.J. Strontium deposition and degree of mineralization of bone in post-menopausal osteoporotic women treated with S12911. *Soumis en 2003.*

QUANTIFICATION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE EN MICROSCOPIE

SOUCHIER C*, BATTEUX B*, BRYON PA°, ROBERT-NICOUD M*

**DyOGen, Inserm U309, Institut Albert Bonniot,*

Domaine de la Merci, 38706 La Tronche, France

°Cytologie Analytique et Centre Commun de Quantimétrie,

Faculté de Médecine, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon CEDEX 08, France

INTRODUCTION

La quantification du signal de fluorescence, en microscopie, présente de nombreux intérêts, aussi bien en recherche fondamentale que dans le secteur appliqué. Les photons émis par les fluorochromes sont détectés par un photomultiplicateur (PMT) en microscopie confocale à balayage laser, une caméra CCD en microscopie à fluorescence conventionnelle. L'exploitation des valeurs quantitatives, surtout en unités arbitraires et relatives, va permettre d'identifier des composants (sondes multiples), de préciser l'importance, la localisation et la co-localisation d'un marquage, et même dans les cellules vivantes, la dynamique d'une molécule. Une bonne interprétation nécessite la standardisation des conditions non seulement d'acquisition, mais aussi de préparation des échantillons, et la mise en place de témoins. L'analyse d'images de fluorescence est ainsi utile pour l'analyse d'hybridations *in situ* en fluorescence (FISH), d'immunomarquages, de constructions GFP ("Green

Fluorescent Proteins"), de colorations de macromolécules ou compartiments cellulaires (figure 1). Dans cette synthèse, nous essaierons de montrer comment rendre compte de l'intensité d'un signal de fluorescence, comment contrôler au mieux la mesure, et nous présenterons des applications d'une mesure statique ou dynamique de la fluorescence.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Acquisition d'une image numérique

Un microscope confocal à balayage laser ou un microscope conventionnel à fluorescence associé à une caméra CCD refroidie, le tout piloté par logiciel, sont les deux principaux matériels utilisés pour numériser une image de fluorescence (1, 2). L'image de fluorescence correspond ainsi à une image numérique (figure 2). Un exemple est une image transformée en 512 X 512 valeurs,

chaque valeur étant comprise entre 0 (le fond) et 255 (fluorescence maximale). C'est un point de départ essentiel et les conditions d'acquisition doivent être maîtrisées et optimisées avant toute quantification.

Standardisation

Lors d'une acquisition d'image pour montrer une localisation ou co-localisation d'un marquage, une morphologie cellulaire ou une texture nucléaire après une coloration, on se met dans des conditions pour montrer au mieux toutes les nuances d'intensité (près de 255 niveaux) sans pour autant saturer l'image. On choisit aussi une intensité d'illumination suffisante pour détecter la fluorescence mais pas trop forte pour éviter le photoblanchiment, photodestruction d'un fluorochrome sous excitation lumineuse (3).

Pour une quantification, l'optimisation ne doit plus se faire sur la base d'une seule image mais prendre en compte l'ensemble du plan expérimental. Les valeurs extrêmes (0 ou 255) doivent être légèrement inférieures et supérieures au minimum et maximum observés sur l'ensemble des images de toutes les lames à comparer. C'est une des difficultés majeures surtout quand on pense observer des intensités de fluorescence très faibles et très fortes. Pour faciliter ce type d'acquisition, des systèmes permettent une acquisition sous une échelle plus large de valeurs (de 2^8 bits (255 valeurs) à 2^{12} ou même 2^{16} bits). On peut aussi envisager, avec une grande prudence, de travailler selon deux modalités d'illumination : une adaptée aux fortes intensités de fluorescence, une pour les plus faibles, par deux valeurs de l'AOTF ("Acousto-Optic Tunable Filter"), ou deux filtres neutres, ou en intégrant le signal de fluorescence à des durées variables mais

contrôlées si on utilise une caméra CCD refroidie. Dans ce cas, il faut standardiser les résultats et contrôler la calibration par des acquisitions multiples sur les mêmes images.

La standardisation des données de fluorescence doit être contrôlée. Au cours du temps, l'illumination peut évoluer, à des échelles temporelles variables. La stabilité du système au cours d'une journée doit être évaluée sur un échantillon stable. Le passage d'un échantillon de référence en début d'expérience peut permettre de contrôler une dérive temporelle plus longue, et est aussi un bon moyen pour estimer si le système est bien optimisé. Il est connu qu'une lampe de fluorescence diminue d'intensité au cours de son vieillissement. Nous avons ainsi utilisé des billes Inspeck calibrées avec des taux croissants de fluorochrome (Molecular Probes, USA) ou des solutions de rhodamine 6G. Toutes ces variabilités sont à connaître pour ne pas conclure à une différence entre échantillons provenant uniquement d'une différence temporelle non contrôlée. Le plan expérimental peut aussi se penser dans ce sens, alternance des lames des différents groupes, plus que l'analyse en premier d'un groupe puis de l'autre.

Défaut d'illumination

En microscopie conventionnelle, l'illumination est plein champ et doit être le plus homogène possible. Pour cela, on peut utiliser un échantillon dense, par exemple de noyaux colorés au Feulgen, ou mieux un échantillon de type plastique souvent fluorescent, comme du polyméthylmétacrylate (Altuglas, Elf-Atochem, France) ou une solution de fluorochrome. Pour cette dernière réalisation, nous avons utilisé des espaces utilisés en hybridation ("easy seal", Hybaid LTD, USA) pour confectionner des

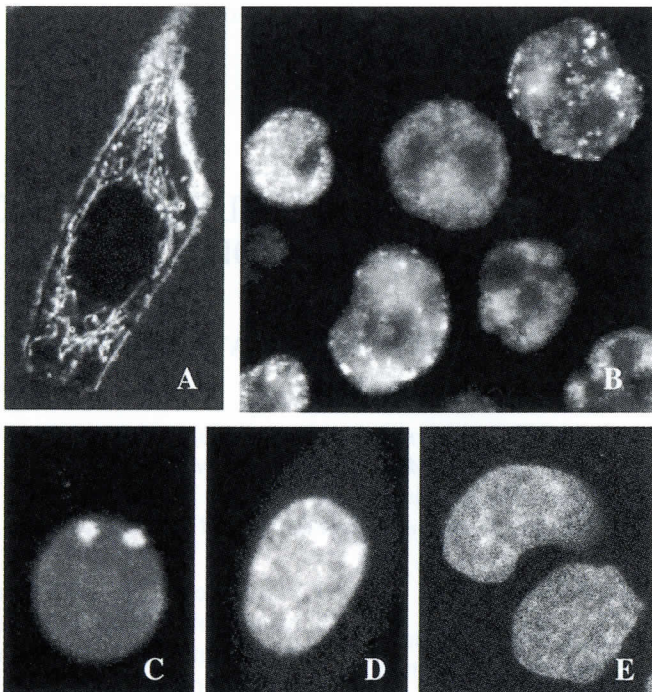
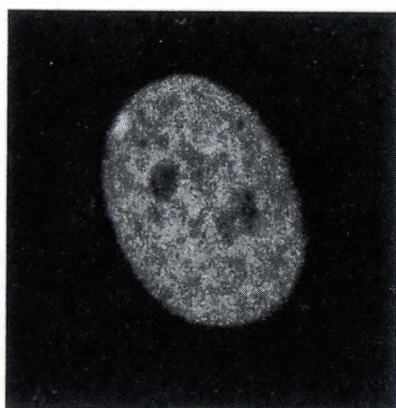


Figure 1 : Exemples d'images de fluorescence

A. mitochondrie, coloration rh123, **B.** PCNA, immunomarquage cy3, **C.** Sonde chromosomique, FISH, **D.** ADN, coloration vitale syto 16, **E.** cellule vivante, protéine fusionnée à la eGFP.



1	2	1	5	1	4	2	3
2	4	3	8	1	3	1	2
4	2	11	14	12	9	4	1
3	2	13	12	14	11	1	5
5	3	9	12	14	9	3	4
4	2	1	10	13	8	2	1
3	5	3	6	2	2	1	2
1	2	5	8	2	3	5	4

Figure 2 : Image numérique

A une image de fluorescence est associée une image numérique de 8 x 8 pixels codés sur $2^4=16$ niveaux de gris.

chaque valeur étant comprise entre 0 (le fond) et 255 (fluorescence maximale). C'est un point de départ essentiel et les conditions d'acquisition doivent être maîtrisées et optimisées avant toute quantification.

Standardisation

Lors d'une acquisition d'image pour montrer une localisation ou co-localisation d'un marquage, une morphologie cellulaire ou une texture nucléaire après une coloration, on se met dans des conditions pour montrer au mieux toutes les nuances d'intensité (près de 255 niveaux) sans pour autant saturer l'image. On choisit aussi une intensité d'illumination suffisante pour détecter la fluorescence mais pas trop forte pour éviter le photoblanchiment, photodestruction d'un fluorochrome sous excitation lumineuse (3).

Pour une quantification, l'optimisation ne doit plus se faire sur la base d'une seule image mais prendre en compte l'ensemble du plan expérimental. Les valeurs extrêmes (0 ou 255) doivent être légèrement inférieures et supérieures au minimum et maximum observés sur l'ensemble des images de toutes les lames à comparer. C'est une des difficultés majeures surtout quand on pense observer des intensités de fluorescence très faibles et très fortes. Pour faciliter ce type d'acquisition, des systèmes permettent une acquisition sous une échelle plus large de valeurs (de 2^8 bits (255 valeurs) à 2^{12} ou même 2^{16} bits). On peut aussi envisager, avec une grande prudence, de travailler selon deux modalités d'illumination : une adaptée aux fortes intensités de fluorescence, une pour les plus faibles, par deux valeurs de l'AOTF ("Acousto-Optic Tunable Filter"), ou deux filtres neutres, ou en intégrant le signal de fluorescence à des durées variables mais

contrôlées si on utilise une caméra CCD refroidie. Dans ce cas, il faut standardiser les résultats et contrôler la calibration par des acquisitions multiples sur les mêmes images.

La standardisation des données de fluorescence doit être contrôlée. Au cours du temps, l'illumination peut évoluer, à des échelles temporelles variables. La stabilité du système au cours d'une journée doit être évaluée sur un échantillon stable. Le passage d'un échantillon de référence en début d'expérience peut permettre de contrôler une dérive temporelle plus longue, et est aussi un bon moyen pour estimer si le système est bien optimisé. Il est connu qu'une lampe de fluorescence diminue d'intensité au cours de son vieillissement. Nous avons ainsi utilisé des billes Inspeck calibrées avec des taux croissants de fluorochrome (Molecular Probes, USA) ou des solutions de rhodamine 6G. Toutes ces variabilités sont à connaître pour ne pas conclure à une différence entre échantillons provenant uniquement d'une différence temporelle non contrôlée. Le plan expérimental peut aussi se penser dans ce sens, alternance des lames des différents groupes, plus que l'analyse en premier d'un groupe puis de l'autre.

Défaut d'illumination

En microscopie conventionnelle, l'illumination est plein champ et doit être le plus homogène possible. Pour cela, on peut utiliser un échantillon dense, par exemple de noyaux colorés au Feulgen, ou mieux un échantillon de type plastique souvent fluorescent, comme du polyméthylmétacrylate (Altuglas, Elf-Atochem, France) ou une solution de fluorochrome. Pour cette dernière réalisation, nous avons utilisé des espaces utilisés en hybridation ("easy seal", Hybaid LTD, USA) pour confectionner des

lames avec 25 µl de solutions de fluorochromes entre lame et lamelle.

L'acquisition d'un fond homogène permet 1) d'ajuster au mieux la lampe, 2) de corriger les défauts résiduels en vue d'une correction numérique. L'acquisition d'un fond noir permet de soustraire le bruit de fond dû au système d'acquisition (4). La transformation suivante peut ainsi être appliquée :

$$I_{x,y,corrigé} = \frac{I_{x,y,mesuré} - I_{x,y,noir}}{I_{x,y,blanc} - I_{x,y,noir}} * k,$$

avec k : constante = moyenne des intensités.

Acquisition à une ou plusieurs longueurs d'onde

Un fluorochrome a plusieurs caractéristiques dont un spectre typique d'excitation et d'émission (figure 3). Pour optimiser une acquisition à deux longueurs d'onde ou plus, il faut minimiser et contrôler au mieux les recouvrements de fluorescence. L'acquisition en double fluorescence, dans les mêmes conditions que les lames de double marquage, des lames de simple marquage est un contrôle indispensable à toute analyse d'un double marquage. Les défauts au niveau de la correspondance des images peuvent se tester par des billes multispectrales (Polychromatic Fluoresbrite 5.7 µm microsphère, Polysciences) et être corrigés, automatiquement ou sous contrôle visuel, par des translations d'images.

Amélioration du rapport signal/bruit

L'amélioration du rapport signal/bruit est optimisée au mieux à l'acquisition par une moyenne d'images. Un inconvénient est de ralentir l'acquisition. Mais, cela permet de

réduire l'illumination, donc le photoblanchiment induit par une trop forte intensité (figure 4).

Quantification

Deux paramètres évaluent les niveaux de fluorescence : intensité totale et intensité moyenne. L'intensité totale ou intégrée correspond à la somme des niveaux de gris, l'intensité moyenne à la valeur moyenne : somme des niveaux de gris divisée par la surface de la zone exprimée en points image. Ces deux mesures correspondent à l'ensemble de l'image, à une partie de l'image définie par une fenêtre ou par un masque binaire (5). Ce masque peut par exemple correspondre au noyau ou au cytoplasme défini sur une image de fluorescence de ce compartiment ou sur une image de transmission (fond clair, contraste de phase ou interférentiel). A la limite, l'intensité peut être celle d'un point et cette donnée est utilisée dans les études de colocalisation. Le rapport point par point ("rapport de fluorescence") est aussi une donnée utile et plusieurs applications en découlent (6).

RÉSULTATS

Standardisation

Le tableau I montre l'analyse de billes vertes Inspeck 10 et 30% (Molecular Probes, $\lambda_{exc} = 505nm$, $\lambda_{em} = 515nm$) réalisée à deux jours différents sur un analyseur d'image. Même si on observe une différence significative, on peut admettre que la reproductibilité est satisfaisante. La différence observée entre les deux types de billes est aussi celle attendue compte tenu des spécifications données par Molecular Probes (1/3).

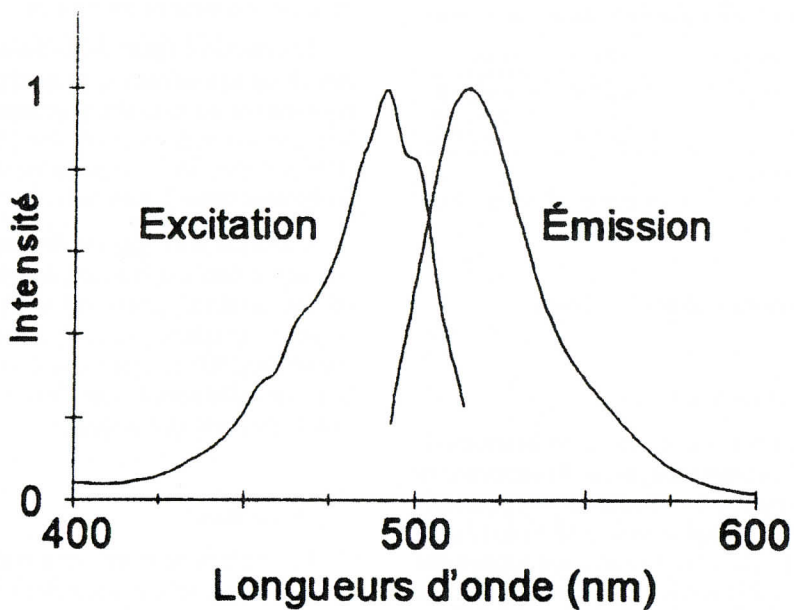


Figure 3 : Spectres de fluorescence.

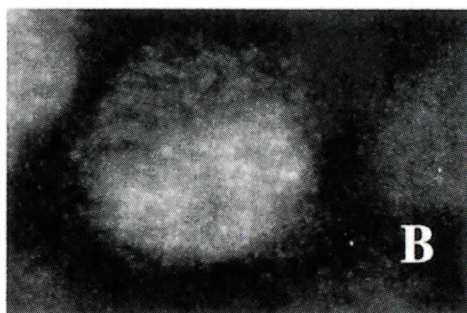
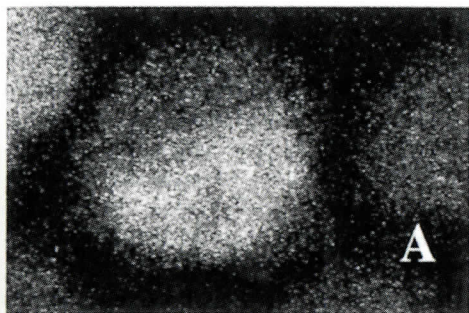


Figure 4 : Amélioration du rapport signal/bruit
A. Image brute, B. Image moyennée

Tableau 1. Mesure de billes de fluorescences vertes

Billes Inspeck	Temps 1	Temps 2
10%	208 \pm 2.3	196 \pm 1.1
30%	641 \pm 6.2	618 \pm 8.2
° unités arbitraires		

Applications - Analyse statique

Applications médicales

Le plus bel exemple d'applications de la quantification du signal de fluorescence en microscopie est celui du caryotype multicolore ("Multiplex-Fish = M-Fish") (7). En effet, chaque chromosome est totalement peint par une sonde spécifique. Le nombre de fluorochromes et d'acquisitions est limité à cinq pour 22 X 2 autosomes + 2 gonosomes (X/Y), soit 24 types de chromosomes différents. Chaque sonde correspond à une proportion variable de trois fluorochromes maximum dans un ensemble possible de cinq fluorochromes. Le logiciel va identifier pour chaque point son appartenance à tel ou tel chromosome.

Dans le cas d'un caryotype normal, chaque chromosome correspond à une couleur, dans le cas d'une translocation, un chromosome montre une partie d'une autre couleur, correspondant à une translocation. L'efficacité repose sur la mesure d'intensité en chaque point sous les différentes conditions d'acquisition. Un autre exemple est l'hybridation comparative génomique ("C.G.H.") (8). C'est aussi une technique utilisée dans les puces à ADN (9). Tous ces logiciels reposent sur une comparaison des intensités relatives de fluorescence selon plusieurs modalités.

Analyse intensité de fluorescence

Les mesures relatives de fluorescence à deux longueurs d'onde sont aussi proposées pour suivre du calcium avec une ou deux longueurs d'ondes d'excitation (fura-2) ou d'émission (indo-1), avec un ou deux fluorochromes (fluo 3, fura red) (6).

L'analyse d'images de fluorescence de noyaux colorés à l'iodure de propidium, marqué au BrdU, peut conduire à un nuage de points similaires à l'analyse en cytométrie de flux (10). L'acquisition est plus lente, mais des données texturales, morphologiques peuvent être acquises.

Colocalisation

Les nuages de points sont couramment utilisés pour rendre compte de l'importance d'un double marquage en cytométrie de flux. Le même principe a été transposé à l'analyse d'images de fluorescence, de façon traditionnelle, à l'échelle de la cellule, mais aussi à celle du point image. On peut ainsi estimer l'importance d'une colocalisation dans une cellule (11).

Colocalisation et FRET

L'analyse précédente évalue la colocalisation à l'échelle de résolution de la microscopie photonique : 250 μm en x,y; 500 μm en z (en microscopie confocale). Par transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET), l'évaluation peut être plus précise, à l'échelle de 50 Angström, avec une efficacité qui diminue rapidement en fonction de la distance ($1/r^6$). Sur cellules fixées, une méthode pour mettre en évidence un transfert d'énergie consiste en l'acquisition de l'image de l'accepteur avant et après photoblanchiment du receveur (12,13).

APPLICATIONS ANALYSE DYNAMIQUE

FRAP "Fluorescence Recovery After Photobleaching"

En FRAP, on veut rendre compte de la diffusion des molécules dans la cellule vivante (12,14). Cette diffusion peut être modifiée en fonction de l'environnement mais aussi des interactions de la molécule analysée. Les fluorochromes sont photodétruits dans une zone précise de l'image à forte intensité lumineuse, la quantification suivante à faible intensité d'illumination va permettre de suivre l'arrivée par diffusion des molécules issues des zones non touchées par la photodestruction initiale. Une méthode beaucoup plus récente est la FCS "Fluorescence Correlation Spectroscopy", qui permet d'estimer des diffusions en solutions et dont on commence à voir les perspectives en milieu cellulaire (14,15).

CONCLUSION

La quantification des mesures d'intensité de fluorescence trouve de nombreuses applications en clinique et dans le domaine de la recherche. Les mesures relatives sont plus fiables, car elles atténuent les variations temporelles et spatiales. Les mesures absolues sont cependant possibles, les problèmes de standardisation étant bien plus au niveau des méthodes de préparation des échantillons qu'au niveau de l'instrumentation. L'interprétation doit aussi tenir compte de toutes les voies de dé-excitation, autres que la fluorescence, comme le FRET, le photoblanchiment, et les modifications induites comme l'environnement (16). Un exemple est l'influence du pH sur la fluorescence du FITC ou de la eGFP.

Actuellement, à côté de logiciels dédiés à une application donnée, comme ceux qui sont utilisés en cytogénétique moléculaire, les méthodes d'analyse de la cellule vivante, et plus particulièrement des méthodes d'analyse *in situ*, comme les méthodes de FRAP, FRET, FLIM, FCS ou suivi de particules uniques sont en plein développement (1,12).

BIBLIOGRAPHIE

1. PERIASAMY A. : Methods in cellular imaging, 2001, Oxford, 435 p.
2. SOUCHIER C., BENCHAI B., DELORME R., BRYON P.A. & NIVELEAU A. : Numerical acquisition of multiple immunofluorescence labelling, Microscop. Microanal. Microstr., 1996, 7(5/6), 1-10.
3. LONGIN A., SOUCHIER C., FFRENCH M. & BRYON P.A. : Comparison of antifading agents used in fluorescence microscopy - image analysis and laser confocal microscopy study. J. Histochem. Cytochem., 1993, 41, 1833-1840.
4. VIGO J., SALMON J.M., LAHMY S. & VIALLET P. : Fluorescent image cytometry: from qualitative to quantitative measurements, Anal Cell Pathol 1991, 3, 145-65 .
5. SOUCHIER C. : Analyse d'images. Les techniques de l'ingénieur, traité analyse et caractérisation, 1998, P855, 1-15.
6. DUNN K. W., MAYOR S., MYERS J. N. & MAXFIELD F. R. : Applications of ratio fluorescence microscopy in the study of cell physiology, 1994, Faseb J, 8, 573-82.
7. SARACOGLU K, BROWN J, KEARNEY L, UHRIG S, AZOFEIFA J, FAUTH C, SPEICHER MR EILS R : New concepts to improve resolution and sensitivity of molecular cytogenetic diagnostics by multicolor fluorescence in situ hybridization, Cytometry, 2001, 44, 7-15.
8. WEISS M. M., HERMSEN M. A., MEIJER G. A., VAN GRIEKEN N. C., BAAK J. P, KUIPERS E. J., & VAN DIEST P. J. : Comparative genomic hybridisation. Mol Pathol, 1999, 52, 243-51.
9. POLLACK JR, PEROU CM, ALIZADEH AA, EISEN MB, PERGAMEN-SCHIKOV A, WILLIAMS CF, JEFFREY SS, BOTSTEIN D, BROWN PO : Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays., 1999, Nat Genet , 23, 41-6
10. SOUCHIER C., FFRENCH M., BENCHAI B., CATALLO R. & BRYON P. A. : Methods for cell proliferation analysis by fluorescent image cytometry., 1995., Cytometry 20, 203-9.

11. DEMANDOLX D. & DAVOUST J. : Multicolour analysis and local image correlation in confocal microscopy, 1997, *J Microscopy*, 185, 21-36.
12. LAWRENCE J.J., SOUCHIER C. & JOVIN T. : Nouvelles méthodes d'études des interactions macromoléculaires in situ, Inserm, Ateliers de formation 130, 2001.
13. DAY R. N., PERIASAMY A. & SCHAUFEL F. : Fluorescence resonance energy transfer microscopy of localized protein interactions in the living cell nucleus, 2001, *Methods* 25, 4-18.
14. HOUTSMULLER A. B. & VERMEULEN W. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem Cell Biol* 115, 2001, 13-21.
15. SCHWILLE P. : Fluorescence Correlation Spectroscopy and its potential for intracellular applications, review article. *Cell Biochem. Biophys.*, 2002, 34, 383-409.
16. VALEUR B. : Molecular fluorescence, principles and applications, 2002, Wiley-VCH ed, 386p.

PCR / RT-PCR *IN SITU* : VISUALISATION DE L'HORMONE DE CROISSANCE (GH) EXTRA-HYPOPHYSAIRE

Elara MOUDILOU, Mireille RACCURT, Hichem MERTANI, Gérard MOREL

CNRS UMR 5123, Bâtiment R. Dubois, Université Claude Bernard - Lyon 1
43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex

C'est en 1886 que Pierre Marie établit une relation entre la fonction "pituitaire" et une observation clinique d'acromégalie. Relation confirmée par la description du nanisme hypophysaire par Paltauf en 1891. Les expériences d'hypophysectomie et d'injections d'extraits hypophysaires chez le rat ou le chien ont permis d'établir un lien direct entre l'hypophyse et la stimulation de la croissance. Le premier test biologique d'appréciation des effets de ce facteur de croissance, initialement appelé somatotropine, a été imaginé par Evans en 1943 et baptisé : "test du cartilage épiphysaire tibial". C'est par l'étude des réponses à ce test que Li et Evans aboutirent en 1945 à des extraits purifiés de GH bovine. L'obtention de GH humaine purifiée et la première caractérisation biochimique de l'hormone furent annoncées en 1956. La première séquence amino-acidique de la GH humaine fut présentée en 1966, ces auteurs la décrivaient alors comme une chaîne peptidique de 188 acides aminés. Après quelques retouches en 1966, puis en 1971 la formule complète est aujourd'hui

admise. La "vraie" GH est une protéine de 22 kDa comportant 191 acides aminés.

Le gène de la GH humaine (hGH) comporte environ 2600 nucléotides, situé sur le bras long du chromosome 17, il existe en deux exemplaires par génome haploïde. Ce gène n'est qu'une partie d'un "cluster" couvrant 66 500 bases et comprenant 5 gènes étroitement apparentés : "growth hormone normal gene" (*GH-N*) encore appelée "vraie" GH, "chorionic somatomammotropin-like gene" (*Cs-L*), "chorionic somatomammotropin A gene" (*CS-A*), "chorionic somatomammotropin B gene" (*CS-B*) et le variant placentaire (*GH-V*) (Figure 1).

La séquence nucléotidique de l'ADNc de la GH de rat (rGH) a été déterminée à partir d'extraits de cellules hypophysaires en culture (Seeburg *et al.* 1977). La longueur de l'ADNc de la rGH est de 800 pb. Le gène de la rGH a une taille de 2,1 kb et comporte également 5 exons et 4 introns d'environ 200 pb chacun, hormis le second qui atteint une longueur de 720 pb.

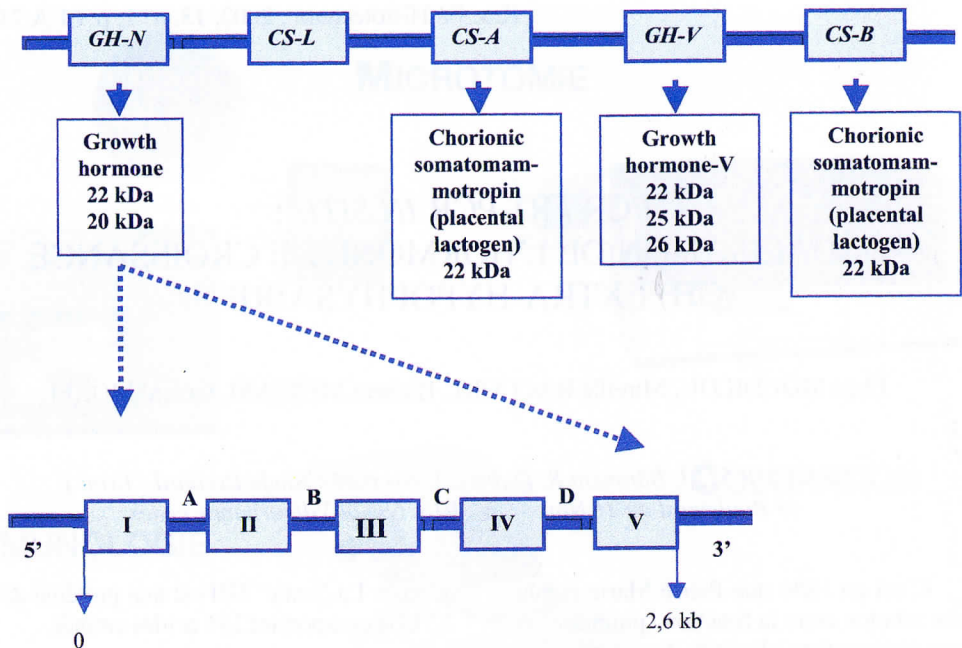


Figure 1 : Représentation schématique du "cluster" des gènes apparentés à l'hormone de croissance. Le gène de la GH a une longueur de 2,6 kb et comporte 5 exons (1 - V) et 4 introns (A - D)

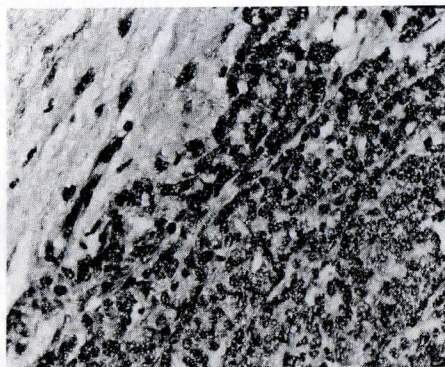


Figure 2 : Visualisation de l'expression de l'ARNm codant pour le récepteur de l'hormone de croissance dans un carcinome mammaire infiltrant par hybridation *in situ* révélée par micro-autoradiographie.

Seule la GH-N dite "vraie GH" est synthétisée dans l'hypophyse sous forme d'une chaîne polypeptidique de 191 acides aminés chez l'homme, 190 chez le rat. Cette structure primaire est très conservée chez de nombreuses espèces (Wallis 1981, Paladini *et al.* 1983). La forme sérique majoritaire a un poids moléculaire d'environ 22 kDa, et comme de nombreuses autres protéines, la GH est d'abord synthétisée sous forme d'une pré-hormone contenant un peptide signal le 26 acides aminés rapidement clivé à la fin de la traduction. La forme biologiquement active est maintenue par deux ponts disulfures intracaténaux formés par 4 résidus cystéine (Cys₅₃ - Cys₁₆₅ et Cys₁₈₂ - Cys₁₈₉) qui créent une grande et une petite boucle.

La corrélation entre l'effet biologique de la GH et la liaison à son récepteur (GHR) a été démontrée dès 1983 dans des cultures d'adipocytes. Dans une récente revue, l'équipe de Waters (1999) dénombre plus de 450 actions spécifiques de la GH dans 84 types cellulaires différents. Ces effets dépendent étroitement de la liaison de l'hormone à des protéines spécifiques dont le GHR est l'élément essentiel. Il appartient au sous-type 1 de la superfamille des récepteurs des cytokines dont il est le premier à avoir été cloné (pour revue *cf.* Rev. Fr. Histotechnol., 1999, **12** : 55-69). Depuis, de très nombreuses études sur le GHR, la régulation de son gène et son mécanisme d'action, ont été publiées.

Si initialement, le foie représentait le site essentiel de liaison de la GH compte tenu de l'abondance de ses récepteurs, les travaux de ces dix dernières années ont montré la présence du GHR dans de nombreux tissus et chez de nombreuses espèces (pour revue *cf.* Rev. Fr. Histotechnol., 1999, **12** : 55-69). Ainsi chez le rat, Mertani et Morel (1995), détectent l'expression du GHR, par hybridation *in situ*, dans la plupart des tis-

sus. La plus forte expression est mesurée dans le foie, les lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse, la zone médullaire externe du rein, l'épiderme de la peau, la corticosurrénale, le cœur et le muscle.

Malgré sa nature ubiquitaire, sa localisation intratissulaire est totalement spécifique et définit pour la GH des sphères d'activité soit directe soit indirecte via IGF-I ("Insulin-like growth factor I").

• Plusieurs auteurs, (Garcia Aragon *et al.* 1992, Pantaleon *et al.* 1997), ont montré la présence du GHR (protéine et ARNm) dès la première division (stade 2 cellules), récepteur que l'on retrouve au stade morula et tout au long du développement embryonnaire. La synthèse hépatique est détectable dès le 19^{ème} jour de la gestation puis augmente régulièrement pendant le développement postnatal pour atteindre les niveaux exprimés chez l'adulte. A ce stade de développement, une synthèse de GHR est également mise en évidence dans le rein, l'iléon et le poumon. Chez le fœtus humain de 15 à 20 semaines, une expression du GHR est détectée dans les chondrocytes de la plaque osseuse et dans les fibroblastes dermiques suggérant, contrairement au dogme de l'époque, l'intervention de la GH ou d'un peptide apparenté dans le développement et la différenciation des tissus fœtaux. Une étude de l'ontogénèse du GHR dans l'hypothalamus de rat montre son apparition dès le 15^{ème} jour de développement embryonnaire, sa synthèse est maximale au 7^{ème} jour post-natal et décroît à partir du 35^{ème} jour post-natal. Résultats mis en évidence par immunohistologie et hybridation *in situ*, par Lobie *et al.* (1993) qui montrent, en plus, la présence du GHR dans les feuillets du cortex cérébral, dans les neurones du thalamus et de l'hypothalamus, chez le rat nouveau né.

• *Dans l'hypophyse de rat et dans l'hypophyse humaine*, trois populations endocrines expriment le GHR au niveau transcriptionnel et traductionnel. Ce sont les cellules somatotropes, gonadotropes et les cellules à prolactine. Ni l'ARNm ni la protéine du GHR n'ont été détectés dans les cellules corticotropes et thyrotropes, ce qui suppose que ces types cellulaires ne sont pas des cibles directes de la GH (Mertani *et al.* 1994, Mertani *et al.* 1995).

• *Dans les organes immunitaires*, l'expression du gène du GHR a été mise en évidence dans les cellules B et T, et les monocytes à la fois chez l'homme et la souris. Cette expression est facilement détectable dans les thymocytes bovins aussi bien au stade embryonnaire tardif que chez l'adulte. Chez la souris toutes les lignées hématopoïétiques de la moelle osseuse expriment le GHR tandis que seules les sous populations CD4⁺ et CD8⁺ l'expriment dans le thymus. Cinquante pour cent des splénocytes et 20% des lymphocytes circulants l'expriment également avec une prédominance de cellules B positives.

• *Dans la glande mammaire*, une augmentation de l'immunoréactivité du GHR a été primitivement observée, chez la rate gestante, dans les cellules épithéliales ductales et alvéolaires prolifératives et dans les cellules myoépithéliales qui bordent l'épithélium glandulaire. L'immunocytochimie révèle la présence du GHR dans la glande mammaire canine normale et pathologique, avec une distribution hétérogène en particulier dans l'adénocarcinome. Nous avons pu montrer la surexpression de ce récepteur dans les divers grades du carcinome mammaire humain (Mertani *et al.* 1998) (Figure 2).

Depuis 1999, un nouveau concept est apparu, ajoutant au rôle endocrine de la GH

une action paracrine / autocrine caractéristique des cytokines, faisant de la GH une cytokine à part entière. Ce nouvel aspect de la GH implique donc sa synthèse et son action au sein du même tissu. Nous savons que le médiateur de cet effet est la présence du récepteur que nous venons de décrire dans la plupart des tissus.

Le premier tissu connu pour synthétiser la GH et exprimant son récepteur est l'hypophyse. La GH hypophysaire a une action paracrine sur certaines populations de cellules hypophysaires, les cellules à prolactine les cellules gonadotropes et les cellules somatotropes sur lesquelles le GHR et la GHBP ont été détectés par immunocytologie (Mertani *et al.* 1995). La prédominance des cellules somatotropes dans l'hypophyse et leur relation spatiale avec les autres cellules facilitent la communication paracrine, et les signaux produits régulent localement leur activité. En même temps, les cellules somatotropes régulent leurs propres synthèse et sécrétion par autocrinie. Une action intracrine beaucoup discutée, peut également être envisagée puisque les sites de liaison de la GH ne sont pas restreints à la membrane plasmique des cellules somatotropes mais sont présents à la fois dans le cytosol, sur la membrane nucléaire et dans le noyau.

Un certain nombre de tissus incluant le système immunitaire, le cerveau, les organes reproducteurs et la glande mammaire sont maintenant reconnus comme des unités autonomes de synthèse, de régulation et d'action de la GH. Cette production de GH et bien souvent des facteurs régulateurs, en dehors de l'axe hypothalamo-hypophysaire, aurait un impact local qui s'ajouterait aux interactions endocrines traditionnelles entre la GH, ses facteurs de régulation hypothalamiques et ses tissus-cibles (Recher *et al.*, 2001).

C'est tout récemment qu'une synthèse de GH a été mise en évidence dans la glande mammaire normale et les tumeurs mammaires suggérant une fonction paracrine à cette hormone qui interviendrait dans le développement tumoral chez l'animal (Mol *et al.* 1995a, b) et chez l'homme (Raccurt *et al.*, 2002). C'est d'abord chez le chien et le chat que Mol *et al.* (1995b) mettent en évidence par PCR en phase liquide, les ARNm codant pour la GH dans des tumeurs mammaires induites par un progestatif : l'acétate de médroxyprogestérone (MPA). La même année, une étude conduite chez l'homme révèle une expression de GH dans 6 sur 8 tumeurs mammaires bénignes et dans 7 sur 11 tumeurs malignes (Mol *et al.* 1995a). Une analyse du produit d'amplification montre 100% d'homologie avec la séquence du gène codant pour la GH hypophysaire (Mol *et al.* 1996).

La localisation de cette synthèse a été obtenue par RT-PCR *in situ* (cf. protocole), méthode d'amplification par excellence de l'expression d'un gène (pour revue cf. Rev. Fr. Histotechnol., 1999, **12** : 55-69) (Figures 3 et 4).

Cette GH extra-hypophysaire est donc synthétisée en faible quantité sur son lieu d'action où elle a des effets pleiotropes de type autocrine / paracrine. Son récepteur appartient à la superfamille des récepteurs des cytokines. Sa liaison sur son récepteur déclenche une transduction du signal qui fait intervenir les STAT et les MAP kinases. Tous ces éléments sont en fait les propriétés fondamentales des cytokines, molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la différenciation cellulaire, le développement tissulaire et l'homéostasie.

PROTOCOLE

Le choix des amorces oligonucléotidiques spécifiques et complémentaires de la séquence à amplifier dépend des points suivants :

- **la longueur des amorces** : elle détermine la spécificité de l'hybridation. Plus l'oligonucléotide est long, plus la probabilité que sa séquence soit unique augmente. Nous utilisons des oligonucléotides de synthèse de 25 mers assurant la spécificité et la stabilité des hybrides formés.

- **la séquence des amorces** ne doit pas contenir de séquences palindromes pour éviter l'auto-amplification ou l'autohybridation. Le pourcentage en GC doit être compris entre 45-55% pour une meilleure stabilité des hybrides formés. Les amorces doivent contenir à leur extrémité 3' une paire de base de type GC pour faciliter la formation des brins complémentaires.

- **la température optimale** d'hybridation des amorces est de 10°C en dessous de la température de fusion (définie comme étant la température à laquelle 50% des hybrides sont dénaturés).

Le couple d'amorces est choisi après l'analyse du gène de la GH de façon à amplifier un fragment supérieur à 450 paires de base, pour minimiser les problèmes de diffusion en PCR *in situ*. De plus, ce couple d'amorces est à cheval sur deux exons. La présence d'un intron à l'intérieur de la séquence à amplifier empêche toute amplification de l'ADN génomique. Le fragment amplifié est de 533 pb. Enfin, pour déterminer d'éventuelles homologies de séquences, ce couple d'amorces a été testé sur des banques de données génomiques grâce à un logiciel, le "Blast", présent sur Internet.

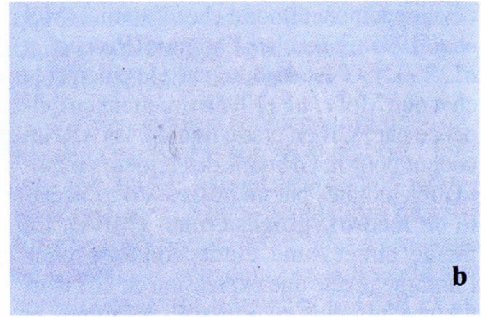
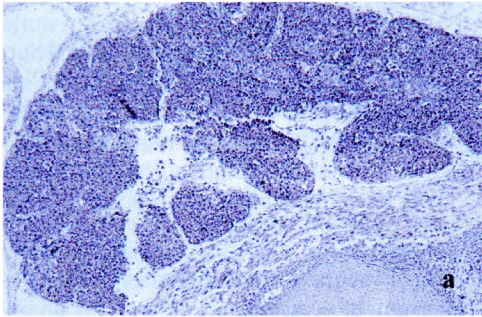


Figure 3 : Expression de la GH extra-hypophysaire dans le thymus d'embryon de rat de 18 jours. Toutes les thymocytes expriment le gène de la GH (a) alors qu'aucun signal n'est visible si la Taq ADN polymérase est omise (b).

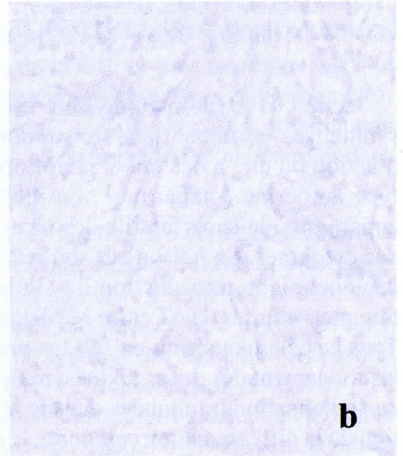
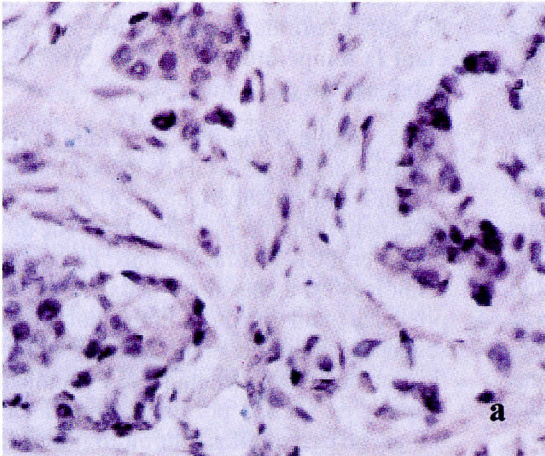


Figure 4 : Expression de la GH dans un carcinome mammaire infiltrant (a) et son contrôle avec omission de la reverse transcriptase (b).

La technique de RT-PCR *in situ* est une technique récente qui permet la visualisation d'une séquence d'acide nucléique rare au sein de cellules ou de tissus. Elle résulte de la combinaison des techniques d'amplifications géniques par la réaction de PCR et de celle d'hybridation *in situ* qui permet la localisation, à l'échelle cellulaire, des produits amplifiés avec un haut degré de spécificité de détection. Les principes de ces deux méthodes (RT-PCR et hybridation *in situ*) sont les mêmes que ceux décrits précédemment mais à chaque étape de la RT-PCR *in situ*, il existe des facteurs limitant.

Les étapes sont les suivantes :

- préparation, fixation et prétraitement des tissus
- étape de RT-PCR *in situ*

- hybridation *in situ*
- révélation

1/ Prétraitements des tissus

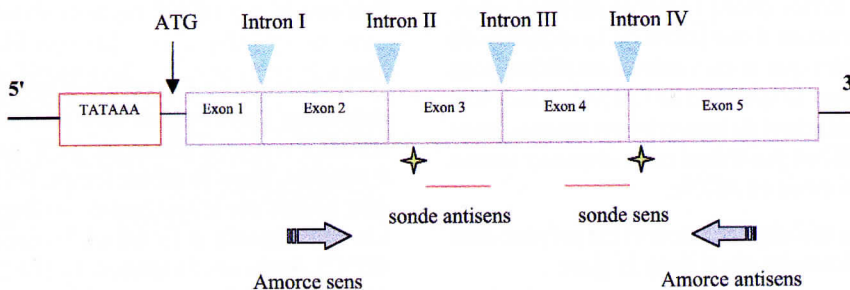
Après une fixation par le paraformaldehyde à 4% ou le formol et l'inclusion en paraffine, l'étape la plus importante est l'étape de digestion protéolytique par la protéinase K, utilisée à une concentration de 5 µg/ml pendant 15 minutes à 37°C.

2/ Positionnement des amorces et sondes utilisées

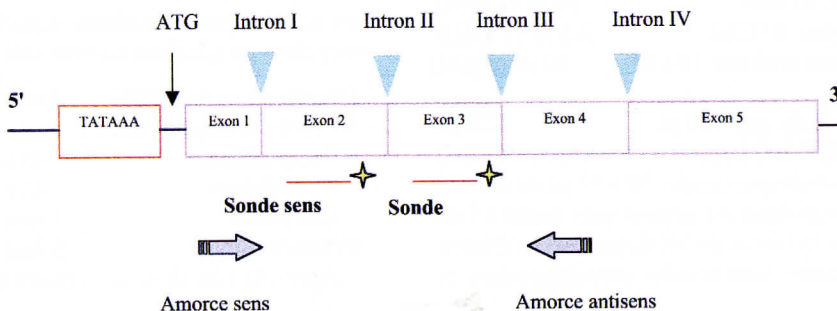
Pour le rat :

3/ Etapes de RT-PCR *in situ*

Les étapes de reverse transcription et



Pour l'homme :



d'amplification s'effectuent directement sur les coupes dans des thermocycleurs possédant des blocs *in situ*. Il existe différents types d'appareils : le thermocycleur Hybaid (peut traiter de 4 à 20 lames), celui de MJ Research (traitement de 16 lames dans un système de colonnes) et enfin, celui que nous avons principalement utilisé : le thermocycleur Perkin Elmer. Avec cet appareil, nous pouvons traiter 30 coupes à la fois (10 lames avec trois coupes par lame). Un système de scellage spécifique (AmpliCover Discs et Clips®) est associé à l'appareil afin d'éviter tout problème d'évaporation du milieu réactionnel.

Etape de RT

Cette étape fait intervenir les mêmes constituants que ceux utilisés en phase liquide à l'exception de l'oligo(dT). En effet, nous avons choisi l'amorce antisens, complémentaire d'une partie de la séquence de l'ARNm que nous voulons amplifier, pour effectuer la synthèse de l'ADNc. Ainsi, lors de la réaction de transcription inverse, seuls les ARNm possédant cette séquence seront transformés en ADNc.

Le mélange réactionnel est préparé dans un microtube placé dans la glace :

Tampon M-MLV 5X	20 µl (1X)
DTT 0,1 M	10 µl (10 mM)
dNTP 10 mM	10 µl (1 mM)
RNasine 40 U/µl	2,5 µl (1 U/µl)
Amorce antisens 10 µM	10 µl (1 µM)

Eau stérile qsp 100 µl	42,5 µl
M-MLV 200 U/µl	5 µl (10 U/µl)

Sur chaque coupe, 30 à 50 µl du mélange réactionnel est déposé puis scellé à l'aide du système de scellage Perkin Elmer. Les lames sont ensuite introduites dans le

thermocycleur pendant 1 heure à 42°C. Après la réaction, les covers clips et discs sont retirés et les lames sont lavées en tampon monodiphosphate 0,1 M pendant 5 minutes puis déshydratées.

Etape de PCR

Cette étape fait intervenir les mêmes constituants que ceux utilisés en phase liquide. Afin d'éviter des amorçages non spécifiques, un "hot start" ou départ à chaud est réalisé.

Le mélange réactionnel est préparé dans un microtube placé dans la glace :

Tampon 10X	10 µl (1X)
MgCl ₂ 50 mM	6 µl (3 mM)
dNTP 10 mM	5 µl (0,5 mM)
Amorce sens 10 µM	10 µl (1 µM)
Amorce antisens 10 µM	10 µl (1 µM)
Eau stérile qsp 100 µl	55 µl

L'ensemble est introduit dans le thermocycleur possédant un bloc pour tubes et amené à une température de 82°C pendant 5 minutes. Dans le même temps, les lames sont posées sur le système de scellage Perkin qui chauffe à la même température (82°C). Après ces 5 minutes, 4 µl (0,2 U/µl) de Taq (5 U/µl) sont introduits au milieu réactionnel chaud et celui ci est déposé sur les coupes maintenues à 82°C. Les lames sont scellées puis introduites dans le thermocycleur programmé comme suit :

- Dénaturation de l'ADN	5 min à 95°C
- 20 cycles d'amplification	
Dénaturation	45 s à 95°C
Hybridation	45 s à 69°C
Extension	1 min à 72°C
- Extension finale	5 min à 72°C
Après la réaction, les covers clips et	

disques sont retirés et les produits amplifiés sont fixés par du paraformaldéhyde 4% en tampon phosphate 0,1 M pendant 15 minutes, puis les lames sont lavées dans le même tampon pendant 5 minutes et déshydratées.

4/ Détection des produits amplifiés par hybridation *in situ*

Les produits amplifiés par RT-PCR *in situ* sont révélés par la technique d'HIS à l'aide des deux sondes, sens et antisens, spécifiques marquées à la digoxigénine. Chacune de ces sondes est complémentaire de l'un des deux brins d'ADN amplifié.

Le tampon d'hybridation est préparé comme suit :

SSC 20X	100 µl (4X)
Formamide désionisé	250 µl (50%)
Solution de Denhart 50X	10 µl (1X)
ARNt 10 mg / ml	12,5 µl (250 µg / ml)
ADNss 10 mg / ml	12,5 µl (250 µg / ml)
Sonde sens-dig (1,25 pmoles / µl)	8 µl (20 pmoles / µl)
Sonde antisens-dig (1,25 pmoles / µl)	8 µl (20 pmoles / µl)
H ₂ O stérile qsp	500 µl

Sur chaque coupe, 30 à 50 µl de tampon d'hybridation est déposé puis recouvert d'une lamelle stérile. Les lames sont ensuite déposées sur une plaque chauffante pendant 5 minutes à 96°C pour dénaturer les produits amplifiés. La réaction est arrêtée dans la glace puis les lames sont incubées une nuit à 40°C dans une boîte en plastique en atmosphère humide en SSC 5X.

5/ Révélation

Après hybridation, les coupes sont lavées en SSC 2X (2 x 30 min) et SSC 0,5X (30 min) à température ambiante pour éliminer les hybrides non spécifiques.

Les hybrides formés sont révélés par la technique d'immunohistochimie directe en utilisant comme marqueur la phosphatase alcaline et son substrat le NBT/BCIP.

BIBLIOGRAPHIE

1. GARCIA ARAGON J, LOBIE PE, MUSCAT GEO, GOBIUS KS, NORSTEDT G, WATERS MJ (1992) prenatal expression of the GH receptor/binding protein in the rat : a role for GH in fetal development? *Development* 114:869-876.
2. LI CH, EVANS HM, SIMPSON ME (1945) Isolation and properties of the anterior hypophyseal growth hormone. *J Biol Chem* 159:353-366.
3. LOBIE PE, GARCIA-ARAGON J, LINCOLN DT, BARNARD R, WILCOX JN, WATERS MJ (1993) Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 74:225-233.
4. MERTANI HC, MOREL G (1995) In situ gene expression of growth hormone (GH) receptor and GH binding protein in adult male rat tissues. *Mol Cell Endocrinol* 109:47-61.
5. MERTANI HC, PECHOUX C, GARCIA-CABALLERO T, WATERS MJ, MOREL G (1995) Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the human anterior pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3361-3367.
6. MERTANI HC, WATERS MJ, JAMBOU R, GOSSARD F, MOREL G (1994) Growth hormone receptor binding protein in rat anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 59:483-494.
7. MOL JA, HENZEN-LOGMANS SC, HAGEMAN P, MISDORP W, BLANKENSTEIN MA, RIJNBEEK A (1995a) Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 80:3094-3096.
8. MOL JA, VAN GARDEREN E, RUTTEMAN GR, RIJNBEEK A (1996) New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 57:67-71.
9. MOL JA, VAN GARDEREN E, SELMAN PJ, WOLFSWINKEL J, RIJNBEEK A, RUTTEMAN GR (1995b) Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J Clin Invest* 95:2028-2034.
10. PALADINI AC, PENA C, POSKUS E (1983) Molecular biology of growth hormone. *Crit Rev Biochem* 15:25-26.
11. PANTALEON M, HARVEY MB, BARNARD R, WATERS MJ, KAYE PL (1997) Functional GH receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: A role for GH in early embryogenesis? *Proc Natl Acad Sci, USA* 94:5125-5130.

12. RACCURT M., LOBIE P.E., MOUDILOU E., GARCIA-CABALLERO T., FRAPPART L., MOREL G., MERTANI H.C. - High stromal and epithelial hGH gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *Journal of Endocrinology*, 2002, 175, 307-318.
13. RECHER S, RACCURT M, LAMBERT A, LOBIE PE, MERTANI HC, MOREL G (2001) Prenatal and adult GH gene expression in rat lymphoid organs. *J. Histochem Cytochem* 49, 347-355.
14. SEEBURG PH, SHINE J, MARTIAL JA, BAXTER JD, GOODMAN HM (1977) Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature* 270:486-494.
15. WALLIS M (1981) The molecular evolution of pituitary growth hormone, prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J Mol Evol* 17:10-18.
16. WATERS MJ (1999) The GH receptor. In: Kostyo JL (ed.). *Handbook of Physiology*, Oxford University Press Vol 5. Ch. 13.
17. PCR / RT-PCR *in situ* light and electron microscopy - G. MOREL, M. RACCURT Eds. - CRC Press, Boca Raton, USA, 2002, 436 pages.

APPLICATION DES MICROSCOPIES PHOTONIQUE ET ELECTRONIQUE A BALAYAGE A LA MISE EN EVIDENCE DU CYCLE SEXUEL MÂLE DU BLACK-BASS (*MICROPTERUS SALMOÏDES L.*), AU COURS D'UN CYCLE

Isabelle HARDY, Maryse MARTIN, Jean-Marie EXBRAYAT, Vincent GOUBIER

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

INTRODUCTION

Le black-bass, poisson de la famille des Centrarchidae, acclimaté en France depuis plus d'un siècle, apprécié pour ses qualités gastronomiques et pour l'intérêt économique de sa pêche, a fait l'objet de nombreuses études, aussi bien fondamentales qu'appliquées, pour mettre en place son élevage, puis l'améliorer. La reproduction des femelles a déjà été particulièrement suivie dans différents contextes environnementaux (1 à 4) et un certain nombre d'aspects fondamentaux ont été dégagés dont la maîtrise devrait permettre le bon déroulement du cycle sexuel, suivi d'une ponte efficace.

Dans le cadre de nos études sur la reproduction de ce poisson en milieu d'élevage, le cycle sexuel des mâles n'avait pas été abordé. Pour combler cette lacune nous avons proposé qu'un repérage rapide de l'évolution du cycle sexuel des mâles soit effectué en microscopie électronique à balayage et comparé aux informations données par les préparations classiques de la microscopie photonique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les black-bass ont été prélevés par pêche, au filet ou à la ligne, dans une ferme aquacole de la région lyonnaise, tous les mois ou tous les deux mois suivant la période de l'année. Après la détermination visuelle du sexe (forme et couleur de la papille génitale) ou avec la méthode de Benz et Jacob (5) qui consiste à enfiler délicatement une sonde souple dans le pore génital du poisson et à mesurer la profondeur de pénétration, les mâles sélectionnés ont été pesés (de 107 à 607 g) et mesurés (de 20 à 33.5 cm) puis sacrifiés. Les testicules ont été fixés au liquide de Bouin.

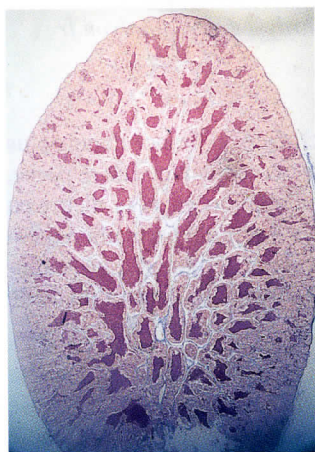
Pour l'observation en microscopie photonique, les techniques de l'histologie classique ont été appliquées : inclusion dans la paraffine et coupes au microtome de 5 μm d'épaisseur, coloration à l'azan de Roméis modifié.

Pour l'observation en microscopie électronique à balayage, les testicules ont été débités en fragments de quelques centaines de μm d'épaisseur après leur fixation au Bouin. Ces fragments ont été déshydratés dans plusieurs bains d'acétone, puis desséchés par contournement du point critique (appareil Balzer) utilisant le CO_2 comme intermédiaire. Ils ont ensuite été métallisés par un mélange or-palladium et observés au microscope électronique à balayage HITASHI S800 du centre de Microscopie électronique Appliquée à la Biologie (CMEABG) de l'Université Claude Bernard Lyon I.

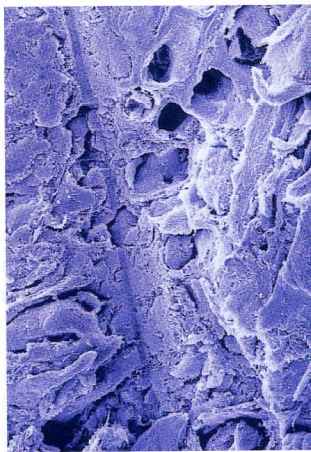
RÉSULTATS

1 - Structure du testicule

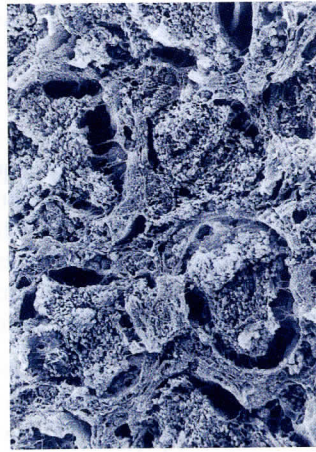
Les tubes séminifères



MP (x3.2)



MEB (x80)



MEB (x350)

Fig. 1. Coupes du testicule de black-bass montrant les tubes séminifères

Les différentes techniques de microscopie permettent de mettre en évidence les tubes séminifères du testicule, organisés en éventail et colorés en rouge sombre, pour ceux qui sont remplis de spermatozoïdes. Les autres, blancs en microscopie photonique apparaissent en creux et sombre en microscopie électronique à balayage. L'organisation des tubes séminifères, bien structurée, montrée par la troisième photo révèle un état satisfaisant du testicule observé.

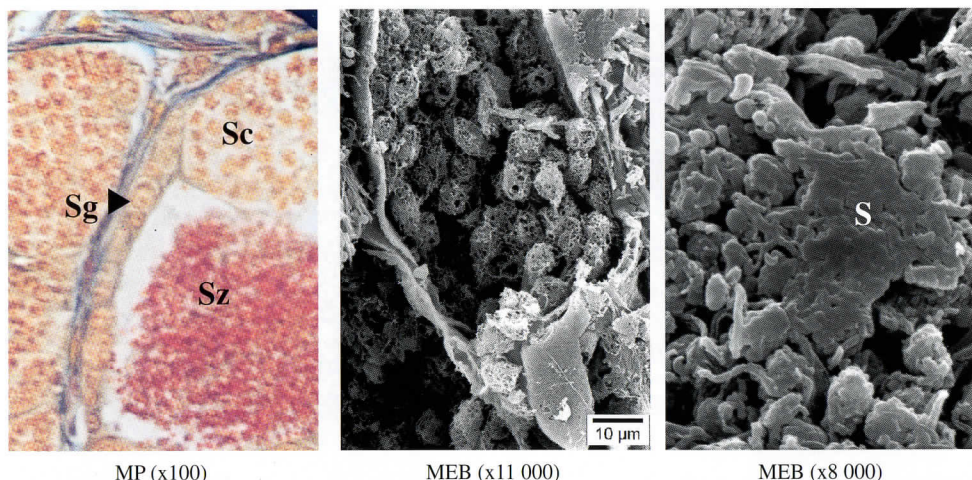
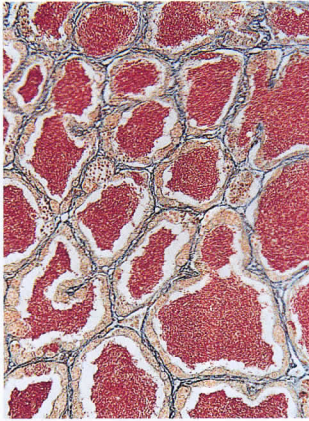


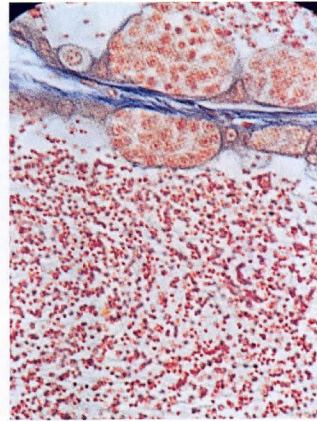
Fig. 2. Détail d'un tube séminifère montrant des spermatides incluses dans les indentations d'une cellule de Sertoli.

Les différentes nuances de coloration en microscopie photonique mettent en évidence les stades de la spermatogenèse. Les spermatogonies, grosses cellules ovoïdes, sont localisées sur le pourtour du tube séminifère. Elles se différencient en spermatocytes, structures de petite taille, mais ni la microscopie photonique ni la microscopie à balayage ne permettent de distinguer (sur ces photos) les spermatocytes de second ordre et les jeunes spermatides. Les cellules de Sertoli sont clairement identifiables en MEB.

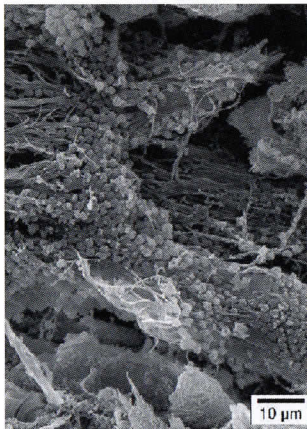
Les spermatozoïdes



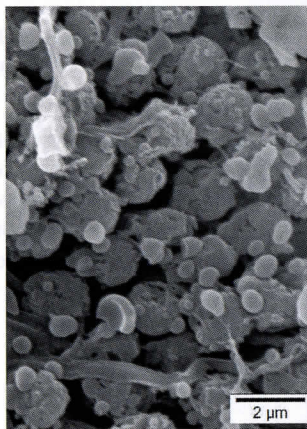
MP (x25)



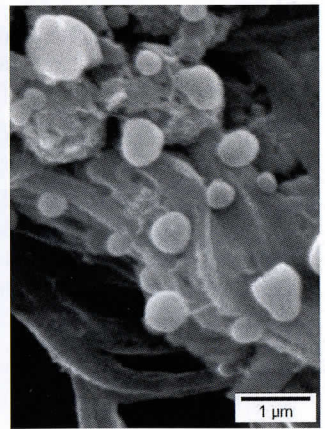
MP (x 100)



MEB (x1 500)



MEB (x11 000)



MEB (x22 000)

Fig. 3. Les spermatozoïdes à différents grossissements en MP et MEB.

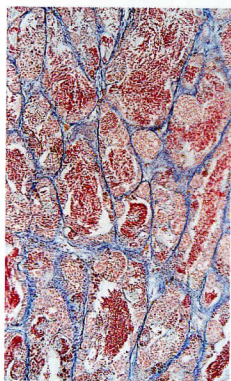
L'examen des photographies de spermatozoïdes confirme la complémentarité des deux techniques utilisées. En photonique, la quantité de spermatozoïdes libérés dans la lumière des tubes séminifères est immédiatement appréhendée par l'effet visuel provoqué à un faible grossissement (masse orangée sombre avec l'azan de Roméis). La MEB précise à la fois la structure du spermatozoïde (tête et flagelle) et leurs positions relatives dans la lumière du tube séminifère. On remarque l'orientation centripète des têtes globulaires des spermatozoïdes prêts à être évacués.

2. Examen d'un cycle sexuel

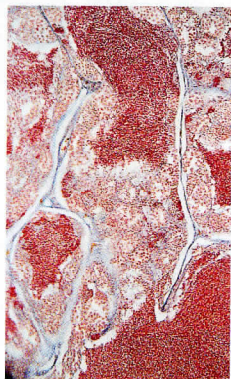
A l'observation des coupes, il nous est apparu qu'elles pouvaient être regroupées en deux périodes : avant et après l'émission de spermatozoïdes. La première période correspond aux mois de septembre, octobre, novembre et décembre et la deuxième correspond aux mois d'avril, mai et juin. En effet, on constate, entre septembre et décembre, une intensification de la couleur orangée sombre ce qui traduit une différenciation active des spermatogonies en spermatozoïdes. Les spermatogonies qui pouvaient occuper la totalité du volume du tube séminifère sont peu à peu repoussées vers une localisation périphérique. Dès le mois d'avril, les tubes séminifères commencent à émettre des spermatozoïdes, jusqu'au vide quasi total constaté au mois de juin. La coloration traduit effectivement cette évolution.

Microscopie photonique :

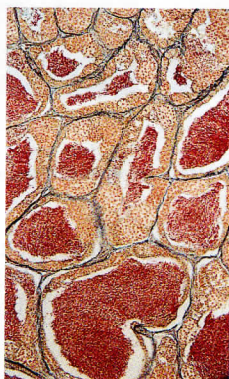
Avant l'émission de spermatozoïdes



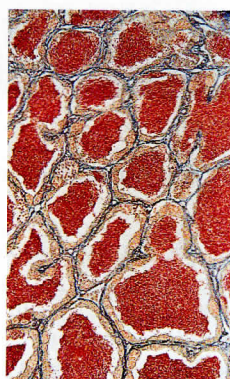
Septembre



Octobre

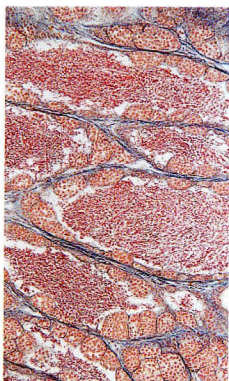


Novembre

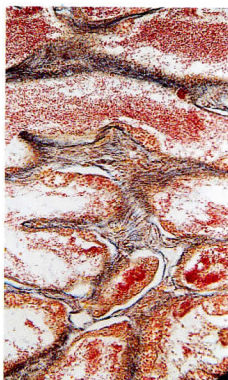


Décembre

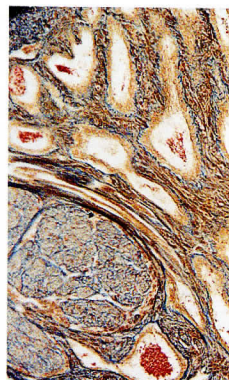
Pendant et après l'émission de spermatozoïdes



Avril



Mai



Juin

Fig. 4. Evolution quantitative des spermatozoïdes selon la période du cycle.

Microscopie électronique à balayage :

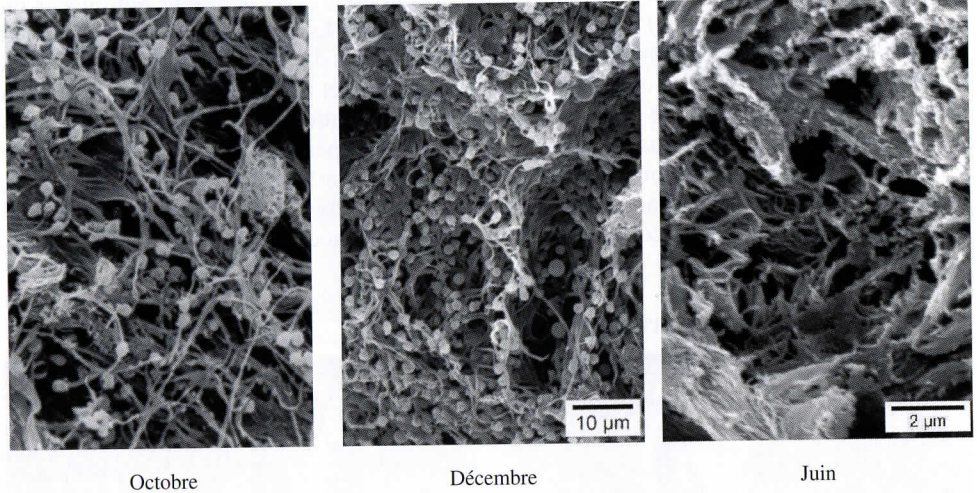


Fig.5. Evolution quantitative des spermatozoïdes selon la période du cycle, repérée en MEB.

De la même façon, en microscopie électronique à balayage on constate l'augmentation du nombre des spermatozoïdes entre octobre et décembre. L'examen des préparations permet de suivre l'évolution des cellules de la lignée germinale. Les cellules de Sertoli sont particulièrement nettes. Avant la libération des spermatozoïdes, on observe la présence de ces derniers au niveau d'indentations de la membrane plasmique des cellules de Sertoli. En juin, les spermatozoïdes ont été évacués et les testicules paraissent vides : plus aucun spermatozoïde n'est observé inclus dans les indentations des cellules de Sertoli.

CONCLUSION

L'utilisation de la MEB présente plusieurs avantages par rapport aux techniques de l'histologie classique, étant bien entendu que les types d'images obtenus par les deux méthodes sont bien différents. Tout d'abord, bien qu'il soit préconisé une fixation particulière avec un fixateur respectant le pH, la pression osmotique et la composition ionique (6, 7) comme pour la microscopie électronique à transmission, il est possible, grâce au MEB d'examiner avec précision des pièces fixées à l'aide de fixateurs plus classiques (liquide de Bouin ou encore formol tamponné ou non,...). Il est cependant à préciser que ces fixateurs créent des artéfacts et interdisent l'examen des organites intracellulaires par exemple (après fracture, bien entendu), ce qui ne présente aucune gêne puisque la résolution des appareils classiquement utilisés ne permet pas de telles observations. Cette souplesse d'utilisation permet notamment l'examen d'échantillons prélevés et fixés sur le terrain. Par ailleurs, la préparation des échantillons est techniquement moins difficile que celle des coupes histologiques et ne nécessite notamment pas la phase toujours délicate de confection des coupes, ce qui présente un avantage lorsque le matériel étudié est rare. Dans le cas de la présente étude, notons la bonne lisibilité des structures. L'examen de détail des spermatozoïdes prêts à être évacués est notamment bien plus aisé qu'en microscopie photonique. Le MEB permet d'appréhender l'organisation tridimensionnelle des organes, les positions spatiales des structures les unes par rapport aux autres et leur rapports anatomiques, complétant ainsi de manière précise et confortable l'examen des coupes séries.

Quelques inconvénients par contre font souvent choisir la MP par rapport à la MEB. L'absence de coloration peut être gênante dans la différenciation des composants tissulaires et plus particulièrement lors d'une approche histochimique. Mais le principal inconvénient reste certainement le coût de la méthode et l'accès aux appareils requis (appareil de contournement du point critique, métalliseur et microscope).

Dans la présente étude, la confrontation des résultats obtenus par les deux méthodes employées a permis de montrer avec précision l'évolution du testicule du black bass avec quelques renseignements complémentaires sur l'organisation intime des tissus et les relations entre leurs différentes composantes.

BIBLIOGRAPHIE

1. GOUBIER, V., MARTIN, M., KOK-KIDIS, M.J., EXBRAYAT, J.M. 1997. Observations on ovary maturation of reared black-bass (*Micropterus salmoides* L.). An histological description of the annual reproductive cycle. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 44, 159-169
2. MARTIN, M., GOUBIER, V., KOK-KIDIS, M.J., EXBRAYAT, J. M. 1997. Comparative evolution of the ovary maturation of black-bass (*Micropterus salmoides*) according to the water temperature. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 44, 129-138.
3. MARTIN, M., GOUBIER, V., EXBRAYAT J-M. 1998. Oocyte degenerative process of female black-bass (*Micropterus salmoides*) prevented to spawn. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 45, 545-552.
4. MARTIN, M., GOUBIER, V., EXBRAYAT, J-M., KAMVIRA, S. 1999. Effect of environmental factors on oocyte maturation and spawning delay or inhibition, in black-bass (*Micropterus salmoides* L.) : Synthesis of two years experiments. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 46, 63-70.
5. BENZ, G.W., JACOB, R.C. 1986. Practical field methods of sexing largemouth bass. *Prog. Fish-Cult.*, 48, 221-225.
6. POTTU-BOUMENDHIL, J. 1989. Microscopie électronique : principes et méthodes de préparation. Ed. INSERM, 221 p.
7. MOREL, G. 1991. Microscopie électronique : cryométhodes, immunocyto-logie, autoradiographie, hybridation in situ. Ed. INSERM, 591 p.