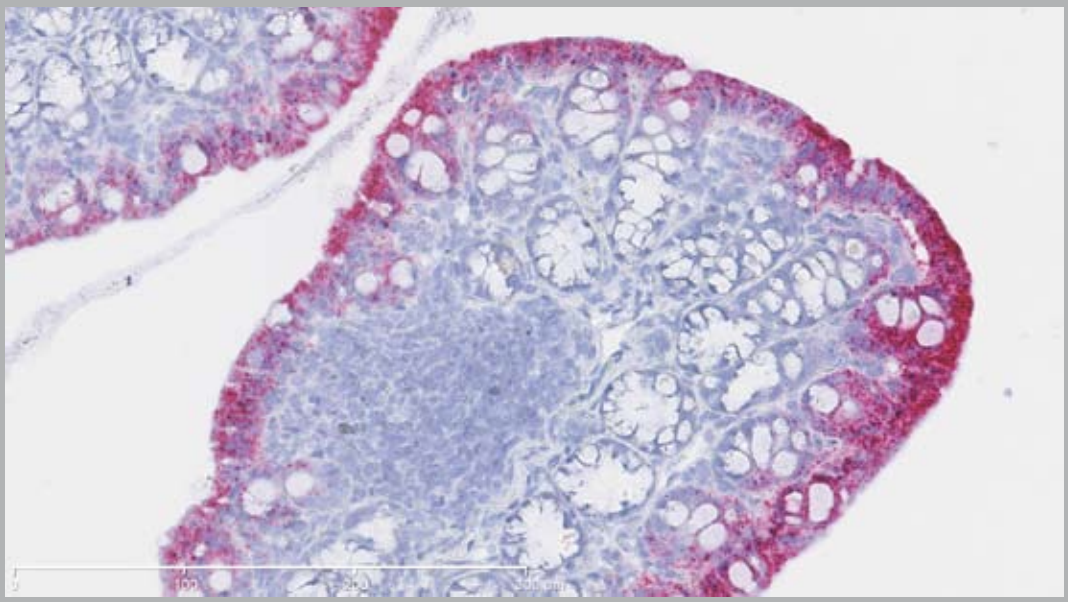
REVUE FRANÇAISE D' HISTO TECHNOLOGIE

2012, Vol 25, n°1



REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

www.afhisto.com

2012, VOL **25**, N° 1

ASSOCIATION FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE
N° 8397, J.O. du 17 février 1988, n°7

OBJET : promouvoir les échanges d'information, la communication dans tous les domaines de la technique histologique, par l'organisation de congrès, de groupes de travail, ainsi que l'édition d'une revue.

COMPOSITION DU BUREAU :

Nathalie Accart, Illkirch, *Présidente*

Sandra Dovero, Bordeaux, *Vice-présidente*

Christelle Sachot-Gérard, Bâle, *Trésorière*

Alain Fautrel, Rennes, *Secrétaire*

Patricia Cavelier, Montpellier, *Secrétaire adjointe, spécialisée en communication*

Lydie Guigand, Nantes, *Relation avec les firmes*

Lydie Venteo, Reims, *Rédactrice en chef de la Revue*

Gwénaëlle Randuineau, St. Gilles, *Chargée de communication, Site Internet*

Sophie Luccantoni-Freire, Fontenay-Aux-Roses, *Responsable Reportage*

Nombre d'adhérents au 31 décembre 2012 : 115

Siège social :
Association Française d'Histotechnologie
Mairie d'Amboise, BP 247
37402 AMBOISE CEDEX

REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

Publication annuelle référencée dans la base Pascal de l'INIST.

La Revue Française d'Histotechnologie est l'organe officiel de l'Association Française d'Histotechnologie (AFH). Elle publie des revues, des notes techniques, des éditoriaux, des articles originaux ainsi que le courrier à l'éditeur.

L'appartenance à l'Association Française d'Histotechnologie comprend l'abonnement à la revue. Numéro supplémentaire 20 euros.

Courrier, manuscrits :
Lydie VENTEO
Label Histologie
8 rue Belin, 51100 REIMS
lydie.venteo@orange.fr

Présidente du comité de lecture :
Lydie VENTEO, Label Histologie, Reims

Membres du comité de lecture :
Pour chaque manuscrit, deux à trois lecteurs sont choisis pour leur compétence dans le domaine considéré.

Revue Française d'Histotechnologie
Editeur : Association Française d'Histotechnologie
Imprimeur : Imprim'lingo, 67540 OSTWALD
Directrice de publication : Nathalie ACCART
Publicité : Lydie GUIGAND
Rédactrice en chef : Lydie VENTEO
Tirage : 300 exemplaires
ISSN 0997-6434

© : toute reproduction totale ou partielle des articles est soumise à l'autorisation préalable de l'Editeur.

Revue Française d'Histotechnologie

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Les articles soumis doivent être approuvés par leurs auteurs et éventuels co-auteurs et ne **doivent pas avoir été publiés auparavant.**

I. Soumission des manuscrits

par voie postale à : Lydie VENTEO
Label Histologie
8 rue Belin - 51100 REIMS

Par messagerie électronique à : lydie.venteo@orange.fr

Dans tous les cas, fournir le nom, les adresses postale ET électronique de l'auteur en charge de la correspondance. **La première page des illustrations couleurs est prise en charge par l'AFH, les suivantes sont publiées à la charge de l'auteur.** Attention, une simple flèche en couleur sur une photographie en noir et blanc constitue une impression en couleur.

II. Présentation générale des manuscrits.

Dactylographie

La première page du manuscrit indique le titre de l'article (éventuellement sous-titre), le nom et prénom de chaque auteur, son affiliation avec ses adresses postale complète et électronique.
Les manuscrits doivent être saisis dans un logiciel de traitement de texte, de préférence Microsoft Word et si possible en police de caractère « Times New Roman » de taille 12.
Les médicaments doivent être mentionnés selon leur dénomination commune ou leur nom chimique.
Les références commerciales des réactifs (référence et fournisseur) et matériel (modèle et fabricant) utilisés sont citées clairement, ainsi que les conditions expérimentales des travaux décrits.

Acronymes

Dans le corps du texte, il est indispensable d'expliciter les acronymes utilisés lors de leur première apparition (sauf s'il s'agit d'une unité de mesure internationale). Le terme entier précède l'acronyme inscrit entre parenthèses : *Association Française d'Histotechnologie (AFH)*. Pour les unités de mesure internationales, les 7 unités de base du Système International d'Unités (SI) sont : le mètre (m), le kilogramme (kg), la seconde (s), l'ampère (A), le kelvin (K) et le candela (cd).

Les documents iconographiques (Figures et Tableaux)

- Les Figures sont numérotées en chiffres arabes et par ordre d'apparition dans le texte : (Figure 1).
- Les Tableaux sont numérotés en chiffres romains par ordre d'apparition dans le texte : (Tableau I).
Les légendes des Figures et Tableaux sont portées les unes à la suite des autres, en fin d'article.

L'iconographie et le texte, sous forme papier, doivent être adressés par courrier, à l'adresse précédemment mentionnée. Les illustrations sont clairement identifiées (*Figure 1, Tableau I*). Ils seront restitués à l'auteur après édition de la revue.

L'iconographie et le texte, sous forme numérique, doivent être transmis
- soit en doc attaché par courriel et formuler ainsi :
*1 fichier (**Word** de préférence, caractères « **Times New Roman, taille 12** »), avec uniquement le texte et les légendes photos **et**
*1 fichier au format **TIFF** avec une résolution minimum de **300 dpi** pour l'iconographie seule, clairement identifiée et nommée dans le texte (Figure 1a, Figure 2…)

- soit sur CD portant le nom de l'auteur
Le support numérique sera restitué à l'auteur après édition de la revue.

Quelques recommandations concernant l'iconographie numérique : elle ne doit pas être élaborée avec des logiciels bureautiques (Powerpoint, paintbrush…) ni être compressée. Sous ces formats, elle n'est pas ou peu exploitable par l'imprimeur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES
Les références bibliographiques, sont numérotées en chiffres arabes, classées selon l'ordre d'apparition dans le texte et portées en fin d'article. Le numéro de la référence bibliographique citée est mentionné entre parenthèses. Le nom de la revue doit correspondre aux abréviations disponibles dans les catalogues de l'**Institut de l'Information Scientifique et Technique** (INIST). **http://services.inist.fr/public/fre/conslt.htm.** Elle doit de plus correspondre au style et dactylographie suivants :

Pour les articles :
1. KOLOPP M : Le sujet roux. Rev.fr.histotechnol., 2008, **21** (1), 29-38.

Pour les livres :
1. TERNYNCK T. & AVRAMEAS S.- Techniques immunoenzymatiques. 2e éd. Inserm, Paris, 1987.

Rev. Fr. Histotechnol., 2011, **24**, n°1, p.11 à 12

L'HISTOLOGIE OÙ L'ART DANS TOUS SES ÉTATS

Pour les 25 ans de la revue, je souhaite vous parler de la place de l'histologie dans le monde de l'art.

Je ne parle pas d'objets customisés comme des tasses ou même des cravates imprimées de tumeurs gliales, sarcomes ou d'adénocarcinomes… Non je souhaite vous parler de véritables artistes qui se sont inspirés de l'histologie pour créer des belles œuvres.

Mais avant tout, le cœur de notre de métier reste l'image. Nous avons la chance de pouvoir observer au microscope optique, à fluorescence ou au microscope électronique des structures de toute beauté. Rien de plus naturel alors de créer depuis de très nombreuses années des concours de photographie en microscopie. Une façon de voir le beau dans l'infiniment petit. Et malgré notre quotidien au microscope, ces images sont toujours une surprise pour les yeux. L'avancée des techniques permet de capturer des images de plus en plus incroyables qui se révèlent être magnifiquement belles.

Cependant, la place de l'histologie dans les arts ne se limite pas uniquement à la photographie. Certains artistes comme Jonathan Hetts ou Kathryn Elliget ont réalisés des peintures contemporaines sur le muscle, le cartilage mais également sur des phénomènes physiologiques comme la lyse cellulaire, l'apoptose. Cela reste malgré tout de rares œuvres dans leur parcours. Quant à Andréa Offerman, elle s'inspire de ces cours d'anatomie et d'histologie pour créer ses esquisses. Bien que ses œuvres ne représentent pas directement des structures histologiques. Elle reste fascinée par la complexité des corps et utilise ces connaissances pour perfectionner ces œuvres et les enrichir de très nombreux détails.

C'est avec l'artiste Kathaman où nous retrouvons notre cœur de métier avec l'exposition de sa collection de 26 tableaux intitulée « histological colorations : exploration into the human form ». Des tableaux très colorés qui représentent des coupes histologiques des différents organes. Cette ancienne technicienne en histologie avoue qui lui arrivait de réaliser des colorations spéciales, d'obtenir des résultats différents de ceux désirés et de « s'être perdue dans les couleurs de ce monde microscopique ».

Mon artiste préférée dans l'art de l'histologie reste Penny Oliver qui a créé « DiagnosisArt ». En s'inspirant d'images pathologiques ou histologiques, cette artiste réinterprète en acrylique, nos paysages intérieurs d'une façon extrêmement précise et abstraite. Malgré la gravité de certaines œuvres, les tableaux sont toujours de formes et de couleurs harmonieuses et se révèlent d'une grande beauté.

Mais revenons à notre quotidien, loin des galeries et des œuvres d'art, où la réalisation de coupes parfaites, de colorations impeccables, de techniques éclatantes restent nécessaire pour nous permettre une analyse histologique de bonne qualité mais également pour réjouir nos yeux. Cela est et restera tout un art…

Lydie VENTEO

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 13 à 21

DESCRIPTION HISTOLOGIQUE DES DIFFERENTS STADES DE DEVELOPPEMENT OVOCYTAIRE DE *BARBUS CALLENSIS* (VALENCIENNES, 1842) DANS L'OUED SOUMMAM (ALGERIE)

*Hafsa DJOUDAD-KADJI[1,2], Belaid KADJI[1], Sihem BENSLIMANE[1], Jean-Marie EXBRAYAT[2], Mokrane IGUER-OUADA[1] et Christine CHEVALIER[2]
*Kadji_hafsa@yahoo.fr

[1] Université A-Mira de Béjaïa, Targua Ouzammour 06000, Laboratoire associé en Ecosystèmes Marins et Aquacoles, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Algérie
[2] Université de Lyon, UMRS 449, Laboratoire de Biologie Générale, UCLy; Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, EPHE, 25 rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 02, France

[(*)] Auteur en charge de la correspondance :
Tél : 00 (213) 775 56 98 73 - E-mail : kadji_hafsa@yahoo.fr

RESUME

Ce travail est consacré à une description histologique des différents stades du développement ovocytaire de l'espèce *Barbus callensis* vivant dans l'oued Soummamen Algérie.

Entre mars 2010 et mars 2011, 268 femelles ont été pêchées, disséquées et leurs ovaires ont fait l'objet d'une étude histologique. Les observations ont révélé une coexistence, au sein d'une même gonade, de plusieurs follicules à différents stades de maturité sexuelle, ce qui témoigne d'une ovogenèse asynchrone.

Les follicules ovariens ont été classés en sept stades, en considérant la taille des ovocytes, la constitution de la membrane folliculaire et la distribution des inclusions cytoplasmiques. Le premier et le deuxième stade correspondent à une croissance primaire des ovocytes, les stades III et IV correspondent à une phase d'accumulation de réserves avec apparition des différentes membranes ovocytaires. Les stades V et VI correspondent à une phase de maturation complète et le stade VII à celle de la ponte.

INTRODUCTION

La reproduction est un processus universel qui assure la pérennité des espèces en transmettant l'information génétique d'une génération à l'autre. Ce processus revêt généralement une activité saisonnière chez les animaux [1]. Un cycle sexuel est le temps nécessaire à la transformation d'une gonie en gamète mûr [2, 3]. Cette transformation affecte directement la morphologie et le poids des gonades. Le cycle reproducteur est affecté par les variations de l'environnement, et il comporte deux parties essentielles, la gamétogenèse et la fraie [4].

La gamétogenèse correspond à la formation de cellules hautement spécialisées : les spermatozoïdes et les ovules. Initialement les gonies souches (spermatogonie et ovogonies) se multiplient activement pour donner naissance aux spermatocytes et ovocytes primaires. Chez le mâle, les spermatocytes se transforment immédiatement en spermatides, tandis que chez la femelle les ovocytes subissent une phase de croissance lente qui les conduit au stade de prévitellogenèse. La phase finale de la gamétogenèse correspond à la vitellogenèse endogène (remaniements internes dans le cytoplasme) puis vitellogenèse exogène (apports de matériaux par le sang constituant une forte accumulation de réserves).

La période de fraie comporte une séquence d'évènements qui débute par la maturation des gamètes lesquels sont ensuite libérés de la gonades (spermiation et ovulation) puis du corps (éjaculation et oviposition), après un comportement reproducteur plus ou moins complexe, pour aboutir à la fécondation.

Il est admis, que la connaissance d'un cycle de reproduction d'une espèce donnée peut conduire à des applications diverses, tant dans le domaine biologique pur que pour son exploitation à des fins économiques. Le barbeau *(Barbus callensis)* est le poisson le plus commun et le plus abondant des eaux continentales nord-africaines de l'Algérie, du Maroc et de la Tunisie [5, 6, 7, 8, 9]. En pisciculture, il est utilisé comme poisson fourrage pour les espèces carnassières (brochet, black-bass, sandre, perche) [8].

Cette espèce peuplant les oueds et les cours d'eau algériens reste aujourd'hui encore peu étudiée, en particulier qui concerne sa physiologie de reproduction qui demeure mal connue. Ce travail est consacré particulièrement à une description histologique des différents stades du développement ovocytaire.

MATERIEL ET METHODES

Présentation de la zone d'échantillonnage

Les gonades, objet de cette étude histologique, ont été prélevées à partir d'individus de *Barbus callensis* échantillonnés dans l'oued Soummam.

Cet oued se trouve dans la région de Béjaia et représente l'un des principaux cours d'eau algériens, il parcourt toute la vallée de la Soummam sur environ 90 km (Figure 1a) [10].

Figure 1 : (a) Réseau principal et affluent de l'oued Soummam.

En se référant à l'étude de Bacha et Amara [11], en travaillant sur 11 stations d'échantillonnage, les auteurs ont trouvé que 10 de ces stations (90,9%) hébergent *Barbus callensis* avec une même fréquence d'abondance. Cette espèce est seulement absente de la station située à l'embouchure de l'oued en méditerranée, en eaux saumâtres. En effet la salinité des eaux, lorsque son degré atteint 15 à 20‰, constitue un facteur limitant pour la survie du barbeau [12].

Pour notre travail, la zone réelle d'échantillonnage se situe à l'amont du cours d'eau, dans la station d'Akbou (Figure 1b) caractérisée par la jonction de

Figure 1 : (b) zone réelle d'échantillonnage. N : Nord. EK : El-Ksseur. SA : Sidi Aïch. EK : El-Ksseur.u AK : Akbou. Oued. EM : Embouchure. OG : Oued Ghir. OR : Oued Roumila. OA : Oued IghzerAmokrane. OI : Oued Ighrem. OB : Oues Bousselam. OS : Oued Sahel.

deux cours d'eaux importants : Bousselam, orienté vers l'est, qui prend naissance sur les haut-plateaux de Sétif, et Sahel, orienté vers l'ouest, formé par la confluence des rivières Ziane et Ed-Dous provenant de Bouira [10]. Ces diverses confluences confèrent à cette station une diversité importante.

268 femelles de barbeaux ont été échantillonnées à l'aide d'une canne à pêche et d'un filet à trémail, entre mars 2010 et mars 2011. Ces spécimens ont été disséqués et leurs ovaires ont fait l'objet d'une étude histologique.

Préparation des lames histologiques

La technique appliquée pour la préparation histologique des coupes de gonades de *Barbus callensis* est celle adaptée par Djoudad-Kadji & *al.* [13]. L'association optimale, du liquide de Bouin aqueux comme fixateur et du trichrome azan de Roméis modifié comme coloration permet la visualisation en détail des structures histologiques. Cette association est à recommander dans tout travail visant à une étude détaillée de la dynamique des constituants ovariens des téléostéens. L'association formol/hématoxyline-éosine ne révèle pas autant de détails mais reste néanmoins tout à fait utilisable pour la mise en évidence de l'architecture générale des tissus, notamment pour des études de biométries cellulaires concernant la dynamique de la reproduction.

RESULTATS

Histologie des ovaires

L'examen des coupes histologiques des ovaires de *B. callensis* à différentes périodes du cycle sexuel a révélé, pour la totalité des spécimens, la coexistence de plusieurs stades de développement ovocytaire à différents niveaux de maturité au sein d'un même ovaire (Figure 2a).

Cependant, la fréquence relative des différents stades de développement folliculaire au sein d'une même coupe histologique, fait l'objet d'une variation annuelle, dont dépend l'activité de reproduction du poisson notamment en ce qui concerne la fraie.

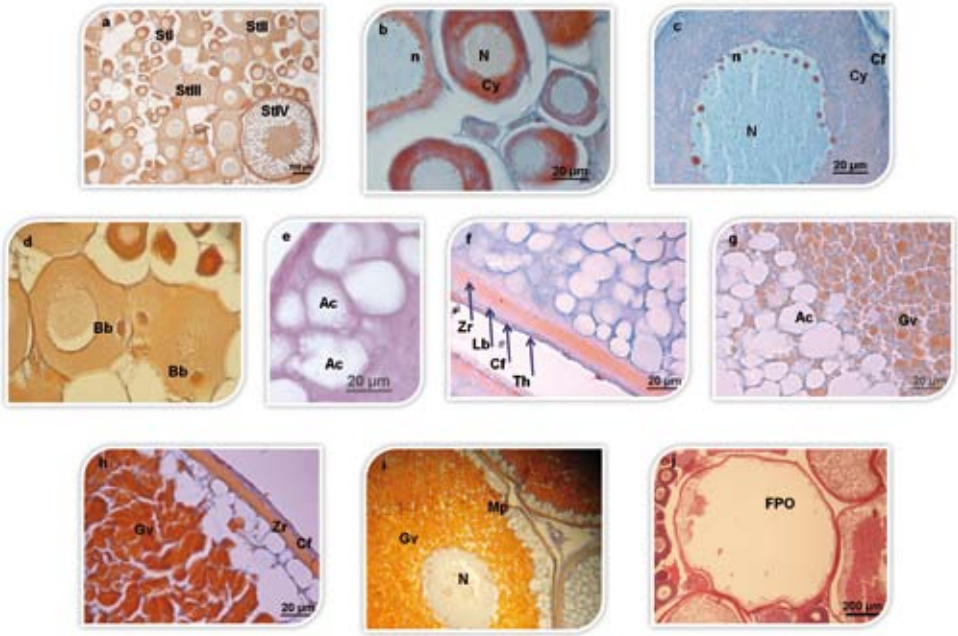


Figure 2 : coupes histologiques des ovaires de *B. callensis* illustrant les différents stades de la maturité sexuelle durant un cycle reproducteur. **(a)** vue générale d'un ovaire contenant plusieurs stades de développement. **(b)** ovocytes au stade I. **(c et d)** ovocytes au stade II. **(e et f)** ovocytes au stade III. **(g)** ovocyte au stade IV. **(h)** ovocytes au stade V. **(i)** ovocyte au stade VI. **(j)** ovocytes au stade VII. **(a, b, c, e, f, g, h)** ovaires fixées dans le bouin et colorés à l'azan modifié. **(d)** ovaires fixés dans le formol et coloré à l'HE. **(i)** ovaire fixé dans le bouin et coloré à l'HE. St : stade. N : noyau. n : nucléole. Cy : cytoplasme. Cf : cellules folliculaires. Bb : noyau de balbiani. Ac : alvéoles corticaux. Zr : zona radiata. Lb : lame basale. Th : cellules thécales. Gv : gouttelettes vitellines. Mp : Micropyle. FPO : follicule post-ovulatoire.

En considérant la taille des ovocytes, la constitution de la membrane folliculaire et la distribution des inclusions cytoplasmiques, les follicules ovariens de *B. callensis* ont été subdivisés en sept stades.

Stade I : On considère comme appartenir à ce stade les ovocytes primaires (jeunes ovocytes) qui sont issus de la division mitotique des cellules germinales. Les ovocytes de *B. callensis* examinés à ce stade sont de forme irrégulière ; de taille comprise entre 4 et 160 µm et sont observés dans un nid germinatif. Ces ovocytes présentent un cytoplasme dense, homogène et basophile avec un grand noyau central contenant 1 à 4 nucléoles. A ce stade aucune cellule folliculaire n'est observée (Figure 2b).

Stade II : Ce stade est marqué par l'augmentation de la taille des ovocytes primaires (60 à 220 µm) et leur migration hors du nid germinatif. La chromatine est totalement dispersée dans le noyau qui présente de nombreux nucléoles (plus de 10) situés contre la membrane nucléaire

(Figure 2c). Le cytoplasme apparait homogène et peu basophile présentant, pour certains ovocytes, une région sombre correspondant à un noyau de Balbiani (Figure 2d). Autour des ovocytes on observe l'apparition d'une légère couche de cellules folliculaires très aplaties (Figure 2c).

Stade III : La fin de la phase de croissance primaire constitue le début du troisième stade de développement des follicules ovariens de *B. callensis.* Ces follicules à ce stade contiennent des ovocytes mesurant entre 230 et 790 µm et sont caractérisés par un noyau central de coloration homogène avec de nombreux nucléoles situés à la périphérie. Le cytoplasme commence à devenir hétérogène par l'apparition d'alvéoles corticaux à la périphérie des ovocytes (Figure 2e). Le noyau de Balbiani a disparu. Une succession de différentes couches minces entourent certains ovocytes, ce sont de l'ovocyte vers la périphérie du follicule ovarien : la zona radiata colorée en orange à l'azan modifié, la couche de cellules folliculaires aplaties colorées en bleu à l'azan modifié, la lame basale et les cellules thécales très allongées (Figure 2f).

Stade IV : Il est caractérisé par le début de la vitellogenèse. Les follicules ovariens contiennent des ovocytes plus volumineux, atteignant des tailles comprises entre 500 et 890 µm, ils possèdent un noyau toujours central et présentent de petites vésicules de vitellus et une couronne épaisse d'alvéoles corticaux. A ce stade, la zona radiata et la couche de cellules folliculaires sont bien développées (Figure 2g).

Stade V : Les ovocytes des follicules ovariens augmentent encore de volume pour atteindre 900 à 1300 µm. L'activité vitellogénique des ovocytes à ce stade se traduit par l'augmentation du volume des vésicules vitellines dispersées dans tout le cytoplasme, les alvéoles corticaux sont repoussés vers la périphérie. Le noyau prend une forme irrégulière. La zona radiata et la couche des cellules folliculaires deviennent plus épaisses (Figure 2h).

Stade VI : Il s'agit du stade de maturation complète des ovocytes, qui atteignent leur taille maximale (1200 à 1900 µm). Ils sont totalement envahis par les gouttelettes vitellines, qui ont nettement augmenté de volume et sont serrées les unes contre les autres en restant individualisées. Ce stade est caractérisé par la migration du noyau et la formation du micropyle. Les alvéoles corticaux sont disposés en fine couronne à la périphérie de l'ovocyte en une zone considérablement réduite. Les différentes couches cellulaires entourant les ovocytes sont bien différenciées et ont atteint leur taille maximale (Figure 2i).

Stade VII : Cette phase se caractérise par l'expulsion des ovocytes hors de l'ovaire. La figure 2j montre un follicule ovarien post-ovulatoire. Après la ponte, le follicule post-ovulatoire prend un aspect dégénéré caractérisé par des cellules folliculaires à la forme irrégulière.

Atrésie

La figure 3 montre des follicules atrétiques. Certains sont issus de la dégénérescence des ovocytes aux stades III et IV (Figures 3a et 3b). Ces ovocytes atrétiques sont dispersés dans l'ovaire et se

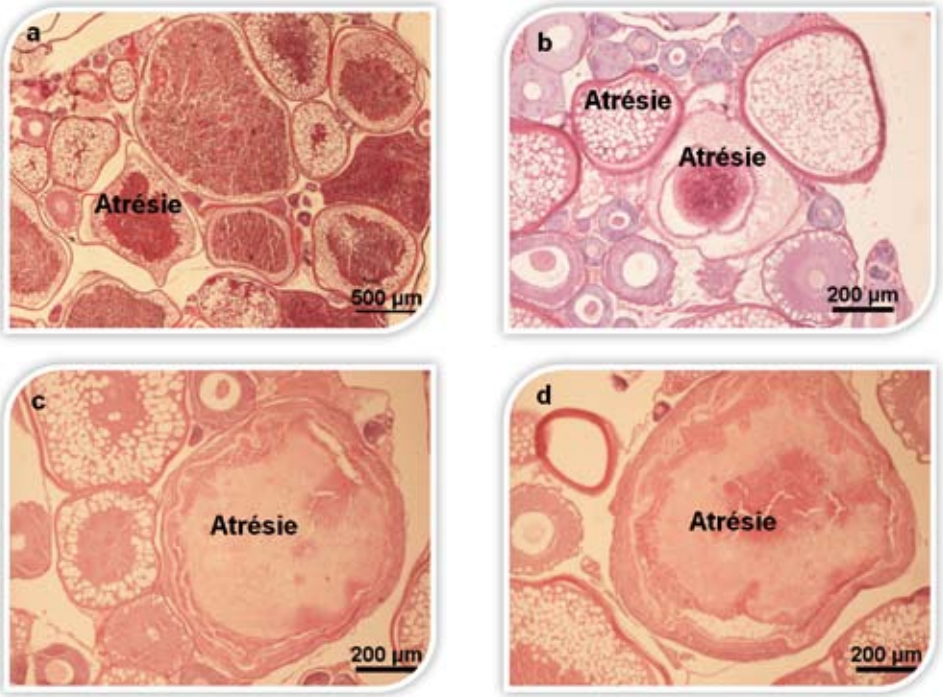


Figure 3 : coupes histologiques des ovaires de *B. callensis* illustrant les différents ovocytes atrétiques. **(a, b)** ovocytes atrétiques aux stades I et II. **(c, d)** ovocytes atrétiques aux stades V et VI. **(a, c, d)** ovaires fixées dans le bouin et colorés à l'HE. **(b)** ovaires fixés dans le formol et coloré à l'azan modifié.

distinguent par leur membrane plasmique plissée. Les figures 3c et 3d montrent des ovocytes au stade V et VI (maturation finale) dont la dégénérescence est sans doute causée par une absence de ponte.

Dynamique du cycle sexuel

Le suivi de l'état histologique des ovaires a permis de situer les différents stades du développement ovarien sur des périodes bien distinctes de l'année.

Les coupes histologiques de la quasi-totalité (97%) des ovaires prélevés sur des spécimens capturés durant la saison estivale (Juillet et août), présentent uniquement les deux premiers stades de maturité sexuelle (I et II). Cette période correspond au repos sexuel de l'espèce étudiée et au temps de la régénération cellulaire.

Durant une longue période automnale, s'étalant du mois de septembre au mois de décembre, le stade III est prédominant et coexiste avec les stades I et II avec des pourcentages d'individus de 74,6% et 25,3% respectivement. Cette phase marque un début actif de la dynamique ovocytaire de *B. callensis.*

Au début du mois de janvier (saison hivernale) certaines femelles (18,6%) atteignent déjà le quatrième stade du développement ovarien, ce qui les classe parmi les individus à reproduction précoce. D'autres femelles (81,3%) ont gardé la même distribution ovocytaire qu'en automne.

A partir du mois de mars, les stades III et IV sont majoritaires (78,3%) ce qui correspond au début de l'accumulation des réserves. Toutefois, quelques femelles (11,1%) sont déjà parvenues à des stades de maturité sexuelle très avancés (présence de stades V et VI). Cependant la plupart des ovaires (90,4%) ne sont totalement matures qu'entre fin avril et juin, ce qui signifie une activité sexuelle intense de l'espèce *B. callensis* durant le printemps.

La majorité des ovaires prélevés fin juin et début juillet sont à un stade de pré ponte ou de post ponte avec quelques femelles qui sont déjà rentrées en repos sexuel avec des ovocytes atrétiques.

DISCUSSION

Cette étude préliminaire sur la dynamique histologique des follicules ovariens de la population de *B. callensis* de l'oued Soummam (Algérie), tout au long des différentes périodes du cycle sexuel, a permis d'observer, au sein d'une même gonade, la coexistence de plusieurs follicules à différents stades de maturité sexuelle, ce qui témoigne d'une ovogenèse asynchrone [14, 15, 16]. Ce type d'ovogenèse a été signalé auparavant chez la même espèce pour les populations tunisiennes et marocaine [17, 18], ainsi que chez *B. fritschi* au Maroc [18].

A partir de la distribution annuelle des différents stades de développement folliculaires, on peut déduire aisément que l'espèce *B. callensis* se reproduit une fois dans l'année durant la saison printanière avec une seule ponte déclenchée par l'élévation des températures, certains individus continuent à présenter des pontes durant le début de la saison estivale. Kraiem [17] et Bouhbouh [18] ont signalé des résultats similaires pour les populations femelles de *B. callensis* tunisienne et marocaine respectivement.

CONCLUSION

Cette caractérisation de la période de reproduction des femelles de *B. callensis*, basée sur l'examen histologique des ovaires, nous a permis de mieux comprendre la dynamique de reproduction et de la situer dans le temps. Ces premiers résultats pourraient être exploités pour mieux comprendre dans le futur l'impact de l'environnement sur la physiologie de reproduction de cette espèce, mais aussi d'optimiser les techniques de reproduction artificielle aussi bien pour un repeuplement des cours d'eau que pour une exploitation de *B. callensis* comme poisson fourrage.

BIBLIOGRAPHIE

1. FABIOUX C. : Origine et développement des cellules germinales chez l'huître *Crassostrea gigas* : Intérêt pour le contrôle de la reproduction en écloserie. Thèse Doct. Univ. Bretagne occidentale, 2004, 160p

2. MASON J.C. : The fecundity of the walleye pollok, *Theragra chalcogramma* (Pallas), spawing in canadian waters. J. fish. Biol., 1985, 27, 335-346.

3. LE MOIGNE A. : Biologie du développement. 4e édit Masson Paris, Milan, Barcelone, 1997, 2-62.

4. BILLARD R., BRETON B. : Le cycle reproducteur chez les poissons téléostéens. Cahier du laboratoire, Mantreau, 1981, 12, 43-66.

5. MOUSLIH M. : Peuplements Ichtyologiques des lacs du Moyen-Atlas Marocain, Région d'Azrou. Cybium., 1989, 13 (1), 13-24.

6. KRAIEM M.M. : Systématique, biogéographie et bio-écologie de *Barbus callensis* Valenciennes, 1842 (poisson, *Cyprinidé*) de Tunisie. Thèse Doct Es Sci. Fac. Sci. Tunisie, 1994, 227p.

7. BERREBI P., KRAIEM M.M., DOADRIO I., EL GHARBI S., CATTANEOBERRIBI G. : Ecological and genetic differenciation of *Barbus callensis* population in Tunisia. J. Fish. Biol., 1995, 47, 850-864.

8. CHERGHOU S., KHODARI M., YAAKOUBI F., BENABID M., BADRI A. : Contribution à l'étude du régime alimentaire du barbeau (*Barbus barbus callensis* Valenciennes, 1842) d'un cours d'eau du Moyen-Atlas (Maroc) : Oued Boufekrane. Rev. Sci. Eau, 2002, 15(1), 153-163.

9. M'HADHBI L., BOUMAÏZA M. : Étude de la croissance relative du Barbeau : *Barbus callensis* (Cyprinidae) de la retenue de barrage Joumine (Nord Tunisien). Analele Ştiinţifice ale Universităţii, 2008, 4, 245-258.

10. BENHAMICHE N. : Modélisation de la relation pluie-relief en vue de la cartographie par Krigeage : cas du bassin versant de la Soummam. Thèse de magistère en Sciences agronomiques, hydrologie, Institut national agronomique El- Harrach (Alger), 1997, 180 p.

11. BACHA M., AMARA R. : Les poissons des eaux continentales d'Algérie. Étude de l'ichtyofaune de la Soummam. Cybium, 2007, 31, 351-358.

12. KRAIEM, M.M., PATTEE E. : Salinity tolerance of the barbel, *Barbus callensis* Valenciennes, 1842 (Pisces : Cyprinidae) and its ecological significance. Hydrobiologia, 1988, 166, 263-267.

13. DJOUDAD-KADJI H., BENSLIMANE S., CHEVALIER C., KADJI B., EX-BRAYAT J.-M., IGUER-OUADA M. : Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de *Barbus callensis* : variation de fixateurs et de colorants. Rev. Fr. Histotechnol., 2011, 24(1), 21-28.

14. WALLACE R.A., SELMAN K. : Cellular and dynamic aspects of oocytes growth in teleosts. Amer. Zool., 1981, 21, 325-343.

15. NAGAHAMA Y. : The functional morphology of teleosts gonads. In : Fish physiology. Hoar W.S., RandallD.J. and Donalson E.M. eds., vol. IXA. London : Academic Press, 1983, 223-275.

16. SPECKER J.L., BERLINSKY D.L., BIBB H.D. : Oocyte development in striped bass : factors influencing estimates of age at maturity. Amer. Fish. Soc. Symp., 1987, 1, 162-174.

17. KRAIEM M.M. : Chronologie de la reproduction et cycle de développement des gonades chez *Barbus callensis* Valenciennes, 1842 (Pisces, Cyprinidae) de Tunisie. Bull. Inst. Natl. Sci. Technol. Mer, 1997, 24, 74-88.

18. BOUHBOUH S. : Étude bioécologique de deux espèces de barbeau, (*Barbus barbus callensis* (Val.) et *Barbus labeobarbus frifshii* (Val.)) dans la retenue de barrage Allai El Fassi, Thèse de doctorat, Fac. Sci. Fès, Maroc. 2002, 197p.

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 23 à 40

LES CHANGEMENTS DE PARADIGME EN SCIENCES DE LA VIE OU COMMENT OBTENIR DES RÉSULTATS JUSTES AVEC DES IDÉES ET DES EXPÉRIENCES FAUSSES

Jean-Marie EXBRAYAT
Université de Lyon, UMRS 449, Biologie générale, Université Catholique de Lyon, Reproduction et développement comparé, EPHE, 25 rue du Plat, 69288 Lyon Cedex 02
E-mail : jmexbrayat@univ-catholyon.fr

Un paradigme peut être défini comme un modèle reposant sur une base conceptuelle bien définie. Dans les sciences cela peut correspondre à une théorie quasi dogmatique à laquelle la recherche se réfère pendant une période donnée. A un moment, le paradigme en vigueur peut être bousculé, anéanti et remplacé par un nouveau paradigme qui, à son tour, deviendra transitoire [1].

Après avoir exposé quelques aspects historiques de paradigmes généraux relevant des sciences de la vie, seront présentés quelques exemples en biologie cellulaire et tissulaire. Cela nous permettra de montrer que les changements de paradigmes sont étroitement liés à l'évolution des moyens d'observation et de leurs performances, eux mêmes étroitement corrélés à l'évolution des concepts. Finalement, quels que soient les changements de paradigme, les sciences progressent de manière inexorable, approchant la réalité (pourrait-on dire « la vérité » ?) du monde, augmentant ses propres possibilités et donc le champ de leur application.

Les grands paradigmes de l'histoire de la biologie

Pour illustrer ce propos, le premier exemple est la génération spontanée, paradigme qui, pendant près de 2500 ans a été l'une des explications officielles de l'apparition des êtres vivants, au même titre que la reproduction sexuée, le second exemple étant la théorie de l'évolution qui représente un paradigme actuel d'explication du vivant.

Le paradigme de la génération spontanée

Pendant plusieurs siècles, pour expliquer l'apparition des êtres vivants, la génération spontanée des organismes a été admise conjointement à la reproduction par génération sexuée. Parmi les philo-

sophes ioniens et grecs, les « biophilosophes » dont parle de Wit [2], Anaximandre (610-547 av. J.-C.) considérait que les premiers animaux étaient protégés par une écorce épineuse qui éclatait sous l'action de la chaleur. Empédocle (485-425 av. J.-C.) considérait que la vie était issue d'une boue animée d'un feu intérieur, à l'origine de fragments d'êtres vivants tels que des têtes, des bras, des jambes, des troncs, aussi bien humains qu'animaux qui se rassemblaient au hasard et dont seules les associations harmonieuses étaient capables de vivre. Anaxagore (-499 à -428) et Démocrite (-450 à -360) avaient adopté la panspermie, c'est-à-dire la présence de particules invisibles, les « spermes » qui étaient partout, à l'origine des organismes vivants qu'ils composaient. Le poète latin Lucrèce (-98 à -55) considérait que la vie était apparue au hasard du rassemblement de particules douées d'un mouvement perpétuel et formant par ailleurs aussi bien la terre, l'air, l'eau ou les êtres vivants. La génération spontanée avait non seulement permis l'apparition des tout premiers êtres vivants mais elle coexistait toujours auprès de la reproduction sexuée.

Ce paradigme allait persister longtemps. Au XVIIe siècle pourtant, Francesco Redi (1626-1698) le refusait et démontrait par une expérience simple que le fumier et les corps en décomposition n'engendraient pas des vers ou des mouches, mais servaient de nid à ces dernières pour pondre leurs œufs minuscules. Malgré cette démonstration expérimentale, la théorie de la génération spontanée a tenu bon. Redi lui-même admettait d'ailleurs qu'elle restait possible dans certains cas. Les hommes de l'époque n'étaient pas encore prêts à accepter un tel changement de paradigme. A la même époque, Antoon Van Leeuwenhoeck (1632-1723), Hooke (1635-1703) construisaient les premiers microscopes et découvraient la vie invisible : levures, bactéries, infusoires, mais ils restaient persuadés que de tels êtres microscopiques ne pouvaient se former qu'à partir du milieu dans lequel ils étaient observés.

Au XVIIIe siècle, John Turberville Needham (1713-1781), partisan de la génération spontanée et Lazzaro Spallanzani (1729-1769) qui, au contraire la refusait, effectuèrent des expérimentations pour confirmer leurs thèses. Needham, utilisant un bouillon dans une fiole qui devenait trouble au contact de l'air, tenta de stériliser l'ensemble par la chaleur mais n'y parvint pas. Sa conclusion fut que des « microbes » étaient produits par génération spontanée à partir du bouillon. Spallanzani reprit les mêmes expériences avec plus de rigueur en stérilisant l'air des flacons par la chaleur avant de boucher hermétiquement le flacon (ce que Needham avait omis). Cette fois, aucun micro-organisme ne se développa et le liquide resta limpide. Même si les expériences de Spallanzani montraient que les microbes provenaient de l'air et étaient tués par ébullition, le paradigme de la génération spontanée restait vivace.

Il faut attendre la deuxième moitié du XIXe siècle et Louis Pasteur pour mettre un point final à l'ère de la génération spontanée après une célèbre démonstration publique en 1862. Pasteur remplit de milieu

nutritif un ballon, puis il étira le goulot du flacon en col de cygne à la flamme et fit chauffer le tout. La vapeur d'eau s'échappa et forma un bouchon dans le col de cygne. Le liquide restait limpide. Dès que le col fût cassé, le liquide devint trouble, rempli de micro-organismes visibles au microscope. A ce moment, l'existence de microbes invisibles dans l'air, c'est-à-dire de microbes qui n'étaient pas produits par génération spontanée par le milieu nutritif, fut enfin admise. Cette expérience intervint seulement trois ans après que Pouchet (1707-1788), professeur au Muséum d'Histoire naturelle de Rouen, ait publié un traité de 700 pages sur les preuves de la génération spontanée.

Il aura donc fallu plus de 150 ans pour que le paradigme de la génération spontanée, vieux de plus de deux millénaires, soit définitivement rayé des théories scientifiques.

Mais parallèlement à ce bouleversement des idées, se prépare une nouvelle révolution scientifique : la théorie de l'évolution. Voyons maintenant comment a pu naître cette dernière.

Le paradigme (ou la théorie) de l'évolution

Tout d'abord, précisons qu'il faut bien discerner le *fait* de l'évolution des *mécanismes* de l'évolution. Le fait concerne l'accumulation de preuves tangibles montrant que l'évolution biologique est possible et correspond à une réalité ; les mécanismes de l'évolution mettent en jeu des lois et des causes qui conduisent à l'évolution des êtres vivants. Les preuves se sont accumulées au cours de l'histoire et c'est à partir d'elles que des théories explicatives ont été élaborées avec de nombreux tâtonnements.

Après quelques premières idées plus ou moins proches d'une théorie de l'évolution (Maupertuis, Buffon, Bonnet), c'est certainement Lamarck (1744-1829) qui fut le premier à percevoir un phénomène évolutif [2]. Il constata que, au cours de la vie, sous l'influence de certaines habitudes ou usages, des individus modifiaient leur corps (par exemple la musculature chez les personnes exerçant des efforts physiques de manière régulière). Il en conclut que les modifications de comportement des individus vivants, leur besoin d'amélioration, les conduisent à de nouvelles habitudes qui auront pour conséquence des modifications morphologiques qui seront transmises directement à la descendance : l'allongement du cou de la girafe en est un exemple célèbre, la régression des yeux de la taupe en est un autre. Après cette approche, Geoffroy Saint-Hilaire (1772-1844) et les « néo-lamarckiens » décrivirent que ce sont les facteurs externes de l'environnement qui deviennent les moteurs fondamentaux d'une évolution biologique. L'hérédité de l'acquis n'a cependant jamais été démontrée jusqu'à présent [3].

C'est Charles Darwin (1809-1882) qui est à l'origine de la théorie moderne de l'évolution, basée sur la sélection naturelle. Il publie *L'origine des espèces* en 1859 après plus de 20 ans d'observation et de réflexion, depuis son retour d'un voyage autour du monde au cours duquel il a ob-

servé de nombreuses flores, faunes contemporaines et fossiles, après observation des pratiques des éleveurs de chevaux et de bétail, après lecture des travaux de Malthus (*Essais sur le principe de population*, 1798 ; *les principes d'économie politique*, 1820). Parmi les observations de Darwin, plusieurs points méritent d'être soulignés. La population naturelle du monde ne fait qu'augmenter et il existe donc une mortalité importante pour que les populations soient diversifiées et restent stables. Dans une même espèce, des différences anatomiques héréditaires existent d'un sujet à l'autre et l'évolution d'une forme à l'autre se fait par petits changements progressifs. Enfin les hécatombes d'œufs et d'individus ne se font pas au hasard mais frappent tous les sujets qui possèdent les variations les moins favorables.

Par la suite, les mécanismes de l'évolution seront proposés consécutivement aux découvertes de la génétique mendélienne puis de la génétique des populations, et de l'importance des mutations. Aujourd'hui, le fait de l'évolution n'est pas contesté par la majorité des scientifiques mais en ce qui concerne les mécanismes explicatifs basés sur la mutation-sélection qui représentent en eux-même un paradigme, de nouveaux concepts apparaissent, tels que le ponctualisme (Eldredge et Gould, fin des années 1970, voir entre autres Gould [4]) que l'on peut opposer au gradualisme, le neutralisme de Kimura, [5] ou encore, la mise en évidence de l'empreinte parentale (ou génétique), les données de l'épigenèse, qui sont le résultat d'études faisant appel à la biologie moléculaire permettant de comprendre le fonctionnement intime de la molécule d'ADN et représentant un nouveau paradigme en matière de théorie de l'évolution [6], sans oublier l'« evo-devo », acronyme de *Evolutionary Developmental Biology* qui s'intéresse à l'évolution des gènes du développement.

En conclusion, la théorie de l'évolution regroupe des faits et répond à des lois qui ne sont finalement pas parfaitement énoncées et précises même si elles sont comprises de manière intuitive. Chaque théorie devient un paradigme qui est ensuite bousculé et renversé au profit d'une nouvelle théorie qui représente un nouveau paradigme, etc. Les progrès des moyens d'investigation sont tels que les mécanismes sont de plus en plus précisés, au point de rendre obsolètes voire erronées les premières investigations qui sont pourtant à l'origine des explications actuelles.

Quelques paradigmes de la biologie cellulaire et de l'histologie

Tous les paradigmes n'ont pas le même niveau hiérarchique et sont pour ainsi dire « emboîtés » : certains correspondent à de grandes théories (génération spontanée, évolution), d'autres correspondent à des domaines plus ponctuel des sciences. C'est ce que nous allons voir maintenant à partir de quelques exemples tirés de la biologie cellulaire et tissulaire, notamment la structure de la membrane plasmique et la structure de la cellule de Sertoli.

La structure de la membrane plasmique

L'évolution de la structure de la membrane plasmique est certainement, par sa

simplicité, l'une des plus belles illustrations de ce que l'on peut appeler un paradigme en biologie. Pour illustrer ce propos, reportons-nous à différentes éditions d'un manuel adressé aux étudiants des premier et second cycles des Universités françaises : le *Biologie cellulaire* de la collection *Biologie* des PUF (Presses Universitaires de France), de Claude-Louis Gallien [7, 8, 9]. Dans l'édition de 1977, l'auteur donne à partir de la page 100 une description de la membrane plasmique. Il commence par en donner l'aspect en microscopie électronique et indique que :

> « 1) (…) la membrane plasmique montre une structure trilaminaire, l'épaisseur des trois feuillets pouvant présenter diverses variations (…) 2) le cryodécapage fait apparaître une structure de type « particulaire ». Le nombre de particules globulaires peut atteindre 3000 par micromètre carré, leur diamètre est variable (40 à 100 Å) ainsi que leur répartition. ».

Après cette description au microscope électronique, il donne la constitution chimique (55% de protéines, 35% de lipides, 10% de glucides de l'hématie). L'auteur précise ensuite dans son manuel que :

> « les observations initiales de Gorter et Grendel (1925) [10] sur la constitution de la membrane des globules rouges ont conduit Danielli et Davson (1956) [11] à proposer pour la membrane plasmique le plan d'organisation suivant : les phospholipides seraient disposés en une couche bimoléculaire, les pôles hydrophobes se faisant face et les pôles hydrophiles étant recouverts par un film de protéines adsorbées. »

Ce type d'organisation, jusqu'à cette période (1977) a été le modèle le plus couramment enseigné dans les universités : c'était le paradigme que l'auteur de cette communication apprit lorsqu'il commençait ses études à l'université de Montpellier en 1970. Ce modèle membranaire correspondait à la membrane unité de Robertson [12, 13, 14] dont la structure s'appliquait aussi bien à la membrane plasmique qu'à celle des organites tels que le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Fig. 1).

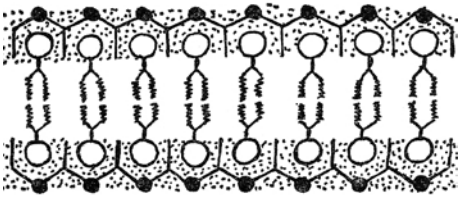


Figure 1 : Membrane unité (ou unitaire) de Robertson (1959) [12, 13, 14]. D'après Gallien (1977) [7], modifié. Les membranes sont constituées d'une double couche de phospholipides dont les pôles hydrophobes se font face, et de deux couches de protéines, chacune d'entre elle coiffant une des couches de phospholipides en étant orientée vers le milieu extérieur ou le milieu extracellulaire. Ce modèle était encore enseigné au début des années 1970.

Mais avant que les modèles n'entrent dans les enseignements, il faut un certain délai. Au moment où l'on enseignait encore le modèle de la membrane unité de Robertson, d'autres modèles étaient proposés. En effet, le modèle de Robertson expliquait bien la stabilité membranaire mais ne permettait pas d'expliquer la perméabilité à l'eau et aux solutés. Et les toutes récentes

observations de l'époque faisant intervenir la technique de cryodécapage, la séparation des cellules au niveau membranaire et l'observation de ces plans de séparation par des méthodes d'ombrage n'étaient pas satisfaites par ce modèle. Divers autres modèles ont alors été proposés. Lucy et Glauert [15] imaginaient une membrane plasmique constituée de micelles, globules lipidiques inclus dans une substance constituée de protéines, de glycoproteines et d'eau (Fig. 2).

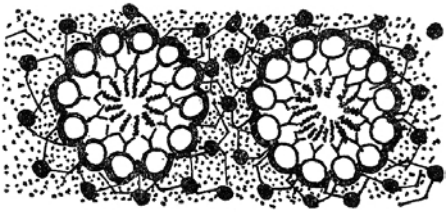


Figure 2 : Modèle micellaire de Lucy et Glauert (1964) [15]. D'après Gallien (1977) [7], modifié.

Dans ces micelles, les phospholipides étaient orientés de manière radiaire, les pôles hydrophobes dirigés vers le centre, les pôles hydrophiles à la périphérie. Ce modèle, plus ou moins modifié par d'autres auteurs était compatible avec la perméabilité membranaire aux substances aqueuses et aux transports actifs. Certains auteurs proposaient également un passage de la structure lamellaire (Robertson) à la structure micellaire selon les conditions dans lesquelles se trouvait la cellule (Fig. 3).

Déjà dans l'édition de 1977, Gallien [7] indique le « modèle de la mosaïque fluide » qui est aujourd'hui enseigné à nos étudiants (Fig. 4). Dans ce modèle proposé par Singer et Nicolson [16] la membrane

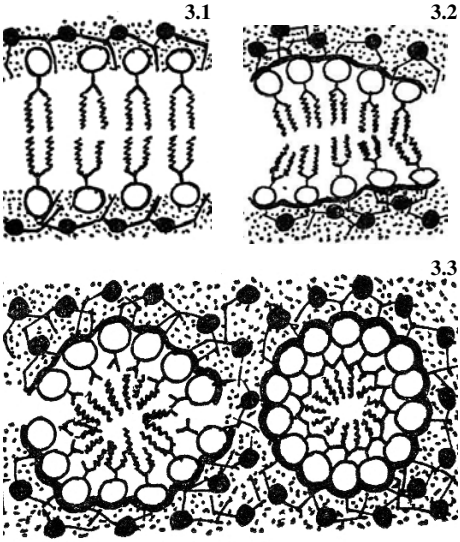


Figure 3 : Passage du modèle de Robertson au modèle micellaire. D'après Gallien (1977)[7], modifié. **3.1 :** la membrane plasmique selon le modèle de Robertson ; **3.2. :** structure intermédiaire de la membrane entre la configuration de Roberstson et le modèle micellaire ; **3.3 :** la membrane selon le modèle micellaire de Lucy et Glauert.

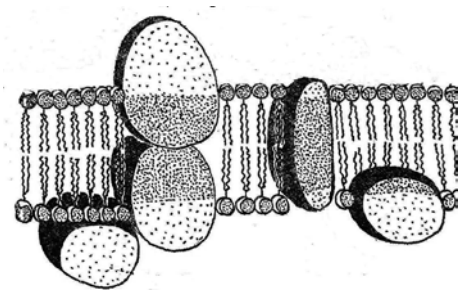


Figure 4 : Le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (1972) [16]. D'après Gallien (1977, 1980) [7, 8], modifié (Gallien donne notamment une image tridimentionnelle de ce modèle). Le milieu extracellulaire est situé dans la partie supérieure du schéma et le milieu intracellulaire dans la partie inférieure.

comporte des protéines globulaires incluses dans une bicouche fluide de phospholipides dont les pôles hydrophiles sont orientés vers l'extérieur et les pôles hydrophobes vers l'intérieur, stabilisant ainsi la double couche, l'ensemble pouvant être ainsi plus ou moins fluide selon les conditions auxquelles est soumise la cellule et selon les zones de la membrane. Par la suite, les méthodes de l'immunocytologie ont permis de caractériser les protéines incrustées dans cette double couche de phospholipides.

Dans l'édition de 1980 [8], Gallien détaille les méthodes du cryodécapage qui ont permis de comprendre la structure des membranes. Il indique encore l'existence historique de la membrane unité de Robertson, signale le modèle micellaire et développe le modèle de la mosaïque fluide avec les nouvelles expériences ayant permis de confirmer la fluidité par l'utilisation de l'hybridation de cellules humaines et murines. Les antigènes humains et murins, marqués par des anticorps spécifiques finissent par se mélanger après fusion des deux membranes des deux cellules constituant l'hybride.

Dans l'édition de 1986 [9], la mosaïque fluide est le modèle de la structure membranaire. Le schéma qui est proposé par l'auteur est nettement plus complexe que celui des deux éditions précédentes (Fig. 5). Plus aucune mention n'est faite concernant les modèles historiques (Robertson, modèle micellaire). Par contre, la partie consacrée à la fluidité membranaire est bien détaillée. Cependant, Gallien précise bien que :

> « le modèle de Singer-Nicolson constitue une approximation vraisemblable avec ce que l'on connaît de l'ultrastructure et de la constitution chimique des membranes. La membrane plasmique ne présente sans doute pas à l'état vivant une structure uniforme en toutes circonstances, mais des états successifs d'organisation correspondant à des conditions d'activité différentes. »

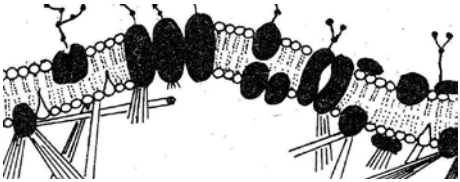


Figure 5 : Le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicolson (1972) [16]. D'après Gallien (1986) [9], modifié (Gallien donne notamment une image tridimentionnelle de ce modèle). Le modèle est plus complexe que sa première représentation avec notamment la présence du *cell coat* (ou *glycocalix*) du côté extracellulaire (partie supérieure du schéma) et des microfilaments et microtubules du milieu intracellulaire (partie inférieure du schéma).

L'examen d'autres manuels des années 1960 à 1980 montre également un passage plus ou moins progressif du modèle de la membrane unité de Robertson à celui de la mosaïque fluide. Nous somme bien dans le cas d'un paradigme qui disparaît au profit d'un autre.

La cellule de Sertoli : cellules ou syncytium ?

Les cellules de Sertoli sont des éléments constitutifs des tubes séminifères. Pendant longtemps, ces cellules ont été considérées comme fusionnées et formant un syncytium. C'est l'apparition de la mi-

croscopie électronique à transmission qui a permis de montrer que les cellules de Sertoli étaient bien des cellules individualisées mais il a fallu un long chemin pour admettre cette conclusion.

de Pol Bouin à aujourd'hui

Les premières descriptions de ces cellules ont été effectuées par Sertoli en 1865 [17] qui décrivait la seule cellule non germinale du tube séminifère [18]. Cependant, le microscope photonique, seul utilisé à l'époque, ne permettait pas de montrer une quelconque limite entre les cellules et les noyaux sertoliens paraissaient ainsi appartenir au même ensemble cytoplasmique (Fig. 6).

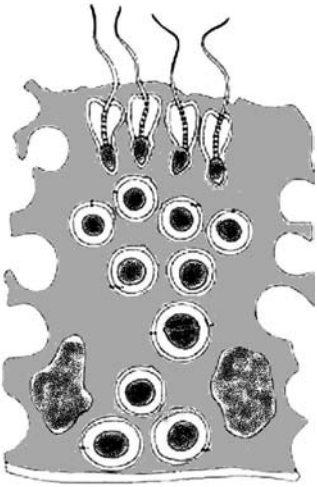


Figure 6 : Représentation schématique d'un syncytium de Sertoli. La lumière du tube séminifère est située à la partie supérieure, la lame basale sur laquelle repose le syncytium est situé à la partie inférieure. Les cellules germinales sont représentées incluses dans le syncytium. Les spermatozoïdes sont prêts à être détachés.

Les cellules de Sertoli étaient donc décrites comme un syncytium de Sertoli. Pourtant, Sertoli lui-même, en 1868 revoyait son opinion [19]. Mais la dénomination de syncytium était entrée dans les mœurs, devenant un paradigme et dépassant Sertoli lui-même. Dans la notice nécrologique de Pol Bouin (1870- 1962), Robert Courrier [20] parle du « syncytium de Sertoli » étudié par Bouin et Paul Ancel, qui donnera lieu à une vingtaine de notes entre 1903 et 1904. Dans les castrations des poulains effectuées par Bouin et Ancel par ligature des canaux déférents, les auteurs parlent toujours de syncytium qui occupe seul les tubes séminifères ; de même, chez les porcs cryptorchides, ils notent l'absence de « syncytium de Sertoli ». En 1947, Gopalakrishna [21] qui étudie l'embryologie des microchiroptères note :

> *« the Sertoli cells are not so distinctly marked out. Their nuclei are small and more densely stained, and they appear to be floating in the Sertoli syncytium. »*

Pendant plusieurs années, la bibliographie parle toujours de syncytium de Sertoli [22-25]. Certains auteurs sont moins précis, par exemple Allen indique que les cellules indifférentes (autre nom donné aux cellules somatiques des tubes séminifères) du rat ont des membranes cellulaires très minces lorsqu'elles sont visibles *(« indifferent cells had very slight if any visible membranes »)* [26]. Aaes-Jørgensen dans une étude consacrée aux effets des graisses dans l'alimentation des rats parle de la rareté des cellules multinucléées dans le testicule [27]. Cependant, quelques auteurs

considéraient dès le début du XXe siècle que les cellules de Sertoli étaient des unités bien délimitées, comme la plupart des autres cellules [28, 29] ; d'autres considéraient que leurs limites cellulaires étaient détruites par la fixation [30].

Lorsque les techniques de microscopie électronique à transmission se sont généralisées en biologie, les images montraient que, effectivement les cellules de Sertoli possédaient bien un seul noyau et étaient limitées par une membrane plasmique classique [31, 32]) (Fig. 7), même si certains auteurs n'ont pas pu mettre en évidence les limites cellulaires [33]. En 1956, Fawcett et Burgos [34] rejettent le concept de cellules germinales incluses dans un syncytium

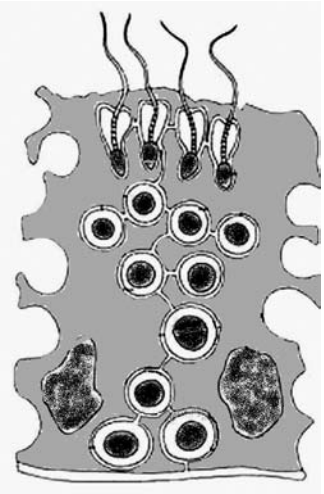


Figure 7 : Représentation schématique de deux cellules de Sertoli. La lumière du tube séminifère est située à la partie supérieure, la lame basale sur laquelle reposent les cellules est situé à la partie inférieure. Les cellules germinales sont représentées incluses entre les cellules. Les spermatozoïdes sont prêts à être détachés.

de Sertoli car ils observent des membranes qui limitent ces dernières. Sapsford [35-37] n'a pu mettre en évidence les limites des cellules de Sertoli mais il est parvenu à dissocier des cellules de Sertoli des tubes séminifères, montrant ainsi qu'il s'agissait bien de cellules mononucléées.

A partir du moment où la réalité structurale de la cellule de Sertoli était établie, de nombreuses études en microscopie électronique ont vu le jour, permettant de comprendre les rapports entre cellules de Sertoli et cellules germinales. Les études ont également permis de préciser que chez les vertébrés anamniotes, les cellules de Sertoli étaient originaires des cellules folliculaires entourant les cystes de cellules germinales de la lignée spermatique [38-47]. Des cellules de Sertoli ont également été décrites chez des invertébrés [48].

Finalement, on peut penser qu'à partir de la fin des années 1960, le paradigme du syncytium de Sertoli était éteint. Mais il n'en est rien.

Dans plusieurs ouvrages de synthèse dont certains à usage pédagogique, par exemple, la notion de syncytium de Sertoli reste tenace. En 1967, Houillon, dans l'ouvrage pédagogique *Sexualité* des Presses universitaires de France, parle à la page 32 de « syncytium de Sertoli » mais il précise « car les limites sont difficiles à voir » [49]. En 1973, dans son livre *Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires*, Gallien, à la page 137, parle de « syncytium de Sertoli » mis en évidence dans les canalicules aspermatiques des cas

de free-martin [50]. Dans leur ouvrage de zoologie, Boué et Chanton [51] expliquent, à la page 524 du tome 2.2 que « les cellules de Sertoli, peu nombreuses, s'anastomosent entre elles pour former un syncytium ». On peut aisément imaginer que, entre la rédaction d'un ouvrage imposant et celui de sa publication, il peut s'écouler un temps atteignant souvent deux ou trois ans, voire plus, interdisant ainsi la mise à jour la plus récente. Mais curieusement, le paradigme du syncytium sertolien est retrouvé dans plusieurs articles même récents : Goldberg (2004) [52] explique que, chez le serpent *Tantilla hobartsmith*, les cellules germinales sont empaquetées dans un syncytium de Sertoli comme décrit par Goldberg et Parker [53], Sever *et al.*, 2002 [54] expliquent que, chez *Seminatrix pygaea*, les cellules germinales sont empaquetées dans un syncytium sertolien.

Finalement, l'utilisation de la microscopie électronique a permis d'observer la réalité des limites cellulaires, ce qui a bouleversé la vision de la cellule de Sertoli et contribué à approfondir sa connaissance. Comme précédemment, nous assistons à une période intermédiaire où les deux paradigmes ont coexisté. Cependant, plus que précédemment, cet exemple illustre la ténacité de certains paradigmes puisque, même dans des articles récents il est encore question de « syncytium de Sertoli ».

Le cas des Gymnophiones

Les Amphibiens Gymnophiones sont des animaux serpentiformes fouisseurs qui vivent répartis sur la ceinture intertropicale. Ils possèdent plusieurs caractéristiques très particulières [55]. L'une d'entre elles est la structure histologique des testicules qui sont constitués de plusieurs lobes plus ou moins fusionnés. Chaque lobe regroupe plusieurs ampoules séminifères (capsules ou « locules ») dans l'épithélium de laquelle se déroule la spermatogenèse. Chacune de ces structures est reliée par un canalicule au *rete testis* qui achemine les spermatozoïdes jusqu'au cloaque en empruntant les conduits urinaires. Les ampoules sont séparées les unes des autres par du tissu conjonctif contenant des cellules de Leydig stéroïdogènes. La disposition des cellules germinales est particulière. Les spermatogonies sont situées au débouché du canalicule évacuateur, les spermatogonies secondaires se trouvent contre la paroi de l'ampoule, les stades suivants, spermatocytes I et II, spermatides et spermatozoïdes subissent un déplacement centripète au cours de leur différenciation. En microscopie photonique, les cellules de même stade sont groupées en cystes qui paraissent inclus dans une « matrice » filamenteuse et contenant des globules lipidiques. Des noyaux ressemblant aux noyaux de cellules de Sertoli des autres vertébrés sont observés en position périphérique (Fig.8, 9). Cette description est celle qui a été donnée pendant longtemps depuis 1876 par plusieurs auteurs [56-59]. En 1942, Seschachar [60] s'intéresse aux cellules de Sertoli et il considère que ces cellules sont limitées au noyau contrairement à ce que l'on connait chez les autres vertébrés (n'oublions pas qu'à cette époque, il était question du syncytium de Sertoli), puis aucun travail concernant ces cellules ne paraît pendant de nombreuses années.

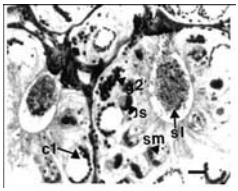


Figure 8 : Vue générale d'une coupe de testicule de Gymnophione en période de reproduction. c1 : spermatocytes de premier ordre ; g2 : spermatogonies 2 ; Js : jeunes spermatides ; sl : spermatozoïdes libres prêts à l'évacuation ; sm : spermatozoïdes matures. La barre d'échelle indique 90 µm.

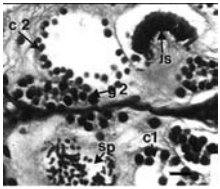


Figure 9 : Vue de détail d'une coupe de testicule de Gymnophione en période de reproduction. c1 : spermatocytes de premier ordre ; c2 : spermatocytes de deuxième ordre ; g2 : spermatogonies 2 ; Js : jeunes spermatides ; sp : spermatides. La barre d'échelle indique 60 µm.

En 1968, dans son magistral travail sur les Gymnophiones, Marvalee Wake elle-même reprend la description de Seschachar [59].

En 1986, dans sa thèse d'Etat concernant *Typhlonectes compressicauda* Exbrayat [61] reprend l'étude du testicule avec notamment la microscopie électronique à balayage et à transmission. Ces méthodes permettent alors de comprendre que la matrice correspond en réalité aux cellules de Sertoli elles–mêmes, l'aspect fibreux observé en microscopie photonique représentant certainement un artéfact dû à un défaut de pression osmotique. En observant en microscopie à balayage des fragments de testicules fixés au liquide de Bouin, on observe la présence de tels filaments qui correspondent certainement au collapsus des structures membranaires (Fig. 10).

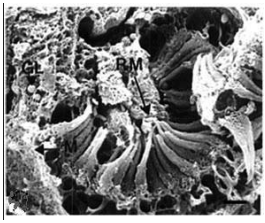


Figure 10 : Fracture de testicule de Gymnophione en période de reproduction. Vue en MEB. Gl : globule lipidique ; M : cytoplasme de cellule de Sertoli (« matrice ») ; RM : zone de relation entre les spermatides dont les acrosomes sont bien visibles et la « matrice » (cytoplasme de cellules de Sertoli). La barre d'échelle indique 6 µm

La microscopie électronique à transmission montrant des cellules aux membranes plasmiques délimitées et des cytoplasmes géants remplis de vésicules vides, certainement chargées de lipides avant les opérations de déshydratation, et divers organites (Fig. 11).

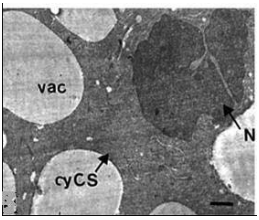


Figure 11 : Cellule de Sertoli de Gymnophione vu en MET. CyCS : cytoplasme de cellule de Sertoli ; N : noyau de cellule de Sertoli ; vac : vacuole lipidique. La barre d'échelle indique 2 µm.

L'observation du développement des testicules chez des embryons et de jeunes individus a permis de mettre en évidence

l'évolution des cellules de Sertoli en montrant qu'il s'agissait bien de cellules géantes, parfaitement délimitées. La structure des cellules de Sertoli des Gymnophiones a été ensuite publiée pour la première fois dans la Revue française d'Histotechnologie par Exbrayat et Dansard [62]. Depuis cette période, la structure des cellules de Sertoli (et des ampoules séminifères) des Gymnophiones s'est encore approfondie [63]. Finalement, chez ces amphibiens, les cellules de Sertoli ont une structure qui, à quelques différences près, rappelle tout à fait celle que l'on trouve chez les autres anamniotes [39, 40].

Autres exemples

D'autres exemples auraient pu être pris, par exemple le paradigme qui concerne la structure de la mitochondrie qui vient d'être remise en question par l'utilisation de puissantes méthodes d'imagerie [64], ou encore le paradigme, tenace pendant de nombreuses années, concernant le fait que les neurones ne se renouvellent jamais chez l'adulte. Ce paradigme est tombé à partir du moment où il a été montré que les neurones de la muqueuse olfactive avaient une durée de vie limitée et qu'ils se renouvelaient puis, que les neurones pouvaient également se renouveler très lentement dans certaines zones de l'encéphale [65].

Certains paradigmes sont d'ordre strictement technique. Pensons notamment à la mise en évidence des hormones stéroïdes par immunohistochimie sur matériel fixé au formol ou au Bouin, puis déshydraté par l'éthanol, inclus en paraffine. Compte tenu de la solubilité des stéroïdes, il paraît *a priori* impossible de les détecter sur de telles coupes. Pourtant l'expérience prouve le contraire, les hormones concernées étant modifiées et insolubilisées par les fixateurs. Nous touchons ici tout le paradoxe de l'histologie qui consiste à modifier chimiquement des tissus pour qu'ils restent stables : « la fixation permet de maintenir un tissu mort dans un état aussi proche que possible de l'état vivant » lit-on au début de nombreux ouvrages d'histologie, puis à visualiser des groupements chimiques qui risquent peut-être d'être modifiés, voire éliminés. En fait nous sommes dans un mode qui consiste à obtenir des résultats justes à partir d'artéfacts (on pourrait dire de « matériel faux » !)

CONCLUSION

Après avoir examiné l'évolution de quelques idées, concepts et hypothèses au cours de l'histoire, nous pouvons conclure que la démarche scientifique est basée sur des hypothèses qui permettent, selon la méthode hypothético-déductive, d'orienter les recherches. Ces hypothèses deviennent souvent des paradigmes, c'est-à-dire des façons de voir quasiment dogmatiques, auxquelles toute recherche doit se référer. Cependant, à un moment, l'évolution des moyens techniques, amène de nouvelles observations, de nouveaux résultats et oblige ainsi à changer de paradigme pour intégrer les nouvelles connaissances. Changement de technique, certes, mais qui ne va pas sans un changement de manière de concevoir le réel, c'est-à-dire sans une évolution des idées qui conduit à une évolution des concepts. C'est par exemple ce que l'on

a vu avec l'abandon du paradigme de la génération spontanée alors que les êtres microscopiques étaient d'abord pressentis depuis toujours (panspermie) puis connus (infusoires, « vers », animalcules,…), au profit du paradigme de l'évolution biologique dont les mécanismes paradigmatiques vont subir à leur tour des modifications.

Les exemples qui ont été choisis montrent que les paradigmes sont également emboîtés les uns dans les autres, chaque grande théorie, chaque discipline scientifique, chaque technique représentant différents niveaux de l'appréhension scientifique. Ces exemples pourraient être multipliés aussi bien en sciences de la vie qu'en science physique et également en sciences humaines.

La science avance ainsi par touches successives en fonction de l'évolution conjointe des concepts et des techniques, et plus les résultats s'accumulent, plus la connaissance progresse, et plus la connaissance progresse, plus de nouvelles questions sont posées et de nouvelles méthodes apparaissent pour répondre à ces questions, bousculant les paradigmes de manière sporadique et les remplaçant les uns après les autres.

C'est pour cela que le sous-titre de cette communication « comment obtenir des résultats justes avec des idées et des expériences fausses » n'est pas seulement une boutade mais le reflet d'une réalité indispensable à l'avancée de la science et à ses applications. A chaque période, au temps *t* pourrait-on dire, les techniques les plus performantes permettent d'avoir une image du réel, plus exactement du réel sensible au sens de la philosophe des sciences Jeanne Parain-Vial (1983) [66] mais cette image devient rapidement obsolète car les méthodes et concepts (les idées) deviennent faux au temps $t+1$, etc. Pourtant, malgré cette fausseté ou plutôt cette falsification, la science avance, elle donne des résultats tangibles performants, en médecine par exemple où des maladies naguère incurables peuvent être soignées et guéries, ou encore en physique ; j'en veux pour preuves l'avion, le TGV, les ordinateurs et autres téléphones portables qui sont notre quotidien. Bref malgré son incomplétude (Magnin, 2012) [67], la science permet une connaissance de plus en plus précise du monde et d'intervenir sur ce dernier aussi bien au plan physique que biologique même si notre soif de connaissance reste à tout jamais insatisfaite.

BIBLIOGRAPHIE

1. KUHN T.S.- La structure des révolutions scientifiques. Editions Champs Flammarion, Paris, 1983.

2. DE WIT C. D.- Histoire du développement de la biologie. Vol. I, II, III, Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, 1991.

3. DELSOL M.- Le transformisme aujourd'hui. Que sais-je ? PUF, Paris, 1998.

4. GOULD S. J.- La Structure de la théorie de l'évolution. Gallimard, Paris, 2006.

5. KIMURA, M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, 1983.

6. PALDI A.- L'hérédité sans gènes. Le Pommier, Paris. 2009.

7. GALLIEN C.-L.- Biologie. 1. Biologie cellulaire. Coll. Biomed, PUF, Paris, 1977.

8. GALLIEN C.-L.- Biologie. 1. Biologie cellulaire. Coll. Biomed, PUF, Paris, 1980.

9. GALLIEN C.-L.- Biologie. 1. Biologie cellulaire. Coll. Biomed, PUF, Paris, 1986.

10. GORTER E. & GRENDEL F.: On bimolecular layers of lipids on the chromocytes of the blood. *J. exp. Med.*, 1925, 41, 439-443.

11. DANIELLI F. & DAVSON H. A.: Contribution to the theory of permeability of thin films.» J. Cell. Comp. Physiol., 1935, 5, 495-508.

12. ROBERTSON J D.: The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. Bioch. Soc. Symp., 1959, 16, 3-43.

13. ROBERTSON J D.: The molecular structure and contact relationships of cell membranes. Prog. Biophysics Biophysical Chem., 1960, 10, 343-418.

14. ROBERTSON J D.: Membrane Structure. J. Cell Biol., 1981, 91, 189-204.

15. LUCY J.A. & GLAUERT A.M.: Structure and assembly of macromolecular lipid complexes composed of globular micelles. J. Mol. Biol., 1964, 8,727-748.

16. SINGER S J. & NICOLSON G L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 1972, 175,720-731.

17. SERTOLI E.: Dell' esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. Morgagni, 1865, 7, 31-40.

18. ROULIER R. & MATTEI A.: La cellule de Sertoli. Contraception fertilité sexualité, 1979, 8(4), 373-378.

19. SERTOLI E.: Sulla struttura dei canalicoli seminiferi dei testicoli studiata in rapporto allo sviluppo dei nemaspermi. Arch. Sci. med., 1878, 2, 107-146, 267-295.

20. COURRIER R.: Notice sur la vie et les travaux de Pol Bouin. Acad. Sci., Notices et discours, 1962, 4, 590-624.

21. GOPALAKRISHNA A.: Studies on the embryology of Microchiroptera. Proc. Indian Acad. Sci., B., 1947, 27, 137-150.

22. REGAUD C.: Etude sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogenèse chez les mammifères. Arch. Anat. micr., 1901, 4, 101-156, 231-380.

23. SNIFFEN R. C.: Histology of the normal and abnormal testis at puberty. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1952, 55, 609-618.

24. SHAVER, S. L.: X-irradiation injury and repair in the germinal epithelium of male rats. II. Injury and repair in immature rats. Amer. J. Anat., 1953, 92, 433-449.

25. COULOMBRE J. L. & RUSSELL E. S.: Analysis of the pleiotropism at the W-locus in the mouse. J. exp. Zool., 1954, 126, 277-295.

26. ALLEN E.: Studies on degenerating sex cells in immature mammals. I. An analysis of degeneration in primordial and large germ cells in male albino rats aged 1-9 days. J. Morph., 1949, 85, 405-421.

27. AAES-JØRGENSEN E., FUNCH J. P., ENGEL P. F. & DAM H.: The role of fat in the diet of rats. 9. Influence on growth and histological findings of diets with hydrogenated arachids oil or no fat, supplemented with linoleic acid or raw skim milk, and of crude casein compared with vitamin Test Casein. British Journal of Nutrition, 1956, 10(4), 292-304.

28. HOVEN H.: Histogenèse du testicule des mammifères. Anat. Anz., 1914, 47, 90-109.

29. STIEVE H.: Die Entwicklung der Keimzellen und der Zwischenzellen in der Hodenanlage des Menschen. Ein Beitrag zur Keimbahnfrage. Z. mikr.-anat. Forsch., 1927, 10: 225-285.

30. GEORGE U.: Beobachtungen an Sertolizellen im Hoden des Menschen und der Ratte. Z. mikr.-anat. Forsch., 1937, 42, 479-498.

31. NICANDER L., ABDEL-RAOUF M., & CRABO B.: On the ultrastructure of the seminiferous tubules in bull calves. Acta morph. neerl. Scand., 1961, 4: 127-135.

32. ENGLE E. T.: The male reproductive system. In Cowdry's Problems of Ageing. A. I. LANSING (ed.), Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1952 708-729.

33. WATSON.: Spermatogenesis in the albino rat as revealed by electron microscopy: **a preliminary report.** Biochimica et Biophysica Acta, 1952, «http://www.sciencedirect.com/science/journal/00063002/8/supp/C»**8**, 369–374.

34. FAWCETT M.H. & BURGOS D.W.: An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad, *Bufo arenarum* Hensel. J. Biophy.s Biochem. Cytol.,1956, 2(3), 223–240.

35. SAPSFORD C.S.: The development of the testis of the Merino ram, with special reference to the origin of the adult stem cells. Aust. J. agric. Res., 1962a, 13, 487-502.

36. SAPSFORD C.S.: Changes in the cells of the sex cords and seminiferous tubules during the development of the testis of the rat and mouse. Aust. J. Zool., 1962b, 10,178-192.

37. SAPSFORD C.S.: The development of the Sertoli cell of the rat and mouse: its existence as a mononucleate unit. J. Anat., Lond. 1963, 97(2), 225-238.

38. BURGOS M.H. & VITALE-CALPE R.: The fine structure of the Sertoli cell-spermatozoan relationships in the toad. J. Ultrastr. Res., 1967, 19, 221-237.

39. LOFTS B.: The Sertoli cell. Gen. Comp. Endocr., supplt., 1972, 3, 636-648.

40. TSO E. C.-F.: An ultrastructural study on the Sertoli cell in the newt (*Trituroides hongkongensis*). Acta Zool., 1974, 35, 217-223.

41. RUSSEL L. D.: Further observations on tubulobulbar complexes formed by late spermatids and Sertoli cells in the rat testis. Anat. Rec., 1979, 194(2), 213-232.

42. COLLENOT G. & DAMAS D.: Etude ultrastructurale de la cellule de Sertoli au cours de la spermiogenèse chez *Scyliorhinus canicula.* Cah. Biol. Mar., 1980, .21, 209-219.

43. MATTEI X., MATTEI C., MACHAND B. & LEUNG TACK KIT D. : Ultrastructure des cellules de Sertoli d'un poisson téléostéen : *Abudefduf marginatus.* J. Ultrastr. Res., 1982, 81, 333-340.

44. HON C., GARDNER P.J. & LEUSCHEN P.: Immunocytochemical staining of isolated rat Sertoli cells for anti-FSHß. Am J Anat., 1983, 167(4),441-50.

45. RUSSEL L.D. & PETERSON R.N.: Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. J. Reprod. Fert., 1984, 70: 635-641.

46. PUDNEY J. & CALLARD G.V.: Development of agranular reticulum in Sertoli cells of the testis of the dogfish *Squalus acanthias* during spermatogenesis. *Anat. Rec.*, 209: 311-321.

47. LALLI M.F., TANG X.-M. & CLERMONT Y.: Glycoprotein synthesis in Sertoli cells during the cycle of the semniferous epithelium of adult rats: a radioautographic study. Biol. Repr., 1984, 30, 493-505.

48. TAIR-ABBACI K. & GARRIC J.: Histological Study of Gonadogenesis in *Potamopyrgus Antipodarum* and *Valvata Piscinalis.* Cyt. Hist., 2012, 3(2), 140.

49. HOUILLON C.- Sexualité, Hermann., Paris, 1967.

50. GALLIEN L.- Différenciation et organogenèse sexuelle des métazoaires. Masson et Cie, Paris, 1973.

51. BOUÉ H. & CHANTON R.- Zoologie, Tome 2.2., Doin, Paris, 1975.

52. GOLDBERG S.R.: Reproductive cycle of smith'sblack-headed snake *Tantilla hobartsmith* (Serpentes: Colubridae) in Arizona 1975. West. North Am. Nat., 2004, 64(1), 141-143.

53. GOLDBERG S.R. & PARKER W.S.: Seasonal testicular histology of the colubrid snakes, *Masticophis taeniatus* and *Pituophis melanoleucus.* Herpetologica, 1975, 31,317–322.

54. SEVER D.M., STEVENS R.A., RYAN T.J. & HAMLETT W.C.: Ultrastructure of the Reproductive System of the Black Swamp Snake (*Seminatrix pygaea*). III. Sexual Segment of the Male Kidney. J. Morph., 2002, 252, 238-254.

55. EXBRAYAT J.M. & RAQUET M.: Vertebrate evolution: the strange case of gymnophionan amphibians. In Pontarotti, P. (ed) Evolutionary biology from concepts to application II, 2009, 71-89.

56. SPENGEL, J.W.: Das Urogenitalsystem der Amphibien. I. Theil. Der Anatomische Bau des Urogenitalsystems. Arbeit der Zoologische- Zootomie Institute Würzburg., 1876, 3, 51-114.

57. SESHACHAR, B.R.: The spermatogenesis of *Ichthyophis glutinosus* (Linn.). I. The spermatogonia and their division. Zeit.Zellforsch. Mikr. Anat., 1936, 24, 662-706.

58. TONUTTI, E.: Beitrag zur Kenntnis der Gymnophionen. XV. Das Genitalsystem. Morph. Jahr., 1931, 68, 151-292.

59. WAKE M.H.: Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part I: the gonads and fat bodies. J. Morph., 1968, 126, 291-332.

60. SESHACHAR B.R.: The Sertoli cells in Apoda. J. Mysore Univ., 1942, 3, 65-71.

61. EXBRAYAT J.-M.- Quelques aspects de la biologie de la reproduction chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode. Doct. ès Sci. Nat., Univ. Paris 6. 1986.

62. EXBRAYAT J.-M. & DANSARD C. : Apports de techniques complémentaires à la connaissance de l'histologie du testicule d'un Amphibien Gymnophione. Rev. fr. histotechnol., 1994, 7(1), 19-26.

63. SMITA M., GEORGE JANCY M., AKBARSHA M.A., OOMEN V.O. & EXBRAYAT J.-M.: Spermatogenesis. In Exbrayat J;-M. (ed) Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona. Science Publishers Inc., 2006, 231-246.

64. FREY T.G. & MANELLA C.A.: The internal structure of mitochondria. TIBS, 2000, 25, 319-324.

65. DE CHEVIGNY A. & LLEDO P.-M. : La neurogenèse bulbaire et son impact neurologique. Médecine/Sciences, 2006, 22, 607-613.

66. PARAIN-VIAL, J.- Philosophie des sciences de la nature. Kincksieck, Paris. 1983.

67. MAGNIN, T.- L'expérience de l'incomplétude. Le scientifique et le théologien en quête d'Origine. Lethielleux, groupe Desclée de Brouwer, Paris. 2011.

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 41 à 50

LES TISSUS : COMMENT EXPLOITER CES RESSOURCES BIOLOGIQUES ?

Jean-Yves SCOAZEC
Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service d'Anatomie Pathologique, 69437 Lyon cedex 03 et Equipe « Différenciation endocrine », Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM UMR1052, Faculté Laennec, 69372 Lyon cedex 08

Adresse de correspondance
Jean-Yves SCOAZEC
Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon cedex 03.
Téléphone : 04 72 11 07 41 - Fax : 04 72 11 68 91
E-mail : jean-yves.scoazec@chu-lyon.fr

L'analyse d'échantillons tissulaires, ou cellulaires, joue depuis longtemps un rôle clé à la fois en diagnostic, médical ou vétérinaire, et en recherche, clinique, translationnelle ou expérimentale. Les tissus recèlent en effet une mine d'informations qu'il faut savoir extraire, analyser, organiser et interpréter. C'est le domaine de compétence des 'morphologistes', terme vague mais bien commode pour désigner tous ceux qui savent faire parler les tissus en utilisant un ensemble, de plus en plus large et de plus en plus diversifié, de techniques complémentaires dont le point commun est de reposer sur l'observation et l'analyse *ex vivo* d'échantillons tissulaires ou cellulaires (1).

Un domaine en évolution rapide

Les techniques morphologiques ont évolué en plusieurs phases, selon un rythme qui n'a cessé de s'accélérer. Pendant très longtemps, l'objectif principal, sinon unique, des techniques morphologiques s'est limité à l'observation et à la description d'échantillons tissulaires ou cellulaires : c'est ce qui a formé, pendant des décennies, le cœur de l'histologie et de la cytologie. L'évolution des techniques a suivi celle des outils microscopiques dont le pouvoir de résolution a été amélioré progressivement, avec les modifications successives du microscope photonique puis l'apparition du microscope électronique, qui a permis dans les années 1960 une

fantastique avancée dans la connaissance du vivant en permettant pour la première fois d'entrer à l'intérieur des cellules, de découvrir et de décrire leurs organites et de comprendre leur fonctionnement. Une discipline nouvelle, la biologie cellulaire, est née à cette occasion. Parallèlement, des efforts ont été faits pour quantifier les observations faites au microscope : c'est l'objectif de la microscopie quantitative, de la morphométrie et de l'analyse d'images.

Dans les années 1980, le rythme de l'évolution s'accélère, avec la mise à disposition de techniques permettant aux morphologistes de réaliser des analyses moléculaires *in situ* : immunohistochimie, puis hybridation *in situ*, et enfin cytogénétique moléculaire *in situ* ont donné aux morphologistes la possibilité de compléter l'observation des échantillons tissulaires (1) ou cellulaires (2) par une analyse de leurs constituants moléculaires. Grâce à ces avancées techniques, les morphologistes ont acquis de nouvelles compétences, ouvert de nouveaux domaines et apporté de nouvelles réponses aux questions qui leur sont posées. D'une façon plus générale, grâce à ces techniques, ils se sont insérés dans ce qui constitue l'un des domaines privilégiés de la biologie de la fin du millénaire, l'étude de l'expression des gènes.

Avec l'explosion de la biologie moléculaire suivie de l'apparition des techniques d'analyse haut débit, « les techniques en –omique » (génomique, transcriptomique, protéomique, lipidomique, métabolomique, ...), un peu avant les années 2000, une nouvelle phase s'est ouverte. Les biologistes moléculaires ont réalisé l'importance et la richesse des informations contenues dans les échantillons tissulaires et cellulaires et ont développé des techniques adaptées pour l'extraction et l'analyse des acides nucléiques. Les morphologistes se sont trouvés, peut-être pour la première fois de leur longue histoire, confrontés à un problème de périmètre : les échantillons tissulaires ne sont plus leur seul apanage et leur utilisation n'est plus réservée aux seules « techniques morphologiques ». Plus encore, ils ont dû adapter leurs techniques de conditionnement et de préparation tissulaires (et cellulaires) à de nouvelles exigences, non pas pour répondre à leurs propres besoins, mais pour répondre aux besoins de ces nouveaux partenaires que sont les biologistes moléculaires. Les morphologistes ont découvert à cette occasion ce qu'est un rôle limité à la phase « pré-analytique »… eux qui avaient l'habitude de tout gérer, le pré-analytique, l'analytique et jusqu'à l'interprétation finale. Il est très important que, comme ils l'ont fait pour d'autres techniques d'analyse, les morphologistes s'approprient les techniques de biologie moléculaire et les intègrent à leur propre démarche.

Parallèlement à l'enrichissement considérable de l'éventail des techniques applicables aux échantillons tissulaires et cellulaires, des évolutions importantes, parfois moins spectaculaires mais tout aussi significatives, ont touché beaucoup d'autres domaines associés aux explorations morphologiques :

• l'émergence de nouveaux outils micros-

copiques, en tout premier lieu le microscope confocal, suivi par le microscope multiphoton ont renouvelé les conditions d'observation des cellules et des tissus ; le rêve de pouvoir observer des tissus intacts, vivants, et leurs modifications au cours du temps n'est pas encore une réalité, mais cet idéal se rapproche... (1)

- de nouvelles microscopies, comme la microscopie à effet tunnel ou la microscopie de tomographie de cohérence optique, ont ouvert de nouvelles possibilités d'étude ; la microscopie à effet tunnel permet d'étudier des surfaces et de reconstituer leurs caractéristiques avec une grande précision ; la tomographie de cohérence optique utilise la réflexion d'ondes lumineuses et permet d'obtenir des images de l'épaisseur de coupes tissulaires ; son application se généralise dans de nombreux domaines et ouvre de nouvelles perspectives pour l'examen des tissus frais, avec une résolution comparable à celle des techniques microscopiques conventionnelles appliquées à des tissus fixés ;
- la révolution de l'image numérique a touché de plein fouet la morphologie et modifié en profondeur les rapports des morphologistes avec leur principal outil d'expression, l'image : il est devenu facile d'archiver, de partager, d'échanger et d'utiliser des quantités croissantes d'images ; plus récemment encore, la généralisation des technologies digitales a permis d'accéder à la lame virtuelle, prémisse d'une époque où le microscope individuel sera (peut-être) entièrement remplacé par l'écran d'ordinateur (3).

Pourquoi faire parler les tissus ?
La place des techniques morphologiques en diagnostic et en recherche

La place des 'techniques morphologiques' dans, respectivement, le diagnostic et la recherche, a évolué de manière différente au cours des dernières décennies. Dans le domaine du diagnostic, les techniques morphologiques employées dans l'analyse des échantillons des patients n'ont cessé de se diversifier. Souvent mises au point dans le cadre d'activités de recherche, les différentes techniques d'analyse moléculaire *in situ* ont rapidement trouvé leur place et leurs applications diagnostiques au point de devenir incontournables dans de nombreux domaines de la pathologie humaine, voire vétérinaire. Paradoxalement, dans le domaine de la recherche, les applications des 'techniques morphologiques' ont connu un destin plus contrasté. Tant que la recherche, même expérimentale, a comporté une part importante d'observation des organismes vivants et de leurs constituants (organes, tissus et cellules), la morphologie, sous ses diverses formes (histologie, cytologie, embryologie, biologie cellulaire) a eu une place significative. Cette phase descriptive, ou phénétique, pour employer un terme encore souvent utilisé en zoologie ou en botanique, a souligné la complexité du vivant et la difficulté de prendre en compte les phénomènes biologiques et physiologiques dans leur globalité.

Une deuxième phase de la recherche biologique, voire biomédicale, a alors commencé. Elle a vu le développement d'approches réductionnistes, visant à analyser,

dans des modèles aussi simples et contrôlés que possible, des segments de processus biologiques ou physiopathologiques. L'approche réductionniste en biologie a été dominée par les modèles expérimentaux *in vitro*. Dans ce contexte, les techniques morphologiques ont progressivement décliné, devant les techniques biochimiques et l'explosion des approches moléculaires. Ce n'est que progressivement que les inconvénients des approches réductionnistes se sont fait jour. Les résultats obtenus dans des modèles expérimentaux simples, voire simplistes, et parfois très éloignés des contreparties biologiques qu'ils étaient supposés simuler, se sont révélés difficilement transposables à l'échelle d'un organisme entier ou aux tissus et aux cellules maintenus dans leur environnement normal.

Une nouvelle phase, intégrative, de la recherche biologique a alors débuté. Elle a donné ou redonné une place prééminente aux modèles animaux, afin de pouvoir envisager les processus biologiques et physiopathologiques à leur juste échelle et dans toute leur complexité. Dans ce contexte, les techniques morphologiques ont connu un renouveau inattendu, notamment comme outil de phénotypage des animaux modèles. La demande est devenue particulièrement forte, et souvent difficile à satisfaire en raison de la disparition de beaucoup de compétences et de la rupture de la chaîne des transmissions des savoirs, à la fois théoriques et pratiques, dans ce domaine.

Un autre facteur responsable du renouveau des techniques morphologiques est l'importance prise récemment par la recherche translationnelle, terme désormais consacré pour désigner le transfert des acquis de la recherche fondamentale vers les applications cliniques. L'un des principaux objectifs de la recherche translationnelle est d'identifier et de valider des biomarqueurs, d'intérêt diagnostique, pronostique ou prédictif, ou des cibles thérapeutiques potentielles. Les approches morphologiques, et notamment les techniques d'analyse moléculaire *in situ*, y jouent un rôle essentiel, particulièrement lorsqu'il s'agit de déterminer le profil d'expression tissulaire des biomarqueurs ou des cibles thérapeutiques potentielles ou avérées.

Comment faire parler les tissus ? La nouvelle boîte à outils du morphologiste

Comme nous l'avons souligné plus haut, les techniques morphologiques se sont considérablement enrichies depuis une trentaine d'années. Il ne faut pas pour autant négliger les techniques traditionnelles qui conservent encore toutes leurs indications. C'est ainsi que l'examen histologique conventionnel reste l'outil à la fois le plus simple, le plus puissant et le moins coûteux pour obtenir un maximum d'informations morphologiques. En pathologie, il est indispensable, et souvent suffisant, pour réaliser la plupart des diagnostics. En recherche, il est la première étape, incontournable, pour le phénotypage des modèles animaux et l'analyse des lésions observées. Les techniques histochimiques, malgré leur empirisme, restent utiles pour identifier rapidement des populations cel-

lulaires, ou des structures, spécifiques ou encore pour analyser *in situ* des fonctions physiologiques. Enfin, l'analyse ultrastructurale, même si elle est aujourd'hui difficile à réaliser, en raison de la raréfaction des microscopes et des compétences, est irremplaçable chaque fois que la question posée concerne des structures dont l'analyse nécessite un pouvoir de résolution important (4). Un renouveau des techniques ultrastructurales est d'ailleurs en cours, avec le développement de techniques nouvelles, plus puissantes et mieux adaptées à l'étude de phénomènes dynamiques et transitoires, comme la cryo-ultramicrotomie ou la microscopie électronique de tomographie.

L'une des chances de la morphologie a été de pouvoir proposer un ensemble coordonné de techniques complémentaires permettant l'analyse *in situ* des éléments clés du flux d'informations qui va des gènes aux protéines et qui a constitué l'axe majeur de la recherche en biologie au cours des dernières décennies :

- l'immunohistochimie, pour la mise en évidence de protéines spécifiques,
- l'hybridation *in situ*, pour la mise en évidence des acides nucléiques, dont les ARN messagers,
- la cytogénétique moléculaire *in situ*, incluant la FISH (fluorescent *in situ* hybridization) et ses variantes comme la SISH (silver enhanced *in situ* hybridization) et la CISH (chromogen *in situ* hybridization), qui permet la mise en évidence de segments chromosomiques contenant des gènes d'intérêt.

L'immunohistochimie est depuis longtemps incontournable, aussi bien en diagnostic qu'en recherche. Son intérêt majeur est de donner en un seul temps plusieurs informations importantes sur le profil d'expression d'une protéine : est-elle présente ou non ou mieux, est-elle détectable ou non ? dans quels tissus et dans quelles cellules est-elle détectable ? dans quel compartiment cellulaire est-elle détectable ? La sensibilité et la spécificité de l'immunohistochimie dépendent très largement des anticorps utilisés, mais aussi des techniques de préparation tissulaire et de révélation employées. La limite principale de l'immunohistochimie réside dans la difficulté de quantification des résultats, qui ne peuvent au mieux être exprimés que sous forme semi-quantitative et encore, avec beaucoup de précautions. Une autre limite est que l'immunohistochimie renseigne sur la présence ou l'absence d'une protéine, mais pas sur son état fonctionnel, sauf dans des cas particuliers où des anticorps adaptés peuvent être utilisés.

Les techniques immunohistochimiques ont beaucoup progressé depuis leur introduction dans les années 1980. Initialement réservées aux tissus congelés, elles ont pu être étendues aux tissus fixés et inclus en paraffine. Les techniques de préparation tissulaire ont considérablement augmenté la sensibilité des réactions et ont permis de faciliter l'utilisation des tissus fixés. Les techniques de révélation se sont multipliées, avec comme objectif commun l'augmentation de l'intensité du signal obtenu. Enfin, et peut-être surtout, ces techniques ont été standardisées et automatisées,

ce qui est une garantie de leur reproductibilité et de leur qualité.

Les applications de l'immunohistochimie sont multiples, aussi bien en diagnostic qu'en recherche. Citons quelques exemples en physiopathologie et en pathologie : (a) identification de lignées cellulaires spécifiques, notamment lorsque les critères utilisés habituellement pour l'identification morphologique sont absents ou peu sensibles (comme pour l'identification des lignées lymphocytaires), ne sont pas utilisables (notamment en pathologie du développement, aux phases initiales de l'émergence des populations cellulaires) ou lorsqu'ils sont pris en défaut ou altérés (notamment en pathologie tumorale) ; (b) identification de marqueurs diagnostiques, pronostiques ou prédictifs de la réponse à un traitement ; (c) identification des conséquences phénotypiques d'altérations génomiques. En recherche, la souplesse des techniques immunohistochimiques, la possibilité de les appliquer à des échantillons cellulaires comme à des échantillons tissulaires, voire à des organismes entiers comme des embryons, en a fait des outils fondamentaux d'exploration et d'analyse.

A la différence de l'immunohistochimie, l'hybridation *in situ* est restée d'un usage relativement limité. Cette technique, contrairement aux techniques immunohistochimiques, est de standardisation et d'automatisation difficiles. La sensibilité est souvent faible, à moins d'utiliser des techniques de révélation radioactives, ce qui pose des problèmes importants de logistique. Pour ces diverses raisons, les indications en diagnostic sont peu nombreuses, limitées à la détection d'ARN présents en grande abondance, comme les ARN viraux. Les utilisations en recherche sont essentiellement limitées à des équipes spécialisées.

Contrairement à l'hybridation *in situ*, la cytogénétique moléculaire *in situ* a rapidement conquis une place importante en diagnostic, car elle répond à un nouveau besoin : la mise en évidence d'altérations génomiques comme marqueurs diagnostiques ou prédictifs de la réponse à un traitement. En revanche, les applications en recherche restent essentiellement limitées à la recherche clinique et translationnelle.

Les techniques analytiques ne sont pas les seules à s'être enrichies. De nouvelles techniques « pré-analytiques », pour la préparation des tissus soumis ensuite à différents types d'analyses, notamment moléculaires, ont également été développées pour répondre à de nouveaux besoins. Le premier exemple est la microdissection tissulaire (5-7). Le besoin est né de la constatation que la plupart des tissus sont complexes et hétérogènes et contiennent généralement plusieurs populations cellulaires en plus de la population d'intérêt. Même dans une tumeur, les cellules tumorales (d'ailleurs souvent hétérogènes elles-mêmes) sont associées à de nombreuses populations de cellules non tumorales (fibroblastes, cellules vasculaires, cellules inflammatoires...). Les acides nucléiques extraits d'un tissu sont donc un mélange d'acides nucléiques provenant de populations cellulaires très diverses. Le risque est que les analyses moléculaires ulté-

rieures ne soient pas assez sensibles pour permettre une caractérisation correcte de la population cellulaire d'intérêt, notamment lorsqu'elle est minoritaire ou insuffisamment représentée. La microdissection permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité des analyses moléculaires : son principe est de sélectionner *in situ*, dans un tissu complexe ou hétérogène, les cellules d'intérêt, puis de les isoler (généralement par l'intermédiaire d'un découpage laser) et enfin de les recueillir spécifiquement. La microdissection est souvent combinée avec des approches génomiques ou transcriptomiques, mais peut aussi se combiner avec des techniques d'analyse protéomique (8-10).

Un deuxième exemple est celui des puces tissulaires (ou tissue arrays) (11; 12). Le besoin est ici de pouvoir tester rapidement l'expression d'un marqueur potentiel dans un grand nombre d'échantillons tissulaires informatifs. L'idée est de regrouper dans un même bloc des échantillons provenant de multiples blocs indépendants. Pour ce faire, des carottes de faible diamètre (de 300 µm à 2 mm) sont prélevées dans chacun des blocs « donneurs » et sont juxtaposées au sein d'un bloc « accepteur ». Plusieurs centaines de carottes, provenant d'autant de blocs différents, peuvent ainsi être regroupées dans un même bloc à partir duquel des sections pourront être préparées et utilisées pour des techniques d'analyse moléculaire *in situ*, immunohistochimie, hybridation *in situ* ou FISH.

Gérer les tissus comme des ressources biologiques : les nouvelles tâches du morphologiste

Pour permettre, y compris à d'autres que lui, de tirer le maximum d'informations d'un échantillon tissulaire ou cellulaire, un morphologiste doit désormais savoir :

- préserver et conditionner, voire préparer, les tissus de manière adaptée pour la réalisation de techniques d'investigation morphologiques ou non morphologiques,
- collecter, qualifier et annoter des échantillons tissulaires,
- constituer et gérer des collections d'échantillons.

La collection et le conditionnement des échantillons tissulaires sont devenus cruciaux pour la faisabilité et la qualité des investigations ultérieures (13). Le morphologiste doit maîtriser la durée qui s'écoule entre le prélèvement initial et le conditionnement de l'échantillon. Il doit savoir choisir le conditionnement le plus adapté au projet envisagé : cryopréservation, qui conserve les constituants moléculaires mais altère la structure, ou fixation, qui préserve la structure mais altère les constituants moléculaires. Il doit savoir recourir à d'autres techniques de conditionnement, comme la dessiccation, pour répondre à des besoins spécifiques.

Le morphologiste doit également savoir contribuer à la constitution et à la gestion de collections d'échantillons tissulaires ou cellulaires, susceptibles d'entrer dans ce qu'il est convenu d'appeler un centre de ressources biologiques (14). Le principe est

de collecter, conserver et mettre à disposition des échantillons tissulaires ou cellulaires, associés à des informations pertinentes et utiles sur l'échantillon lui-même et sur la source dont il provient, dans le respect des règles éthiques et sous le contrôle de procédures qualité.

CONCLUSION

Beaucoup de changements sont survenus dans les outils, les techniques, les activités mêmes relevant du champ des disciplines morphologiques. Les techniques se sont enrichies et diversifiées, les besoins sont devenus plus exigeants, les morphologistes ont dû apprendre à participer à des processus collectifs, impliquant d'autres acteurs qu'eux-mêmes. Même si des inquiétudes se font parfois jour sur les perspectives et l'avenir des techniques morphologiques, la tendance actuelle est de rendre à la morphologie un rôle clé, tant dans le diagnostic qu'en recherche, et notamment en recherche translationnelle où le morphologiste a un rôle essentiel de traducteur et de transducteur entre la recherche fondamentale et les applications cliniques, diagnostiques et thérapeutiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. SCOAZEC J.Y. : Tissue and cell imaging in situ: potential for applications in pathology and endoscopy. *Gut*, 2003, 52 Suppl 4, 1-6.

2. ABATI A., FETSCH P. & FILIE A. : If cells could talk. The application of new techniques to cytopathology. *Clin. Lab. Med.*, 1998, 18, 561-583.

3. JANIN A., LEGRES L., LEBOEUF C., SCOAZEC J.Y. & BERTHEAU P. : Les lames virtuelles en recherche expérimentale et en recherche clinique. *Med. Sci. (Paris)*, 2012, 28, 990-992.

4. MARI M., HOFMAN V., BUTORI C., ILIE M., LASSALLE S., GRIER P., SADOULET D., SCOAZEC J.Y. & HOFMAN P. : Que reste t-il de la microscopie électronique pour le diagnostic anatomopathologique en 2010 ? *Ann. Pathol.*, 2010, 30, 263-272.

5. MURRAY G.I. : An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem.*, 2007, 109, 171-176.

6. ERICKSON H.S., GILLESPIE J.W. & EMMERT-BUCK M.R. : Tissue microdissection. *Methods Mol. Biol.*, 2008, 424, 433-448.

7. DECARLO K., EMLEY A., DADZIE O.E. & MAHALINGAM M. : Laser capture microdissection: methods and applications. *Methods Mol. Biol.*, 2011, 755, 1-15.

8. XU B.J. : Combining laser capture microdissection and proteomics: methodologies and clinical applications. *Proteomics Clin. Appl.*, 2010, 4, 116-123.

9. LIU N.Q., BRAAKMAN R.B., STINGL C., LUIDER T.M., MARTENS J.W., FOEKENS J.A. & UMAR A. : Proteomics pipeline for biomarker discovery of laser capture microdissected breast cancer tissue. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2012, 17, 155-164.

10. CHENG L., ZHANG S., MACLENNAN G.T., WILLIAMSON S.R., DAVIDSON D.D., WANG M., JONES T.D., LOPEZ-BELTRAN A. & MONTIRONI R. : Laser-assisted microdissection in translational research: theory, technical considerations, and future applications. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 2013, 21, 31-47.

11. GILLETT C.E., SPRINGALL R.J., BARNES D.M. & HANBY A.M. : Multiple tissue core arrays in histopathology research: a validation study. *J. Pathol.*, 2000, 192, 549-553.

12. HOWBROOK D.N., VAN DER VALK A.M., O'SHAUGHNESSY M.C., SARKER D.K., BAKER S.C. & LLOYD A.W. : Developments in microarray technologies. *Drug Discov. Today*, 2003, 8, 642-651.

13. PLENAT F., MONTAGNE K., WEINBRECK N., CORBY S., CHAMPIGNEULLE J., ANTUNES L., BONNET C., MAIRE C. & MONHOVEN N. : Les conséquences moléculaires de la fixation et de l'inclusion: exemple des acides nucléiques et des protéines. *Ann. Pathol.*, 2006, 26, 8-21.

14. HEWITT R.E. : Biobanking: the foundation of personalized medicine. *Curr. Opin. Oncol.*, 2011, 23, 112-119.

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 51 à 65

APPROCHE HISTOPATHOLOGIQUE DANS L'ETUDE DE L'IMPACT DU SITE D'INOCULATION INTRACÉRÉBRALE D'AGENTS PRION DANS LA DISTRIBUTION NEUROANATOMIQUE DE LA PROTÉINE PRION PATHOLOGIQUE

Mikael Leboidre, Sarah Bourgeois, Jean-Michel Bridon et Anna Bencsik*
*anna.bencsik@anses.fr

Unité Maladies Neurodégénératives (MND), Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), 31 avenue Tony Garnier 69364 Lyon cedex 07

RESUME

Dans les études expérimentales de maladies à prion comme la tremblante du mouton ou l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), l'agent infectieux est habituellement administré par voie intra-cérébrale sans contrôle du site exact d'entrée. Or le site d'injection exact pourrait avoir un impact sur la distribution cérébrale de la protéine prion pathologique, un paramètre critique pour identifier les différentes souches d'agents responsables de ces maladies. Dans cette hypothèse, quatre sites d'injection ont été étudiés : le cortex, le striatum, le cervelet et le ventricule latéral. L'étude porte sur 2 lignées de souris, une lignée sauvage C57Bl/6 et une transgénique pour la protéine prion ovine (TgOvPrP4) infectées par des souches d'agents prion différents (encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) et tremblante). La distribution et la nature (amas amyloïde ou non) des dépôts de protéine prion pathologique (PrPd) mises en évidence par des colorations au rouge Congo, par immunohistochimie et PET-Blot (Paraffin Embedded Tissue Blot), ne révèlent pas de différence majeure dans le cas des souris C57Bl/6, quelque soit le site d'injection. Dans le modèle TgOvPrP4, les 2 lots expérimentaux totalement achevés, ceux correspondant aux sites d'injection dans le striatum et le ventricule latéral ont pu être analysés. Les données collectées suggèrent qu'il pourrait y avoir un impact sur la répartition de PrPd dans ce modèle.

Ceci pourra se confirmer par l'analyse des lots encore en cours d'expérimentation pour les autres sites d'injection (cortex et cervelet).

INTRODUCTION

Les encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles (ESST) ou maladies à prions, sont des maladies neurodégénératives rares (1/1 000 000 dans le monde pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)), toujours fatales, qui incluent la tremblante du mouton et de la chèvre, l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou maladie de la vache folle) chez les bovins et la MCJ chez l'homme.

Les ESST se caractérisent par des périodes d'incubations longues (jusqu'à plusieurs dizaines d'années) et silencieuses jusqu'à l'apparition de symptômes cliniques. Ces maladies peuvent s'accompagner de troubles sensitifs, comportementaux et moteurs (direction générale de la Santé, 2000). Sur le plan histologique, la caractéristique principale est la présence d'une vacuolisation du tissu cérébral, qui lorsqu'elle est intense donne un aspect spongieux. Ces lésions s'accompagnent d'une prolifération des astrocytes (gliose réactionnelle), parfois d'une perte neuronale et surtout par l'accumulation d'une protéine prion anormale (PrPd pour PrP-disease associated) (Prusiner, 1982, Chetail 2011). Cette PrPd correspond à une isoforme anormale, résultant de la conversion conformationnelle d'une protéine prion cellulaire (PrPc), codée par l'hôte et majoritairement exprimée dans le système nerveux central (SNC) (Caughey et al., 1988). Les dépôts de protéines prion sont présents sous diverses formes, en grains, en amas et parfois en plaques qui peuvent être de nature amyloïde ou non. En dépit de ces lésions du tissu nerveux, aucune réaction inflammatoire n'est associée. Les maladies à prion font ainsi partie des protéinopathies, un groupe d'affections associées à la formation d'amyloïdes et à l'agrégation de protéines ayant une structure ß plissée.

A ce jour, la nature exacte de l'agent infectieux, responsable de ces maladies, comme sa physiopathologie (entrée, dissémination, réplication, pouvoir pathogène au sein d'une espèce hôte donnée) est loin d'être totalement élucidée. Même s'ils partagent quelques points communs avec les virus (taille, filtrabilité…), ce ne sont pas des virus et ces agents ont une résistance inhabituelle à de nombreux traitements d'inactivation classiquement utilisés en microbiologie (traitements chimiques, thermiques…). C'est pourquoi ils sont également appelé agents transmissibles non conventionnels (ATNC). La PrPd semble être tout ou partie de l'agent infectieux et représente le marqueur le plus spécifique pour identifier ces pathologies.

De façon remarquable, il existe plusieurs souches d'ATNC ou agents infectieux prion. La distinction de ces souches se fait essentiellement par des études de transmission à la souris. Parmi les différents critères étudiés (signes cliniques, durée moyenne d'incubation, profil lésionnel qui résume la distribution et l'intensité des lésions de vacuolisation dans des sites neuroanatomiques de référence), la distribution cérébrale et la

typologie des dépôts de PrPd est essentielle. Elle est étudiée sur des coupes d'encéphales analysées par immunohistochimie (IHC) et PET-Blot (Paraffin Embedded Tissue-Blot) de la PrPd (Lezmi et al., 2006). Il est admis que pour une souche donnée, l'ensemble des critères histopathologiques constitue une « signature » spécifique reproductible pour un modèle murin donné et pour une voie d'inoculation donnée. Certaines variations ont cependant pu être observées, notamment en terme de distribution cérébrale (certains sites n'accumulent pas systématiquement des dépôts de PrPd), comme par exemple pour la souche responsable de l'ESB classique (Bencsik et Baron, 2007). Compte tenu des modalités usuelles d'inoculation intracérébrale dans les études expérimentales de maladies à prions (inoculation sous anesthésie, à main levée), il est possible que ces variations résultent d'une variabilité du site exact d'injection intracérébrale. Dans ce contexte, un programme d'inoculations intracérébrales dans des sites précis par stéréotaxie, dans deux modèles murins (C57Bl/6 et la lignée transgénique TgOvPrP4) et pour deux souches différentes d'ESB classique et de tremblante, a été mis en place dans le but de tester l'influence possible du site d'entrée de l'agent infectieux sur la distribution intracérébrale de PrPd. Quatre sites différents sont étudiés, le cortex pariétal, le striatum, le cervelet et le ventricule latéral. L'objectif de la présente étude est de collecter et d'interpréter les données histopathologiques issues de ce programme d'inoculation afin de caractériser l'effet possible du site précis d'entrée de l'agent infectieux sur sa dissémination, identifiée par l'étude de la distribution cérébrale de la PrPd.

MATERIEL ET METHODES

Animaux et agents infectieux

Deux lignées de souris sont utilisées : des souris C57Bl/6 (Laboratoire Charles River, L'Arbresle) et des souris transgéniques TgOvPrP4. Agées de quatre à six semaines, ces dernières sont produites par la plateforme d'expérimentation animale (PFEA) de l'Anses de Lyon. Ces souris expriment la protéine prion ovine, sous un promoteur NSE et n'exprime plus la protéine prion murine (Crozet et al, 2001). Deux souches d'agents infectieux prion sont étudiées, celle responsable de l'encéphalopathie spongiforme bovine classique (ESB-C) et une souche de tremblante, la C506M3. Le tableau 1 résume le programme d'inoculation réalisé.

Injections stéréotaxiques

Les coordonnées d'injection pour les 4 sites choisis, représentés schématiquement sur la figure 1 (cortex cérébral, striatum, ventricule latéral, cervelet) ont été définies d'après l'atlas stéréotaxique de Franklin et Paxinos (The mouse brain in stereotaxic coordinates, *third edition 2007*). Les injections sont réalisées sur souris anesthésiées (mélange kétamine et xylazine) à l'aide d'un appareil de stéréotaxie (KOPF) équipé d'une seringue Hamilton de 10 µL couplée à une pompe pousse-seringue. Chaque animal reçoit 10µl d'inoculum infectieux (homogénat cérébral à 2% contenant l'agent infectieux d'une souche donnée).

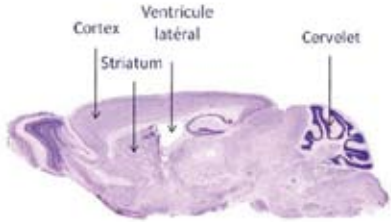


Figure 1 : Localisation schématique des 4 sites d'injection sur une coupe sagittale de cerveau de souris.

Dans les lots témoins réalisés pour chacun des sites étudiés dans chacune des 2 lignées, l'inoculum infectieux est remplacé par un inoculum non infectieux (homogénat cérébral sain à 2 %). Un suivi clinique hebdomadaire permet de mettre en évidence le développement de la maladie. Au stade terminal, les souris sont euthanasiées et les cerveaux sont prélevés. Toutes ces expériences sont menées en conformité avec le comité d'éthique régional (CREEA n°98), le comité d'éthique français (décret 87-848) et la directive européenne 86/609/EEC.

Les cerveaux prélevés sont fixés à l'aide d'une solution tamponnée de formol 10 % pendant 48 heures. Recoupés en cinq sections coronales standardisées, ces cerveaux sont plongés dans un bain d'acide formique 99 % pendant une heure à température ambiante afin d'inactiver l'agent infectieux, même si cette inactivation reste incomplète, elle permet de gérer les prélèvements infectieux avant l'étape d'inclusion en paraffine qui s'effectue classiquement. Des coupes de 6 µm d'épaisseur sont récupérées soit sur lames de verre (pour l'IHC et les colorations), soit sur membranes de nitrocellulose (pour le PET Blot).

Immunohistochimie et colorations

La vacuolisation cérébrale est identifiée après une coloration usuelle à l'hématoxyline et éosine (H&E). Elle est quantifiée à l'aide d'une approche assistée par ordinateur décrite en détail dans un travail antérieur (Bencsik et al., 2006). Ces données quantitatives permettent d'établir les profils lésionnels, selon une méthode de référence (Fraser et Dickinson, 1968) qui s'appuie sur la quantification de l'intensité des lésions de vacuolisation dans 9 sites neuro-anatomiques de substance grise : 1. noyaux de la moelle dorsale, 2. cervelet, 3. collicules, 4 : hypothalamus, 5 : thalamus, 6 : hippocampe, 7 : septum, 8 et 9 cortex cérébral au niveau du thalamus et du septum respectivement. A chacun de ces sites, une valeur numérique qui reflète l'intensité de la vacuolisation est attribuée selon une échelle de score compris entre 0 et 5. Les données reportées sur un graphique forment le profil lésionnel caractéristique d'une souche prion données dans une hôte donné.

Pour visualiser les morphotypes et la localisation des dépôts de protéine prion pathologique dans le cerveau, une détection immunohistochimique à l'aide d'un anticorps anti-prion SAF84 est appliquée. Cet anticorps reconnait la séquence peptidique ovine 167-172. De façon notable, il n'existe pas d'anticorps capables de distinguer la PrPd de la PrPc, il est donc indispensable d'effectuer une combinaison de prétraitements chimiques, enzymatiques et thermiques afin de ne détecter que la PrPd (Buffa et Bencsik, 2009).

Brièvement, une fois déparaffinées et réhydratées, les lames sont plongées dans un bain d'acide formique 99 % pendant 10 minutes à température ambiante sous une hotte chimique, puis sont autoclavées à 121°C pendant 20 minutes. Enfin, un démasquage antigénique de la PrPd est complété par une digestion à la protéinase K (PK) à 20 µg/ml (37°C, 15 min). Après rinçage, à l'aide de tampon phosphate salin (100 mM, pH 7,4, 9% NaCl ; 0,1% Tween 20) (PBST), les peroxydases endogènes sont bloquées dans un bain d'eau oxygénée à 3% (5 minutes). Puis la technique s'effectue grâce à la méthode du Coverplate (*Thermo Electron*) qui permet d'optimiser et de standardiser l'analyse par IHC. Après rinçage avec du tampon phosphate salin (PBST), le blocage des sites non spécifiques est effectué par l'utilisation de réactif bloquant du commerce (10 minutes). Sans rinçage, l'anticorps primaire monoclonal anti-prion SAF84 de souris est déposé (2 µg/ml, *SPI Bio*) pour une incubation à 37°C pendant une heure. Après rinçage avec du PBST, l'anticorps secondaire biotinylé est ajouté pour un contact de 30 minutes à température ambiante. Une étape d'amplification du signal est obtenue grâce à un complexe avidine-biotine couplé à la peroxydase (*Kit ABC Elite-Vector*). Le substrat utilisé, la diaminobenzidine (DAB), intensifié par l'ajout de chlorure de nickel (*kit Vector Laboratories*), génère des dépôts noirâtres offrant un meilleur contraste. La révélation est stoppée en plongeant les lames dans un bain d'eau ultra pure. Enfin les lames sont colorées à l'hématoxyline aqueuse, déshydratées et recouvertes de lamelles. L'observation et l'analyse des résultats s'effectuent grâce à un microscope (*Olympus BX51*) couplé à une station d'analyse d'images (*logiciels Morpho Expert et Mosaic, Explora Nova*).

Une coloration au rouge Congo permet de caractériser la nature amyloïde de certains dépôts de PrPd. En lumière polarisée, la substance amyloïde colorée par le rouge Congo a un comportement unique spécifique avec l'expression d'une biréfringence verte et rouge comme l'illustre la figure 2C.

Paraffin Embedded Tissue-Blot (PET-Blot)

Il s'agit d'une technique originale, non quantitative mais qualitative, permettant de visualiser *in situ* la PrPd à partir de coupes histologiques recueillies sur membranes de nitrocellulose. Cette méthode complémentaire à l'IHC, facilite l'étude des sites neuroanatomiques d'accumulation de la PrPd. Dans le cas présent nous avons pu vérifier sur les analyses systématiques par IHC que la distribution neuroanatomique des dépôts de PrPd était homogène au sein d'un groupe. Ainsi à l'aide d'analyses par PET-Blot il est non seulement possible d'illustrer de façon représentative cette distribution, mais aussi d'une façon sensible et plus fiable qu'à l'aide d'une retranscription sur un schéma. Le principe et le protocole ont été présentés en détails dans des travaux publiés précédemment dans la revue (Buffa 2009 et Chetail 2011). Les membranes sont d'abord déparaffinées, déshydratées, séchées à plat pendant une nuit à température ambiante (TA). Les membranes sont réhydratées avec du TBST tiède (Tampon Tris salin + Tween : 10mM Tris-HCl, pH 7,8, 100mM NaCl ; 0.05%Tween 20) pendant 10 min.

Puis, toutes les étapes se déroulent en tubes dans un four à hybridation à rotation. Une digestion enzymatique (protéinase K (PK), 250µg/ml), pendant 6h à 55°C permet de ne conserver que les fragments de PrPd résistant à cette digestion enzymatique, aussi appelé PrPres. La PrPd est ensuite dénaturée à l'aide d'une solution de thiocyanate de guanidium 4M, pendant 10 min, à TA, permettant de démasquer certains sites antigéniques. Plusieurs rinçages sont effectués (5x5min) avant d'ajouter l'anticorps primaire (SAF84), dilué dans une solution bloquante (TBST + lait en poudre 0.2%) pendant une nuit à TA. Après avoir effectué des lavages au TBST (3x10min), pendant 1h à 37°C, l'anticorps secondaire (1/500) couplé à la phosphatase alcaline est ajouté. Après plusieurs rinçages effectués à TA, température conservée jusqu'à la révélation, les membranes sont plongées dans du NTM (Tris amino, NaCl 5M, MgCl2 1M), tampon alcalin (pH 9,5), à raison de 2 bains de 5 min, afin d'être dans des conditions de pH optimales pour la phosphatase alcaline. Enfin la révélation se fait à l'aide de NBT/BCIP (Nitroblue tetrazolium/5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate), substrat de la phosphatase alcaline, pendant 20 à 30 min. Les dépôts spécifiques sont de couleurs bleu/noir. La révélation est stoppée par un bain d'eau ultra-pure. Une fois sèches, elles sont mises sous plaques de verre pour permettre la capture d'image réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire couplée à une station d'analyse d'image (*logiciel Morpho Expert, Explora Nova*).

Les témoins utilisés en PET-Blot sont des cerveaux de moutons atteints de tremblante (témoins positifs) et des moutons sains (témoins négatifs). De même, des souris TgOvPrP4 non inoculées (saines) ainsi que des souris KO pour le gène de la PrP murine sont utilisées comme témoins négatifs.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude de l'impact du site précis d'entrée des agents infectieux prion dans le cerveau sur la distribution neuroanatomique de la protéine pathologique (PrPd), a été menée par une approche stéréotaxique. Quatre régions cérébrales différentes ont fait l'objet d'une administration de deux souches d'agents prion, l'ESB-C et la C506M3, une souche de tremblante. L'étude a pu être menée sur 2 lignées de souris, la C57Bl/6 et la TgOvPrP4 (Tableau 1). Quelque soit le site d'injection considéré et pour les 2 lignées, il a été possible de transmettre la maladie comme l'atteste la présence d'une vacuolisation importante du tissu nerveux accompagnée par l'accumulation de dépôts caractéristiques de PrPd (figure 2). Ce marqueur, le plus spécifique dans l'identification de ces maladies est aussi un marqueur plus précoce puisque le plus souvent, ces dépôts de PrPd précèdent la dégénérescence spongiforme et la gliose astrocytaire typiques dans ces affections (Fraser and Dickinson, 1973). De façon importante, le type de dépôts de la PrPd a été soigneusement pris en compte dans ces expérimentations (Tableau 2). En effet dans le modèle transgénique, l'impact du site d'injection initial sur les dépôts en plaques amyloïdes florides, caractéristiques de l'expression de l'ESB-C, a été particulièrement étudiés (figure 3B).

Sites neuro-anatomiques		Cortex	Striatum	Ventricule Latéral	Cervelet
Souches Inoculées	ESB-C				
	C506M3				
		Lignées de souris			
Légende		TgOvPrP4:		C57Bl6:	

Tableau 1 : Représentation schématique du programme d'inoculations des souches d'ESB-C et de tremblante C506M3 sur les souris de lignées sauvage C57Bl/6 et transgénique TgOvPrP4 dans 4 sites neuroanatomiques différents.

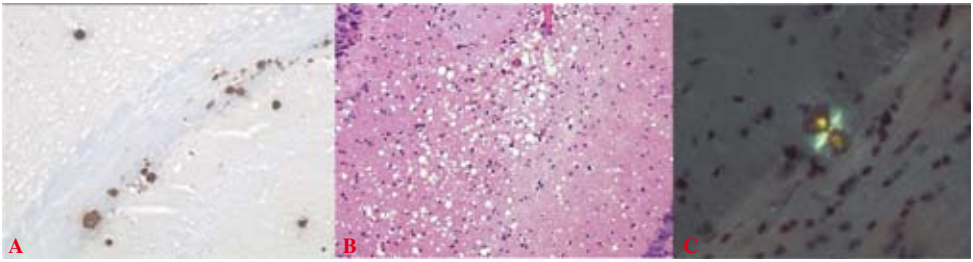
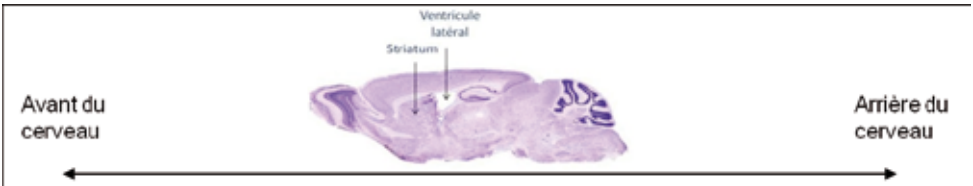


Figure 2 : A. Illustration de dépôts en amas de PrPd révélés par immunohistochimie (anticorps monoclonal anti-prion SAF84). **B.** Lésions de vacuolisation caractéristique dans l'hippocampe d'une souris infectée par une souche de tremblante. H&E. **C.** Le caractère amyloïde de certains dépôts en amas de PrP pathologique est vérifié par la présence d'une biréfringence caractéristique d'une coupe colorée au rouge Congo observée sous lumière polarisée.

De même dans la lignée sauvage, l'influence du site d'injection a été recherchée vis-à-vis du critère de la présence d'amas amyloïdes ou non (figure 3D). Ainsi, dans chacun des modèles murins il a été ensuite possible de réaliser une analyse comparée prenant en compte le profil lésionnel, la distribution neuroanatomique et la typologie des dépôts de PrPd.

La figure 4 permet de visualiser l'étude de la tremblante C506M3 dans la lignée C57Bl/6 et indique une relative homogénéité entre les profils lésionnels en dehors du score lésionnel observé dans les collicules (site de référence n°3). Cependant l'interprétation est limitée dans le cas des injections dans le ventricule latéral dans la mesure où seuls 3 animaux sur 6 ont pu être exploités. En effet dans ce lot 3 souris ont été trouvées mortes sans pouvoir pratiquer de prélèvements exploitables par histologie.. D'une façon globale, ces résultats sont cohérents avec les observations faites pour une souche apparentée à la C506M3, la souche ME7, qui injectée de façon



		Cx	St	cc	S	Ent	Hip	Th	Amy	Me	C	TC	Rph
ESB-C	VL	PA	PA	**PAF**	PA	-	-	PA	-	**PAF**	-	PA	PA
	St	**PAF**	**PAF**	**PAF**	-	**PAF**	**PAF**	**PAF**	**PAF**	**PAF**	**PAF**	PA	**PAF**
C506M3	VL	PA	-	PA	PA	-	-	-	-	-	-	-	-
	St	PA	PA	PA	PA	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 2 : Analyse comparée des souches ESB-C et C506M sur la présence de plaque amyloïde floride (PAF) ou non (PA) dans le cerveau des souris TgOvPrP4, selon le site d'injection (VL : ventricule latéral, S : striatum).

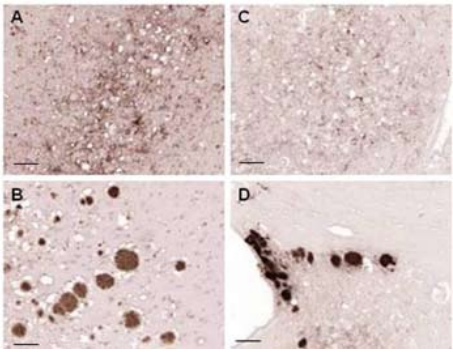


Figure 3 : Principaux types de dépôts de PrPd détectés par immunohistochimie et caractéristiques des 2 souches ESB-C (**A, B**) et tremblante C506M3 (**C, D**) dans la lignée TgOvPrP4. **A.** Pour la souche ESB-C le marquage de la protéine prion peut-être diffus, **B.** ou sous forme de plaques amyloïdes florides typiques de l'ESB-C (B) **C.** Pour la souche de tremblante, les dépôts peuvent aussi être diffus **D.** ou en petits amas amyloïdes mais jamais florides. Barres d'échelle, A-D : 20 µm

stéréotaxique dans le cortex versus le cervelet ou le thalamus n'induit pas de différence dans l'aspect du profil lésionnel (Kim et al., 1987). De façon remarquable il semble ne pas y avoir non plus d'influence du site d'injection sur la distribution des dépôts de PrPd comme l'illustre les PET-blot de la figure 4. Comparativement à la souche de tremblante C506M3, la figure 5 illustre les données obtenues pour les injections de la souche ESB-C dans les souris C57Bl/6. L'injection dans des sites différents conduit à la présence de légères variations dans les profils lésionnels, qui pourraient toutefois résulter aussi de la faible intensité globale des lésions de vacuolisations. De façon plus marquée, les quatre sites d'injection génèrent des différences sensibles sur la distribution de la PrPd, notamment dans le cas du striatum et du cervelet comparativement aux 2 sites cortex et ventricule latéral qui conduisent à une distribution similaire entre eux.

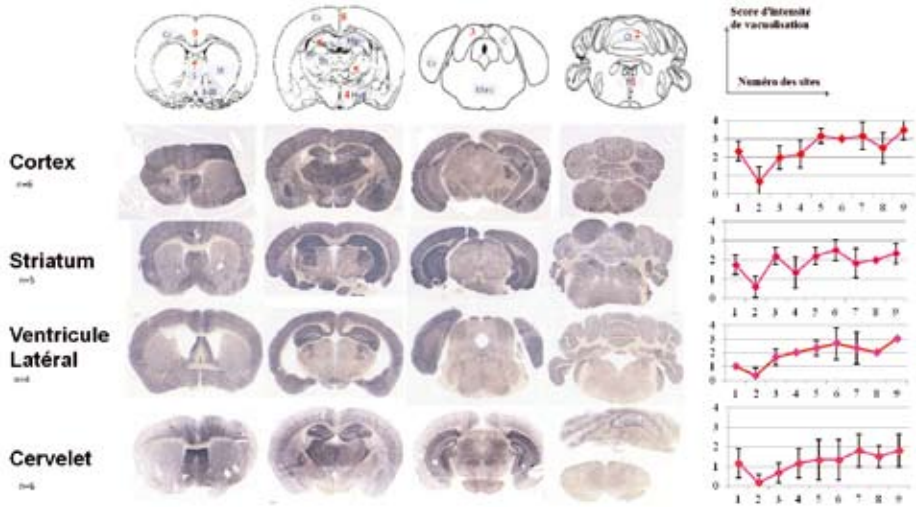


Figure 4 : Analyse comparée de la distribution neuro-anatomique de la PrPd (PET-Blot) et du profil lésionnel en fonction du site d'injection. Cas de la tremblante C506M3 dans la lignée C57Bl/6. Les dépôts foncés révèlent la présence de PrPd. Une représentation schématique des différents niveaux de coupe permet d'identifier les principales régions cérébrales. Cx : cortex, S : septum, St : striatum, bdB : bande diagonale de Broca, Hip : hippocampe, Th : thalamus, Hyp : hypothalamus, C : collicules, Més : mésencéphale, Ct : cervelet, Tc : tronc cérébral. Les chiffres de 1 à 9 en rouge permettent de situer les 9 sites de substance grise pris en compte pour établir les profils lésionnels

Le striatum génère en particulier une asymétrie marquée, surtout à l'avant du cerveau. Cette observation inattendue reste cependant sans conséquence sur la possibilité de distinguer entre elles les souches d'ESB-C et de tremblante puisque la distribution neuroanatomique de PrPd quelque soit le site d'injection pour une souche et un modèle de souris donnés sont distinctes. Ainsi, nos analyses indiquent que dans la lignée sauvage C57Bl/6, l'inoculation d'agents prion ESB-C et C506M3 se traduit par une distribution distincte dans l'ensemble du cerveau avec des sites préférentiels caractérisant chacune de ces souches, et ce quelque soit le site d'injection considéré. Nos résultats, cohérents avec des travaux antérieurs de transmissions expérimentales d'ESST (Casaccia-Bonnefil et al., 1993), suggèrent que le site d'injection ne semble pas, ou très peu, influencer la répartition de PrPd dans le cerveau des souris C57Bl/6 dans le cas de la tremblante. En revanche de façon originale nos résultats suggèrent des différences pour l'ESB-C qui pourraient traduire des propriétés particulières de l'agent infectieux responsable de l'ESB-C, en terme de neurotropisme.

Il est possible d'aborder cette hypothèse dans l'autre modèle d'étude utilisé dans ce travail. En effet en parallèle des études sur la lignée sauvage, la lignée de souris transgénique TgOvPrP4 a été utilisée. L'originalité

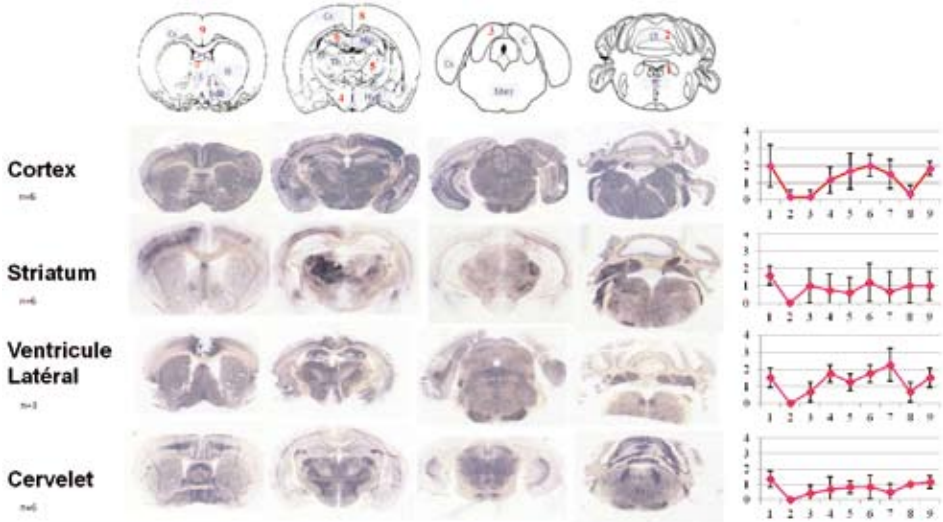


Figure 5 : Souche ESB-C dans la lignée C57Bl/6 : analyse comparée de la distribution neuro-anatomique de la PrPd (PET-Blot) et du profil lésionnel en fonction du site d'injection.

et la force de ce modèle repose sur sa propriété remarquable qui permet de distinguer la souche responsable de l'ESB-C parmi toutes les autres souches sur la base de la détection de plaques amyloïdes florides (Crozet et al., 2001). En effet cette figure histopathologique, qui a permis de caractériser le variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob, est des plus rares. Or dans notre modèle, il est systématiquement et uniquement associé à l'agent infectieux responsable de l'ESB, qu'elle qu'en soit la source (vache atteinte d'ESB, mouton expérimentalement infecté par l'ESB, chèvre naturellement infectée par l'ESB, guépard en captivité contaminé par l'agent de l'ESB...). Ainsi par l'identification de cette plaque amyloïde floride dans le cerveau des souris infectées, nous disposons d'un modèle puissant pour distinguer cette souche d'agent infectieux comparativement aux nombreux autres agents prions identifiés à ce jour. La comparaison des données obtenues pour les souris TgOvPrP4 et C57Bl/6 souligne l'intérêt de faire appel à ces modèles dans les études de typage de souches d'agents prion, le comportement des agents infectieux dans ces modèles étant différent. Comme l'indique clairement les figures 4/5 comparativement aux figures 6/7, des divergences apparaissent non seulement au niveau de la structure affectée du cerveau mais aussi dans le type de dépôts de PrPd (tableau 2). Ainsi les souris C57Bl/6 ne présentent pas de dépôts sous forme de plaques amyloïdes comme les souris TgOvPrP4. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études (DeArmond et al., 1997 ; Bencsik et al., 2007).

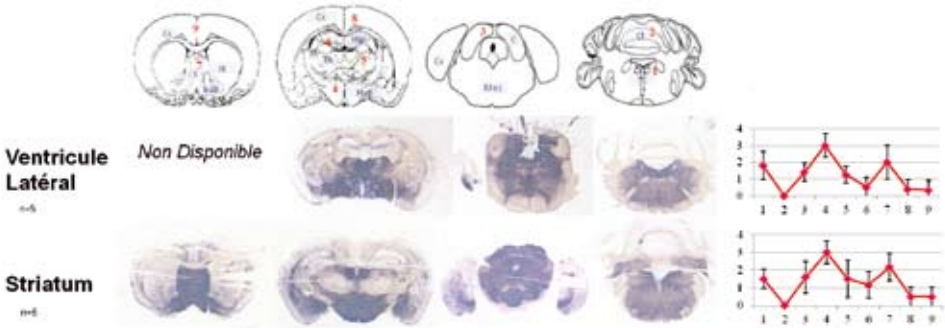


Figure 6 : Souche tremblante C506M3 dans la lignée TgOvPrP4 : analyse comparée de la distribution neuro-anatomique de la PrPd (PET-Blot) et du profil lésionnel en fonction du site d'injection.

Jusqu'à présent, dans le modèle TgOvPrP4, seuls 2 sites d'injection sur 4 ont pu être analysés pour cette étude (striatum et ventricule latéral) dans la mesure où les injections stéréotaxiques ont été étalées dans le temps, notamment en fonction des capacités de production de cette lignée assurée au sein de notre structure. Ces maladies ont la particularité de se développer lentement et les 2 derniers lots expérimentaux visant à tester l'injection dans le cortex et le cervelet n'étaient pas disponibles au moment de la rédaction de cet article. Toujours est-il que comme l'indiquent les figures 6 et 7, il est déjà possible de recueillir des informations intéressantes dans ce modèle.

La figure 6 illustre les données observées pour la transmission de la souche C506M3 dans le modèle TgOvPrP4 et indique clairement l'absence d'influence du site d'injection sur le profil lésionnel et la distribution de PrPd. La figure 7 indique également l'absence apparente d'influence du site d'entrée de l'ESB-C sur le profil lésionnel, mais indique une différence marquée dans la distribution de PrPd dans le cas d'une injection dans le striatum. Cette étude apporte ainsi des éléments forts dans l'originalité de ce modèle. En premier lieu, nos observations confortent la spécificité du modèle pour l'expression de plaques amyloïdes florides et indique que ces plaques qui s'exprimaient de façon variable dans le striatum ne l'est plus si le site d'injection est contrôlé. En effet, lorsque l'injection est réalisée dans le ventricule latéral, le striatum est épargné, mais si l'injection est directe dans le striatum, des plaques amyloïdes florides sont systématiquement détectées dans le striatum. Par comparaison avec ces plaques amyloïdes florides (PAF), dans le cas de la souche C506M3, nous avons pu également mettre en évidence des particularités vis à vis des dépôts en amas amyloïdes (plaques amyloïdes (PA) non florides). La répartition de ces plaques - attestée par la présence des propriétés de biréfringence de l'amyloïde en lumière polarisé après coloration au rouge Congo - diffère de façon majeure entre les souches (tableau 2). Ainsi, si la souche ESB-C

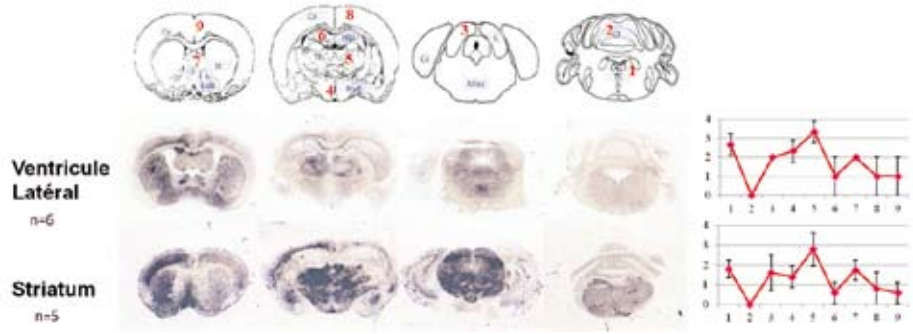


Figure 7 : Souche ESB-C dans la lignée TgOvPrP4 : analyse comparée de la distribution neuro-anatomique de la PrPd (PET-Blot) et du profil lésionnel en fonction du site d'injection.

induit une expression large de plaques amyloïdes (de l'avant à l'arrière du cerveau), la souche de tremblante C506M3 induit une accumulation de plaques amyloïdes limitée aux régions antérieures du cerveau. Après l'injection intracérébrale dans le striatum, des plaques amyloïdes sont alors fréquemment observées dans le cortex, striatum et thalamus.

Une autre observation intéressante dans le cas d'une injection de l'agent de l'ESB-C dans le striatum est l'asymétrie des distributions de PrPd, cette particularité n'étant pas ou très peu visible pour la souche C506M3 et ne concerne pas la répartition des lésions de vacuolisation qui restent symétriques. Même si le site d'injection n'est pas nécessairement visualisé, il est fort probable que l'accumulation de PrPd soit identifiée de façon ipsi-latérale à l'injection effectuée (Fig. 6 A-D). Ces résultats peuvent être comparés avec une étude antérieure qui indique que la présence de plaques amyloïdes est toujours plus fréquente du côté de l'injection (Bruce and Fraser, 1981). Les travaux de Bruce avancent à ce sujet également la possibilité d'une influence initiale des dommages traumatiques au point d'injection comme cofacteurs dans l'expression régionalisée des plaques. Cependant nos résultats disponibles dans le modèle C57Bl/6 suggèrent qu'une telle influence reste sans doute mineure (pas d'asymétrie observée pour le site cortical et cérébelleux). Cet aspect pourra être revisité lors l'analyse des cerveaux de souris TgOvPrP4 inoculées dans le cortex et le cervelet qui sont en cours d'expérimentation.

Comme le résume la figure 8, l'asymétrie observée pour la lignée C57Bl/6 l'est donc également dans le modèle TgOvPrP4 mais surtout pour la souche de l'ESB-C. Ainsi cette étude révèle une propriété inattendue relative au neurotropisme de l'ESB-C qui parait plus fort avec capacité d'atteindre des sites de l'avant à l'arrière du cerveau et paradoxalement moins propice à atteindre le côté controlatéral à l'injection. Ceci pourrait suggérer que l'agent infectieux n'utiliserait pas prioritairement les

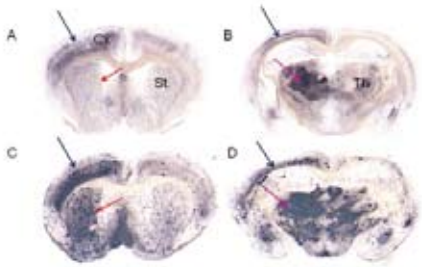


Figure 8 : Illustration de l'asymétrie (flèches bleu pour le cortex, rouge pour le striatum et rose pour le thalamus) dans la distribution de PrPd dans le cerveau de souris C57Bl/6 (**A, B**) et TgOvPrP4 (**C, D**) infectées par la souche ESB-C via le striatum.

connexions nerveuses inter-hémisphériques dans sa dissémination au sein du système nerveux central.

L'asymétrie de plaques amyloïdes n'est pas retrouvée lors d'une injection dans le ventricule latéral. Cette observation traduit le fait que la dissémination des agents infectieux prion est favorisée dans les deux hémisphères grâce aux compartiments ventriculaires du cerveau. Une autre conséquence notable de cette voie d'injection est la dilution de l'agent infectieux par le liquide céphalo-rachidien (LCR). Or une dilution de l'agent infectieux réduit le nombre de dépôts de plaques amyloïdes (Bruce and Fraser, 1981) et cette observation s'est confirmée dans notre étude, de façon plus marquée pour l'ESB-C.

CONCLUSION

L'ensemble de nos résultats suggèrent une distinction entre l'agent de l'ESB-C et la tremblante en réponse à un site d'entrée différent dans le cerveau de souris issues de 2 lignées différentes. L'agent de l'ESB-C pourrait être plus sensible au site d'entrée initial dans le cerveau que ne l'est l'agent de la tremblante utilisé dans cette étude. En particulier, la distribution des plaques amyloïdes pourrait être influencée par certains composants de l'inoculum propres à une souche donnée (seuls l'ESB-C et la C506M3 peuvent générer des plaques amyloïdes, comparativement à d'autres souches de tremblante et seul l'ESB-C génère des plaques amyloïdes florides dans le modèle de souris transgénique) mais aussi par le site initial d'entrée de l'agent infectieux (une asymétrie marquée est observée dans le cas d'une injection dans le striatum). Cette étude de l'impact du site d'entrée de l'agent infectieux sera complétée par l'analyse des lots expérimentaux de souris transgéniques encore en cours, pour les injections réalisées dans le cortex et le cervelet. Lorsqu'ils seront accessibles ils permettront de vérifier si l'impact du site d'entrée en particulier pour la souche de l'ESB-C, est faible ou plus marqué que celui observé ici dans l'étude de la lignée sauvage C57Bl/6.

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement les techniciens de la plateforme d'expérimentation animale de l'Anses de Lyon, Émilie Antier, Rabah Belkheir, Damien Gaillard, Coralie Pulido qui ont pris en charge la production des souris transgéniques, les injections stéréotaxiques, le suivi des animaux et les prélèvements de cerveaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. PRUSINER S.B. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science* 1982; 216:136-44

2. CHETAIL M. & BENCSIK A. Les encephalopathies spongiformes humaines : Creutzfeldt, Jakob et les autres… *Rev Fr Histotechnol* 2011; 24, n°1 : 81-93

3. CAUGHEY B., RACE R. E., CHESEBRO B. Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. J Gen Virol, 1988; 69 :711–716.

4. LEZMI S., BENCSIK A., BARON T. PET-blot Analysis Contributes to BSE Strain Recognition in C57Bl/6 Mice. *J Histochem Cytochem* 2006; 54 : 1087-94

5. BENCSIK A. & BARON T. Bovine spongiform encephalopathy agent in prion protein (PrP)ARR/ARR genotype sheep after peripheral challenge : complete immunohistochemical analysis of disease-associated PrP and transmission studies to ovine-transgenic mice. *J Infect Dis* 2007; 195(7) : 989-996

6. CROZET C., BENCSIK A., FLAMANT F., LEZMI S., SAMARUT J., BARON T. Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO reports* 2001; 2, 10, 952–956.

7. BENCSIK A., PHILIPPE S., VIAL L., CALAVAS D., BARON T. Automatic quantification of vacuolar lesions in the brain of mice infected with transmissible spongiform encephalopathies. *J Virol Methods* 2005; 124 : 197-202

8. FRASER H. & DICKINSON A.G. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 1968; 78 : 301-11

9. BUFFA J. & BENCSIK A. La méthode du PET-Blot différentiel : principe et contribution à l'étude des souches d'agents infectieux responsables des maladies à prion. *Rev Fr Histotechnol* 2009; n°1 : 87-98

10. CHETAIL M. & BENCSIK A. Le PET-Blot épitopique dans l'étude des maladies à prions : mise en évidence de différents fragments de protéine prion pathologique (PrPres) *in situ. Rev Fr Histotechnol* 2011; 24, n°1 : 85-97

11. FRASER H., DICKINSON A.G. Scrapie in mice-agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol*, 1973; 83 : 29-40.

12. KIM Y., CARP R., CALLAHAN S., WISNIEWSKI H. Incubation Periods and Survival Times for Mice Injected Stereotaxically with Three Scrapie Strains in Different Brain Regions. *J Gen Virol*, 1987; 68 : 695-702.

13. CASACCIA-BONNEFIL P., KASCSAK R.J., FERSKO R., CALLAHAN S., CARP R.I. Brain regional distribution of prion protein PrP27-30 in mice stereotaxically microinjected with different strains of scrapie. *J Infect Dis*, 1993; 167 : 7-12.

14. DEARMOND S.J., SANCHEZ H., YEHIELY F., QIU Y., NINCHAK-CASEY A., DAGGETT V., CAMERINO A.P., CAYETANO J., ROGERS M., GROTH D., TORCHIA M., TREMBLAY P., SCOTT M.R., COHEN F.E., PRUSINER S.B. Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* 1997; 19 : 1337–1348.

15. BENCSIK A., PHILIPPE S., DEBEER S., CROZET C., CALAVAS D., BARON T. Scrapie strain transmission studies in ovine PrP transgenic mice reveal dissimilar susceptibility. *Histochem Cell Biol* 2007; 127 : 531-9

16. BRUCE M. & FRASER H. (1981) Effect of route of injection on the frequency and distribution of cerebral amyloid plaques in scrapie mice. *Neuropathol and Applied Neurobiol*, 1981; 7 : 289-298.

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 67 à 82

L'INFECTION À VIRUS EBOLA ET LES MODÈLES ANIMAUX ASSOCIÉS.

Reynard O.[1], Jacquot F.[2], Volchkov V. [1]

[1] CIRI INSERM U1111 équipe Bases Moléculaires de la pathogénicité virale, 21 avenue Tony Garnier 69007 Lyon – France

[2] Laboratoire P4 INSERM Jean Mérieux, Lyon, 21 avenue Tony Garnier 69007 Lyon – France

Introduction

Ces dernières années ont montré l'émergence d'un certain nombre d'agents pathogènes et notamment des agents devant être manipulés dans des laboratoires de niveau de sécurité biologique 4 (NSB4). Ces agents pathogènes sont des virus entraînant des taux de mortalité pouvant atteindre 90% et pour lesquels aucun traitement thérapeutique ou prophylactique n'existe à ce jour. L'expérimentation en laboratoire NSB4 est réalisée par des chercheurs et techniciens formés et expérimentés à la manipulation d'agents de classe 4 ainsi qu'au travail en combinaison pressurisée. Des procédures spécifiques connues et appliquées par tous permettent de travailler dans le respect des règles de biosécurité. Le virus Ebola fait partie de ces agents pathogènes de niveau 4, il est responsable de fièvres hémorragiques fatales chez l'homme et les singes. Le virus Ebola a été isolé en 1976, lors d'une épidémie en République Démocratique du Congo (anciennement Zaïre) où le taux de mortalité a avoisiné 90%. Ce virus infecte, dans la nature, les primates et décime les populations de chimpanzés et de gorilles des montagnes, premiers maillons de l'infection vers l'homme (7) (52). En effet la contagion des hommes intervient majoritairement par le contact et la consommation d'animaux sauvages infectés, très majoritairement les singes.

De nombreuses campagnes de recherche ont permis d'identifier divers mammifères infectés par le virus Ebola et principalement des primates mais aussi anecdotiquement des antilopes et des porcs-épics (47). Mais toutes les infections chez ces animaux se sont révélées être symptomatiques et fatales.

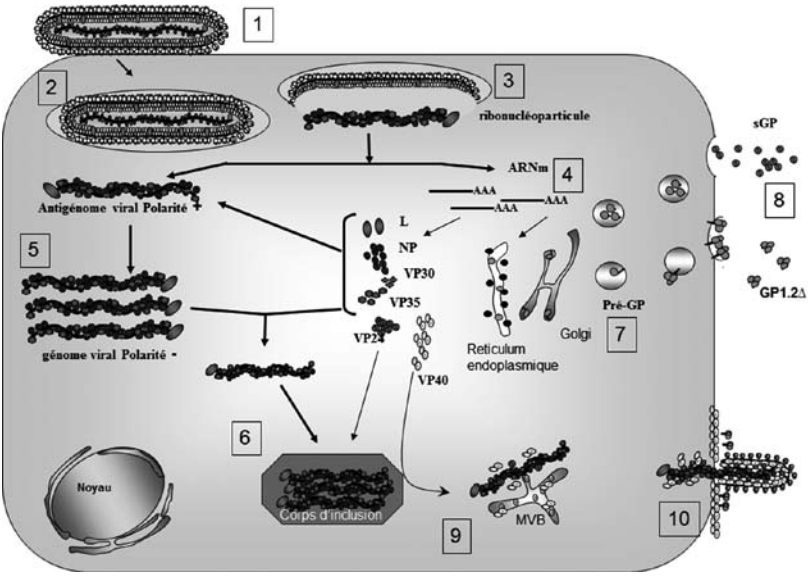


Figure 1 : cycle viral du virus Ebola

1 : Adhésion du virion à la surface cellulaire

2 : Endocytose de la particule virale

3 : Libération de la RNP après digestion de la GP par les cathepsines et interaction avec NPC1 (Coté M., 2012)

4 : Transcription et traduction des protéines virales via les ribosomes libres ou le réticulum endoplasmique granuleux pour la traduction des ARNm des GP

5 : Réplication de l'ARN antigénomique en ARN génomique viral

6 : Assemblage des ribonucléoparticules et formation des corps d'inclusion

7 : Traduction et maturation des glycoprotéines

8 : Libération de la sGP, libération de la GP1,2△ via le clivage par TACE de la glycoprotéine membranaire (Dolnik O., 2004)

9 : Libération des ribonucléoparticules (potentiellement par VP24) et transport par la VP40

10 : Bourgeonnement du à une déformation de la membrane par VP40 et les protéines ESCRT

En 2005, Eric Leroy et son équipe ont identifié la présence d'ARN viral dans des organes de chauve-souris frugivores ne présentant aucun signe clinique (34). Trois espèces sont supposées être les réservoirs du virus Ebola : *Hypsignathus monstrosus, Epomops franqueti* et *Myonycteris torquata*. Très récemment un nouveau virus apparenté au filovirus a été identifié dans des chauves-souris au nord de l'Espagne, le virus Lloviu (39).

Le virus ebola appartient à l'ordre des Mononegavirales, qui regroupe les virus à ARN négatif simple brin non segmenté. Il constitue, avec les virus Marburg et Lliovіu, la famille des Filoviridae. Il existe 5 genres de virus Ebola : Zaïre ebolavirus, Reston ebolavirus, Bundibogyo ebolavirus, Sudan ebolavirus et Taï Forest ebolavirus (32). Leurs génomes sont composés d'une succession linéaire de gènes qui codent

pour 7 protéines structurales : la nucléoprotéine NP, la protéine VP35, la protéine VP40, la glycoprotéine GP, la protéine VP30, la protéine VP24 et la polymérase L ainsi que pour une protéine non structurale sécrétée spécifique du virus Ebola, la protéine sGP. Cette dernière protéine provient de l'édition du gène de la glycoprotéine (54). C'est la glycoprotéine GP et la présence de phosphatidyl-serine qui induit l'attachement des particules virales au niveau d'un large panel de corécepteurs membranaires (TIM1, DC-SIGN, Axl,…) (11, 30, 36). Cet attachement induit l'endocytose / macropinocytose des particules qui une fois présente dans les endolysosomes subissent une digestion enzymatique par les cathepsines (3, 10). Cette digestion permet l'élimination du domaine mucinique et l'exposition du domaine de fixation au récepteur, la protéine Nieman-Pick C1 (13). Ainsi pour ce virus, la libération de la ribonucléoparticule intervient après fusion de l'enveloppe virale et de la membrane de l'endolysosome. La figure 1 décrit le cycle viral au niveau cellulaire et notamment les étapes d'entrée, de réplication et de bourgeonnement du virus. La recherche sur le virus Ebola nécessite l'utilisation d'outil moléculaire tel que la génétique inverse mais les hypothèses avancées nécessitent d'être confirmées dans des modèles in vivo en animalerie A4. Plusieurs modèles de rongeurs sont disponibles ainsi que différentes espèces de primates. Les chercheurs se doivent de cibler le modèle en fonction des réponses à apporter.

La fièvre hémorragique à virus Ebola

Les infections à virus Ebola provoquent une pathologie rapide et grave aboutissant au décès de 35% à 90% des personnes infectées. Les symptômes cliniques débutent par une brusque poussée de fièvre et de forts maux de tête. Les patients souffrent le plus souvent de cachexie, de vomissements, de diarrhées, de douleurs abdominales et d'une altération de leur état mental. Dans 10 à 50% des cas, des symptômes hémorragiques apparaissent avec notamment des hémorragies pétéchiales, des saignements au niveau du tractus digestif, des conjonctives, et très souvent aux points d'injections (19, 43). Cette composante hémorragique varie selon la souche virale responsable de l'épidémie (1, 2, 12, 38, 46). La figure 2 décrit le déroulement de l'infection à Ebola tel que suggéré dans la littérature.

Des études détaillées de cette infection ont montré que les cellules dendritiques et les macrophages sont les cellules cibles initiales au site d'entrée (21, 26, 35). Ces cellules mobiles transportent l'agent pathogène vers les ganglions lymphatiques régionaux, d'où après d'autres cycles réplicatifs, des virions sont libérés par les voies lymphatiques et la circulation sanguine. Les organes primo infectés sont la rate et le foie. La figure 3 (A : observation macroscopique, B : observation microscopique) montre dans un modèle cobaye l'infection multifocale typique du foie entraînant une nécrose et une stéatose. Après plusieurs cycles réplicatifs, le virus infecte les cellules parenchymateuses environnantes,

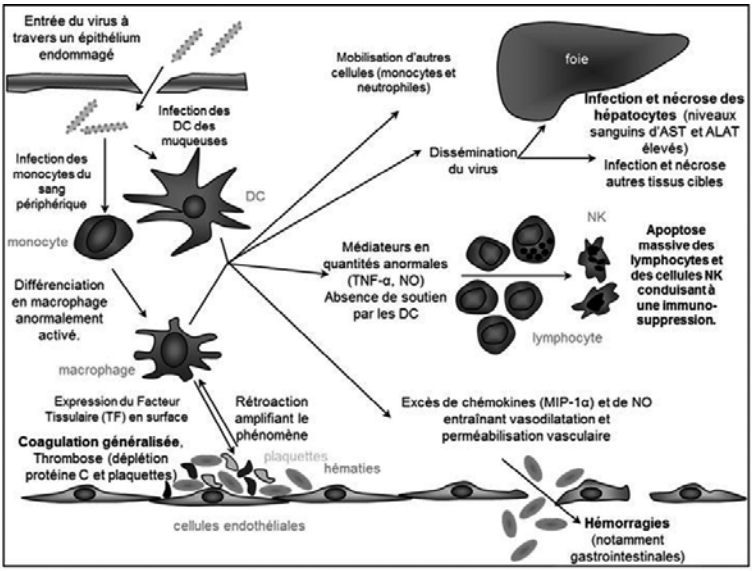


Figure 2 : Pathogenèse des fièvres hémorragiques à Filovirus

TF : Tissue Factor, MIP : Macrophage Inhibitory Protein, NO : Nitric oxide, NK : Natural Killer, TNF : Tumor Necrosis Factor, DC : Dendridtic Cells, AST : Aspartate amino Transferase, ALAT : Alanine amino Transferase

Les cellules dendritiques et les macrophages constituent les cibles primaires de l'infection, ces cellules disséminent alors rapidement les virions dans l'organisme. Les cellules infectées libèrent de grande quantité de cytokine pro et anti inflammatoire ce qui conduit à l'apparition de modifications des paramètres biologiques (coagulation, inflammation, apoptose des lymphocytes). L'hépatotropisme est une caractéristique de l'infection à virus Ebola, elle se traduit par l'apparition de foyers de nécrose.

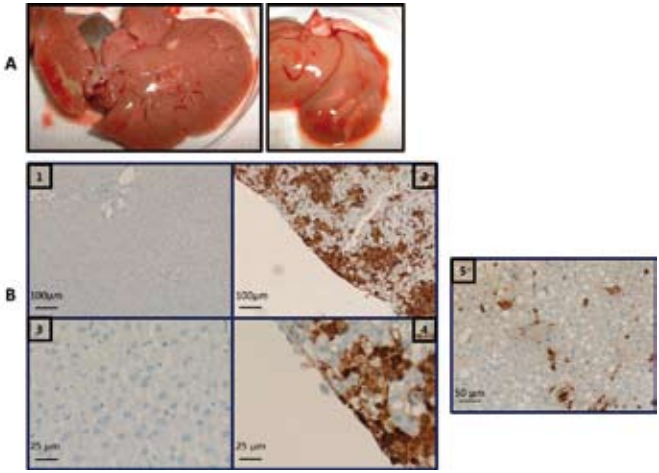


Figure 3 : Lésions hépatiques macroscopiques et microscopiques dans le modèle cobaye

A : observation macroscopique de foie de cobaye infecté par Zaïre ebolavirus adapté au cobaye (souche 8mC générée par génétique inverse)

B : observation microscopique de foie de cobaye infecté par Zaïre ebolavirus, (1-3 non infecté, 2-4-5 infecté) (1-2 : x10 / 3-4 : x40 / 5 : x20); fixation 15 jours en PFA 4%, inclusion en parrafine, immunomarquage anti VP40, contre coloration Hematoxiline, Anipath Lyon

y compris les hépatocytes et les cellules corticales surrénales, entraînant l'expansion des foyers de nécrose. Les conclusions des quelques rapports d'autopsie disponibles de patients infectés font état d'une hémorragie limitée dans les muqueuses, la peau et les organes parenchymateux, y compris l'estomac et les intestins, associée à de vastes zones de nécrose du parenchyme hépatique (31, 41, 58, 59). Des nécroses similaires avec dépôt de fibrine, ont également été décrites dans la pulpe blanche et la pulpe rouge de la rate, modifiant souvent son architecture. Les lésions hépatiques sont décrites comme des foyers multifocaux d'infection engendrant une nécrose massive des zones infectées. (22, 41). Bien que les cellules endothéliales en culture soient facilement infectées par le virus, il y a peu de preuves de la réplication virale dans ces cellules in vivo avant les dernières étapes de la maladie.

Conformément à la lymphadénopathie observée chez les patients infectés, on observe une nécrose multifocale dans les tissus lymphoïdes. Cependant, les lymphocytes ne sont pas infectés par les filovirus, et, par conséquent, l'infection virale n'est pas directement la cause de la lympholyse massive vue après l'infection (35). Au contraire, ce mécanisme de lympholyse est apoptotique (4-6).

Au cours de l'infection, une virémie extrêmement élevée est retrouvée en même temps qu'une libération massive et anarchique de cytokines pro-inflammatoires. Dans le sérum des patients, la forme soluble de la glycoprotéine virale est également retrouvée en forte quantité (43). Cet ensemble de causes semblent être à l'origine du choc septique observé dans les cas d'infections fatales (57).

Au cours de l'évolution de la maladie, les modifications hématologiques et biochimiques comprennent une lymphopénie, une leucocytose des polynucléaires, et une élévation des concentrations sériques d'aspartate et d'alanine aminotransférases (28).

Les études sur le virus Ebola Zaïre dans un modèle primate ont montré que les anomalies de la coagulation sont initiées en tout début d'infection, lorsque les macrophages infectés expriment le facteur tissulaire (TF) à leurs surfaces (25). La libération de microparticules membranaires portant ce facteur tissulaire contribue à l'élaboration d'une coagulopathie systémique. La virémie élevée associée à la présence de cytokines pro inflammatoires et de glycoprotéine virale contribue également à l'augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'à l'apparition fréquente d'une coagulation intravasculaire disséminée. Les D-dimères sont détectables dans le plasma dès 24h après l'infection et une diminution de la protéine C activée est observée dès le deuxième jour, alors que la baisse de la numération plaquettaire ne se produit qu'au jour 3-4.

En dépit de l'extrême pathogénicité du virus Ebola, quelques patients infectés survivent à la phase aiguë de la maladie et guérissent de l'infection en absence de tout traitement. De plus, lors des épidémies

à virus Ebola, des cas d'infections humaines asymptomatiques ont été identifiés pour des individus directement exposés à des patients ou du matériel contaminé par le virus Ebola (6, 33). Une réponse inflammatoire précoce semble avoir un rôle dans le contrôle de l'infection par le virus Ebola (5), cependant les mécanismes moléculaires permettant la survie de ces patients sont peu connus.

Modèles animaux utilisés en animalerie A4

Les chercheurs disposent actuellement de plusieurs modèles animaux afin de mieux comprendre l'infection à virus Ebola et ainsi développer de nouvelles stratégies thérapeutiques (Figure 4).

Chez les rongeurs, 3 modèles ont été étudiés : la souris, le cobaye et le hamster (8, 9, 16, 48, 53, 55). Chez la souris immunocompétente, l'injection de virus sauvage n'induit pas le développement d'une pathologie et la réplication virale est rapidement contrôlée (9). A l'opposé, l'infection de souris SCID (sans lymphocytes T et B) par une souche sauvage de virus Ebola induit le développement pendant 20 à 25 jours d'une infection létale avec une dégradation continue de l'état des animaux. L'importance de la réponse immunitaire innée dans le contrôle de l'infection a été soulignée par Bray et collaborateurs. Cette équipe a montré la très grande sensibilité des modèles STAT-1 KO et IFN α/ß récepteur KO à l'infection par une souche sauvage (8). Il existe à présent un modèle d'infection létale basé sur des souris immunocompétentes utilisant une souche adaptée (9 passages) de virus Ebola (9). Cette souche possède des mutations dans les gènes VP24 et NP. Bien que permettant l'utilisation de groupes plus importants ainsi que l'utilisation de nombreux réactifs commerciaux,

	Souris (svg)	Souris (ad)	Cobaye (svg)	Cobaye (ad)	Hamster (svg)	Hamster (ad)	Chauve-souris (EboV svg)	*Chauve-souris* (MbgV svg)*	Primate NH (svg)	Homme (svg)
Virémie	Faible	Elevée	Faible	Elevée	Faible	Elevée	minime	*minime*	Elevée	Elevée
Virulence	Faible	Elevée	Faible	Elevée	Faible	Elevée	Non	*Non*	Elevée	Elevée
Tropisme primaire	inconnu	CMP	inconnu	CMP	CMP	CMP	CMP	*CMP*	CMP	CMP
rash maculaire	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	*Non*	Oui	Oui
anomalies de coagulation	Non	minime	Non	intermédiaire	minime	Elevée	inconnu	*inconnu*	Elevée	Elevée
Enzymes hépatiques	inconnu	Elevée	inconnu	Elevée	inconnu	Elevée	inconnu	*inconnu*	Elevée	Elevée
Thrombocytopénie	inconnu	Oui	inconnu	Oui	non	Oui	inconnu	*inconnu*	Oui	Oui
Apoptose lymphocytaire	inconnu	Oui	inconnu	limitée	non	Oui	inconnu	*inconnu*	Oui	Oui
Cytokine pro-inflammatoire	inconnu	Oui	inconnu	Oui	oui / IFN type I	Oui	inconnu	*inconnu*	Oui	Oui

Figure 4 : Sensibilité des mammifères à l'infection par le Zaïre ebolavirus
Svg : sauvage, ad : adaptée, CMP : cellules mononuclées phagocytaires, IFN : interféron, NH : non humain, MbgV : Marburgvirus.
Chauve-souris infectées par Ebolavirus : *Tadarida Condylura (insectivore), Tadarida Pumila (insectivore), Epomophorus wahlbergi (frugivore)*
*Chauves-souris infectées par Marbugvirus : *Roussetus aegyptiacus (frugivore)*

le modèle souris présente l'inconvénient de ne pas développer une infection similaire à celle observée chez les primates avec notamment une modification des paramètres de coagulation très limitée. Ce modèle est cependant très approprié dans l'étude de composés antiviraux.

Le cobaye est tout comme la souris naturellement résistant à l'infection par le virus Ebola avec cependant pour seule différence la présence d'un pic de température de 24-48h cinq jours après l'injection. Le modèle d'infection létale utilise une souche adaptée par 8 passages pour le cobaye dunkin (8mc) ou 5 passages pour le cobaye souche 13 (20) ; grâce à la technique de la génétique inverse la souche virale 8mc a pu être caractérisée et l'importance des mutations dans les gènes VP24 et NP a été soulignée (20, 37, 53). L'infection chez le cobaye se traduit par une phase asymptomatique de 4-5 jours puis par une brusque poussée de fièvre accompagnée d'une déshydratation et d'un état de prostration. On retrouve chez ces animaux une augmentation du temps de prothrombine (PT) et du temps de céphaline activée (aPTT). La mort survient 7 à 8 jours après l'infection. Bien que l'on observe des modifications de la coagulation sanguine, la présence de dépôt de fibrine dans le foie est limitée dans ce modèle alors qu'elle est une caractéristique de la fièvre hémorragique à virus Ebola chez le primate (15).

Très récemment Ebihara et collaborateurs ont établi un modèle d'infection létale chez le hamster doré en utilisant la souche adaptée à la souris (16). Dans ce modèle, les animaux commencent à montrer des signes cliniques dès 3 jours après l'infection et succombent 24 à 48h après le début des symptômes. Une modification importante des paramètres de coagulation est observée et ceci de façon très similaire au modèle primate (augmentation du PT, de l'aPTT, diminution du taux de fibrinogène et de la protéine C). Des études sont en cours afin d'établir une souche virale adaptée au hamster à partir d'une souche sauvage de virus Ebola afin de mieux comprendre les phénomènes de passage inter-espèces (communication personnelle).

De nombreux primates non humains (PNH) ont été utilisés comme modèle pour l'infection à virus Ebola et notamment les macaques rhésus et cynomolgus, les babouins et les singes vert africains. Les macaques cynomolgus sont, d'après la littérature, le modèle le plus sensible à l'infection par l'ensemble des virus Ebola, ces singes développent une phase fébrile très précoce (2-3 jours post inoculations) (21). A l'inverse, les singes verts *(Chlorocebus aethiops)* ne sont pas, tout comme l'homme, sensible à l'infection par le Reston ebolavirus (17). Cette espèce de singe présente de plus la particularité de très peu présenter le rash typique de l'infection à filovirus (42). Les babouins quant à eux présentent l'avantage de produire, comme chez l'homme, les 4 classes d'immunoglobulines G alors que les macaques ne produisent pas d'IgG3, un isotype d'anticorps opsonisant d'importance dans les infections virales (49). Les singes développent dans les modèles expérimentaux une pathologie très similaire à celle observée chez

l'homme avec notamment un tropisme en tout point identique, l'apparition de coagulation intravasculaire disséminée et une libération massive de cytokine pro et anti inflammatoire en phase terminale. Cette caractéristique en fait un modèle de choix pour les études de vaccinologie. Dans la nature, les populations de chimpanzés et de gorilles sont fortement affectées par les épidémies de virus Ebola, ces primates développent une pathologie similaire en tout point à celle observé chez l'homme (56). Récemment le ouistiti commun *(Callithrix jacchus)* a été utilisé comme modèle pour les infections à filovirus. Ce modèle de petits singes nord-américains développe des symptômes similaires à ceux observés chez l'homme (14) et pourrait représenter dans le futur une alternative aux plus grosses espèces africaines.

Le modèle chauve-souris a tout d'abord été étudié lors de grandes campagnes d'étude visant à identifier le réservoir naturel des filovirus. Ainsi des 1996, une équipe sud-africaine, en collaboration avec le CDC, a infecté expérimentalement des chauves-souris africaines frugivores et insectivores. Leurs premiers résultats ont alors montré une réplication virale dans ces animaux (50). En 2005, Eric Leroy et son équipe ont formellement identifié le réservoir naturel du virus Ebola chez les chauves-souris *Hypsignathus monstrosus, Epomops franqueti* et *Myonycteris torquata* (34) et les chauves-souris *Rousettus aegyptiacus* comme un des réservoirs du virus Marburg (51). A l'heure actuelle, une seule équipe sud-africaine a expérimenté en animalerie A4 l'infection par le virus Marburg chez la roussette africaine (40). Leurs résultats montrent que ces animaux présentent une virémie sans toutefois excréter de virus ni présenter de symptômes. A l'avenir ces animaux seront une source précieuse d'informations sur le contrôle de la réplication virale et l'établissement d'une réponse immunitaire cohérente et efficace.

Conclusion

La manipulation des animaux en animalerie A4 imposent des conditions de stabulation et de travail spécifiques. Les animaux ne pouvant être manipulés vigiles, les primates sont placés dans des systèmes d'hébergement conçus pour permettre une anesthésie à distance. Les rongeurs, quant à eux, sont placés dans une boîte à induction d'anesthésie gazeuse avant d'être manipulés. Le personnel est quant à lui équipé de scaphandres, de sous-gants à double couche désinfectante, d'une paire de sur-gants et de manchettes en Kevlar ainsi qu'une paire de gants en latex. Dans le cas de la manipulation des primates, une paire de gants en cuir ainsi qu'un tablier viennent renforcer ces équipements de protection.

A l'heure actuelle, aucun traitement ni vaccin n'est disponible sur le marché, cependant plusieurs candidats vaccins ont montré chez l'animal une grande efficacité (18, 45). De plus, plusieurs approches thérapeutiques sont en cours d'investigation et notamment l'utilisation d'ARNi (23), d'inhibiteurs de réplication (29), de traitements régulant l'homéostasie (27) ou bien encore d'anticorps monoclonaux (44). Les

modèles animaux constituent un outil indispensable pour la compréhension des fièvres hémorragiques. Le développement des modèles asymptomatiques (chauve-souris) permet une meilleure compréhension de la régulation de la croissance virale par l'hôte. Les modèles symptomatiques permettent quant à eux l'évaluation des approches thérapeutiques et en recherche fondamentale une validation physiologique des hypothèses basées sur les observations in vitro. Les primates non humains sont le modèle de choix pour l'étude des filovirus car ce sont les seuls modèles développant une fièvre hémorragique comparable à l'infection humaine. Ils sont de plus le seul modèle permettant une évaluation rationnelle des candidats vaccins, en effet de nombreux candidats vaccins efficaces chez les rongeurs se sont révélés inefficaces chez le singe (24). Les rongeurs ont une immunité innée davantage développée que les primates ce qui limite leurs utilisations en vaccinologie cependant ils constituent un modèle de choix pour évaluer les molécules antivirales (8).

Remerciement

Nous tenons à remercier Nicolas Gadot ainsi que toute l'équipe d'Anipath, pour leurs apports au niveau histologique dans nos recherches.

BIBLIOGRAPHIE

1. 1978. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. Bull World Health Organ 56:247-270.

2. 1978. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Bull World Health Organ 56:271-293.

3. Aleksandrowicz, P., A. Marzi, N. Biedenkopf, N. Beimforde, S. Becker, T. Hoenen, H. Feldmann, and H. J. Schnittler. 2011. Ebola virus enters host cells by macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis. J Infect Dis 204 Suppl 3:S957-967.

4. Baize, S., E. M. Leroy, M. C. Georges-Courbot, M. Capron, J. Lansoud-Soukate, P. Debre, S. P. Fisher-Hoch, J. B. McCormick, and A. J. Georges. 1999. Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. Nat Med 5:423-426.

5. Baize, S., E. M. Leroy, A. J. Georges, M. C. Georges-Courbot, M. Capron, I. Bedjabaga, J. Lansoud-Soukate, and E. Mavoungou. 2002. Inflammatory responses in Ebola virus-infected patients. Clin Exp Immunol 128:163-168.

6. Baize, S., E. M. Leroy, E. Mavoungou, and S. P. Fisher-Hoch. 2000. Apoptosis in fatal Ebola infection. Does the virus toll the bell for immune system? Apoptosis 5:5-7.

7. Bermejo, M., J. D. Rodriguez-Teijeiro, G. Illera, A. Barroso, C. Vila, and P. D. Walsh. 2006. Ebola outbreak killed 5000 gorillas. Science 314:1564.

8. Bray, M. 2001. The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection. J Gen Virol 82:1365-1373.

9. Bray, M., K. Davis, T. Geisbert, C. Schmaljohn, and J. Huggins. 1998. A mouse model for evaluation of prophylaxis and therapy of Ebola hemorrhagic fever. J Infect Dis 178:651-661.

10. Brecher, M., K. L. Schornberg, S. E. Delos, M. L. Fusco, E. O. Saphire, and J. M. White. 2012. Cathepsin cleavage potentiates the Ebola virus glycoprotein to undergo a subsequent fusion-relevant conformational change. J Virol 86:364-372.

11. Brindley, M. A., C. L. Hunt, A. S. Kondratowicz, J. Bowman, P. L. Sinn, P. B. McCray, Jr., K. Quinn, M. L. Weller, J. A. Chiorini, and W. Maury. 2011. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. Virology 415:83-94.

12. Bwaka, M. A., M. J. Bonnet, P. Calain, R. Colebunders, A. De Roo, Y. Guimard, K. R. Katwiki, K. Kibadi, M. A. Kipasa, K. J. Kuvula, B. B. Mapanda, M. Massamba, K. D. Mupapa, J. J. Muyembe-Tamfum, E. Ndaberey, C. J. Peters, P. E. Rollin, and E. Van den Enden. 1999. Ebola hemorrhagic fever in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: clinical observations in 103 patients. J Infect Dis 179 Suppl 1:S1-7.

13. Carette, J. E., M. Raaben, A. C. Wong, A. S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A. I. Kuehne, P. J. Kranzusch, A. M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J. M. Dye, S. P. Whelan, K. Chandran, and T. R. Brummelkamp. 2011. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. Nature 477:340-343.

14. Carrion, R., Jr., Y. Ro, K. Hoosien, A. Ticer, K. Brasky, M. de la Garza, K. Mansfield, and J. L. Patterson. 2011. A small nonhuman primate model for filovirus-induced disease. Virology 420:117-124.

15. Connolly, B. M., K. E. Steele, K. J. Davis, T. W. Geisbert, W. M. Kell, N. K. Jaax, and P. B. Jahrling. 1999. Pathogenesis of experimental Ebola virus infection in guinea pigs. J Infect Dis 179 Suppl 1:S203-217.

16. Ebihara, H., M. Zivcec, D. Gardner, D. Falzarano, R. Lacasse, R. Rosenke, D. Long, E. Haddock, E. Fischer, Y. Kawaoka, and H. Feldmann. 2013. A Syrian golden hamster model recapitulating ebola hemorrhagic Fever. J Infect Dis 207:306-318.

17. Fisher-Hoch, S. P., T. L. Brammer, S. G. Trappier, L. C. Hutwagner, B. B. Farrar, S. L. Ruo, B. G. Brown, L. M. Hermann, G. I. Perez-Oronoz, C. S. Goldsmith, and et al. 1992. Pathogenic potential of filoviruses: role of geographic origin of primate host and virus strain. J Infect Dis 166:753-763.

18. Geisbert, T. W., and H. Feldmann. 2011. Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. J Infect Dis 204 Suppl 3:S1075-1081.

19. Geisbert, T. W., and L. E. Hensley. 2004. Ebola virus: new insights into disease aetiopathology and possible therapeutic interventions. Expert Rev Mol Med 6:1-24.

20. Geisbert, T. W., L. E. Hensley, E. Kagan, E. Z. Yu, J. B. Geisbert, K. Daddario-DiCaprio, E. A. Fritz, P. B. Jahrling, K. McClintock, J. R. Phelps, A. C. Lee, A. Judge, L. B. Jeffs, and I. MacLachlan. 2006. Postexposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference. J Infect Dis 193:1650-1657.

21. Geisbert, T. W., L. E. Hensley, T. Larsen, H. A. Young, D. S. Reed, J. B. Geisbert, D. P. Scott, E. Kagan, P. B. Jahrling, and K. J. Davis. 2003. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection. Am J Pathol 163:2347-2370.

22. Geisbert, T. W., and N. K. Jaax. 1998. Marburg hemorrhagic fever: report of a case studied by immunohistochemistry and electron microscopy. Ultrastruct Pathol 22:3-17.

23. Geisbert, T. W., A. C. Lee, M. Robbins, J. B. Geisbert, A. N. Honko, V. Sood, J. C. Johnson, S. de Jong, I. Tavakoli, A. Judge, L. E. Hensley, and I. Maclachlan. 2010. Postexposure protection of nonhuman primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. Lancet 375:1896-1905.

24. Geisbert, T. W., P. Pushko, K. Anderson, J. Smith, K. J. Davis, and P. B. Jahrling. 2002. Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. Emerg Infect Dis 8:503-507.

25. Geisbert, T. W., H. A. Young, P. B. Jahrling, K. J. Davis, E. Kagan, and L. E. Hensley. 2003. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event. J Infect Dis 188:1618-1629.

26. Geisbert, T. W., H. A. Young, P. B. Jahrling, K. J. Davis, T. Larsen, E. Kagan, and L. E. Hensley. 2003. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in primate models: evidence that hemorrhage is not a direct effect of virus-induced cytolysis of endothelial cells. Am J Pathol 163:2371-2382.

27. Hensley, L. E., E. L. Stevens, S. B. Yan, J. B. Geisbert, W. L. Macias, T. Larsen, K. M. Daddario-DiCaprio, G. H. Cassell, P. B. Jahrling, and T. W. Geisbert. 2007. Recombinant human activated protein C for the postexposure treatment of Ebola hemorrhagic fever. J Infect Dis 196 Suppl 2:S390-399.

28. Hoenen, T., A. Groseth, D. Falzarano, and H. Feldmann. 2006. Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease. Trends Mol Med 12:206-215.

29. Iversen, P. L., T. K. Warren, J. B. Wells, N. L. Garza, D. V. Mourich, L. S. Welch, R. G. Panchal, and S. Bavari. 2012. Discovery and Early Development of AVI-7537 and AVI-7288 for the Treatment of Ebola Virus and Marburg Virus Infections. Viruses 4:2806-2830.

30. Kondratowicz, A. S., N. J. Lennemann, P. L. Sinn, R. A. Davey, C. L. Hunt, S. Moller-Tank, D. K. Meyerholz, P. Rennert, R. F. Mullins, M. Brindley, L. M. Sandersfeld, K. Quinn, M. Weller, P. B. McCray, Jr., J. Chiorini, and W. Maury. 2011. T-cell immunoglobulin and mucin domain 1 (TIM-1) is a receptor for Zaire Ebolavirus and Lake Victoria Marburgvirus. Proc Natl Acad Sci U S A 108:8426-8431.

31. Kortepeter, M. G., D. G. Bausch, and M. Bray. 2011. Basic clinical and laboratory features of filoviral hemorrhagic fever. J Infect Dis 204 Suppl 3:S810-816.

32. Kuhn, J. H., S. Becker, H. Ebihara, T. W. Geisbert, K. M. Johnson, Y. Kawaoka, W. I. Lipkin, A. I. Negredo, S. V. Netesov, S. T. Nichol, G. Palacios, C. J. Peters, A. Tenorio, V. E. Volchkov, and P. B. Jahrling. 2010. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. Arch Virol 155:2083-2103.

33. Leroy, E. M., S. Baize, V. E. Volchkov, S. P. Fisher-Hoch, M. C. Georges-Courbot, J. Lansoud-Soukate, M. Capron, P. Debre, J. B. McCormick, and A. J. Georges. 2000. Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. Lancet 355:2210-2215.

34. Leroy, E. M., B. Kumulungui, X. Pourrut, P. Rouquet, A. Hassanin, P. Yaba, A. Delicat, J. T. Paweska, J. P. Gonzalez, and R. Swanepoel. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. Nature 438:575-576.

35. Mahanty, S., and M. Bray. 2004. Pathogenesis of filoviral haemorrhagic fevers. Lancet Infect Dis 4:487-498.

36. Marzi, A., T. Gramberg, G. Simmons, P. Moller, A. J. Rennekamp, M. Krumbiegel, M. Geier, J. Eisemann, N. Turza, B. Saunier, A. Steinkasserer, S. Becker, P. Bates, H. Hofmann, and S. Pohlmann. 2004. DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol 78:12090-12095.

37. Mateo, M., C. Carbonnelle, O. Reynard, L. Kolesnikova, K. Nemirov, A. Page, V. A. Volchkova, and V. E. Volchkov. 2011. VP24 is a molecular determinant of Ebola virus virulence in guinea pigs. J Infect Dis 204 Suppl 3:S1011-1020.

38. Ndambi, R., P. Akamituna, M. J. Bonnet, A. M. Tukadila, J. J. Muyembe-Tamfum, and R. Colebunders. 1999. Epidemiologic and clinical aspects of the Ebola virus epidemic in Mosango, Democratic Republic of the Congo, 1995. J Infect Dis 179 Suppl 1:S8-10.

39. Negredo, A., G. Palacios, S. Vazquez-Moron, F. Gonzalez, H. Dopazo, F. Molero, J. Juste, J. Quetglas, N. Savji, M. de la Cruz Martinez, J. E. Herrera, M. Pizarro, S. K. Hutchison, J. E. Echevarria, W. I. Lipkin, and A. Tenorio. 2011. Discovery of an ebolavirus-like filovirus in europe. PLoS Pathog 7:e1002304.

40. Paweska, J. T., P. Jansen van Vuren, J. Masumu, P. A. Leman, A. A. Grobbelaar, M. Birkhead, S. Clift, R. Swanepoel, and A. Kemp. 2012. Virological and serological findings in Rousettus aegyptiacus experimentally inoculated with vero cells-adapted hogan strain of Marburg virus. PLoS One 7:e45479.

41. Perry, D. L., L. Bollinger, and L. W. G. 2012. The Baboon (Papio spp.) as a Model of Human Ebola Virus Infection. Viruses 4:2400-2416.

42. Perry, D. L., L. Bollinger, and G. L. White. 2012. The Baboon (Papio spp.) as a model of human Ebola virus infection. Viruses 4:2400-2416.

43. Peters, C. J., and J. W. LeDuc. 1999. An introduction to Ebola: the virus and the disease. J Infect Dis 179 Suppl 1:ix-xvi.

44. Qiu, X., J. Audet, G. Wong, S. Pillet, A. Bello, T. Cabral, J. E. Strong, F. Plummer, C. R. Corbett, J. B. Alimonti, and G. P. Kobinger. 2012. Successful treatment of ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies. Science translational medicine 4:138ra181.

45. Reynard, O., V. Mokhonov, E. Mokhonova, J. Leung, A. Page, M. Mateo, O. Pyankova, M. C. Georges-Courbot, H. Raoul, A. A. Khromykh, and V. E. Volchkov. 2011. Kunjin virus replicon-based vaccines expressing Ebola virus glycoprotein GP protect the guinea pig against lethal Ebola virus infection. J Infect Dis 204 Suppl 3:S1060-1065.

46. Roddy, P., N. Howard, M. D. Van Kerkhove, J. Lutwama, J. Wamala, Z. Yoti, R. Colebunders, P. P. Palma, E. Sterk, B. Jeffs, M. Van Herp, and M. Borchert. 2012. Clinical manifestations and case management of ebola haemorrhagic Fever caused by a newly identified virus strain, bundibugyo, Uganda, 2007-2008. PLoS One 7:e52986.

47. Rouquet, P., J. M. Froment, M. Bermejo, P. Yaba, A. Delicat, P. E. Rollin, and E. M. Leroy. 2005. Wild animal mortality monitoring and human Ebola outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001-2003. Emerg Infect Dis 11:283-290.

48. Ryabchikova, E., L. Kolesnikova, M. Smolina, V. Tkachev, L. Pereboeva, S. Baranova, A. Grazhdantseva, and Y. Rassadkin. 1996. Ebola virus infection in guinea pigs: presumable role of granulomatous inflammation in pathogenesis. Arch Virol 141:909-921.

49. Shearer, M. H., R. D. Dark, J. Chodosh, and R. C. Kennedy. 1999. Comparison and characterization of immunoglobulin G subclasses among primate species. Clin Diagn Lab Immunol 6:953-958.

50. Swanepoel, R., P. A. Leman, F. J. Burt, N. A. Zachariades, L. E. Braack, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, and C. J. Peters. 1996. Experimental inoculation of plants and animals with Ebola virus. Emerg Infect Dis 2:321-325.

51. Towner, J. S., X. Pourrut, C. G. Albarino, C. N. Nkogue, B. H. Bird, G. Grard, T. G. Ksiazek, J. P. Gonzalez, S. T. Nichol, and E. M. Leroy. 2007. Marburg virus infection detected in a common african bat. PLoS ONE 2:e764.

52. Vogel, G. 2006. Ecology. Tracking Ebola's deadly march among wild apes. Science 314:1522-1523.

53. Volchkov, V. E., A. A. Chepurnov, V. A. Volchkova, V. A. Ternovoj, and H. D. Klenk. 2000. Molecular characterization of guinea pig-adapted variants of Ebola virus. Virology 277:147-155.

54. Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, E. Muhlberger, L. V. Kolesnikova, M. Weik, O. Dolnik, and H. D. Klenk. 2001. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. Science 291:1965-1969.

55. Wahl-Jensen, V., L. Bollinger, D. Safronetz, F. de Kok-Mercado, D. P. Scott, and H. Ebihara. 2012. Use of the Syrian hamster as a new model of ebola virus disease and other viral hemorrhagic fevers. Viruses 4:3754-3784.

56. Walsh, P. D., K. A. Abernethy, M. Bermejo, R. Beyers, P. De Wachter, M. E. Akou, B. Huijbregts, D. I. Mambounga, A. K. Toham, A. M. Kilbourn, S. A. Lahm, S. Latour, F. Maisels, C. Mbina, Y. Mihindou, S. N. Obiang, E. N. Effa, M. P. Starkey, P. Telfer, M. Thibault, C. E. Tutin, L. J. White, and D. S. Wilkie. 2003. Catastrophic ape decline in western equatorial Africa. Nature 422:611-614.

57. Wauquier, N., P. Becquart, C. Padilla, S. Baize, and E. M. Leroy. 2010. Human fatal zaire ebola virus infection is associated with an aberrant innate immunity and with massive lymphocyte apoptosis. PLoS neglected tropical diseases 4.

58. Zaki, S. R., and C. S. Goldsmith. 1999. Pathologic features of filovirus infections in humans. Curr Top Microbiol Immunol 235:97-116.

59. Zampieri, C. A., N. J. Sullivan, and G. J. Nabel. 2007. Immunopathology of highly virulent pathogens: insights from Ebola virus. Nature immunology 8:1159-1164.

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 83 à 95

NOUVELLES APPROCHES DU TRAITEMENT D'IMAGES

Yves TOURNEUR

Centre Commun de Quantimétrie, CNRS, INSERM U1060, Université de LYON
8 rue Rockefeller - 69003 Lyon
yves.tourneur@univ-lyon1.fr

Introduction

L'introduction de l'ordinateur a produit une révolution dans la manière de prendre des images, de les stocker et de les analyser.

Le son, puis l'image, ont pu être stockés et transmis dès la première moitié du XXe siècle. L'utilisation de la téléphonie numérique a posé les premières questions sur la quantité d'informations contenue dans un signal. L'apparition des radars et les besoins militaires de transmission ont puissamment contribué à développer l'analyse de signal dès la seconde guerre mondiale. L'analyse d'images s'est présentée comme une extension de l'analyse de signal, demandant des ressources informatiques plus importantes. Une nouvelle approche a été proposée ensuite dans une série d'articles de deux ingénieurs de l'École des Mines, Georges Matheron et Jean Serra en 1964, la morphologie mathématique.

La plupart des logiciels de traitement d'images permettent d'utiliser et de combiner les approches de traitement du signal et de morphologie mathématique. Avec l'avènement d'internet et des habitudes de collaboration scientifique, des programmes puissants sont maintenant en accès libre.

Cet article a pour but de présenter les méthodes de base de traitement d'images pour les microscopistes, et les développements en cours.

L'image numérique

• *Nature d'une image*

Le traitement d'images est lié à l'imagerie numérique, devenue très accessible avec l'apparition des capteurs électroniques.

Une image **monochrome** est formée de points ou pixels (« PICTure ELements »), convertis en tableau de nombres.

Chaque nombre représente le codage d'une mesure de lumière, sur un certain nombre de valeurs binaires (bits), de 8 à 16, soit un nombre compris entre 0 et 2^8-1 = 255 et 0 à 2^{16}-1 = 65535. Dans tous les cas, le 0 représente le noir par convention, et la valeur la plus élevée le blanc.

Une image **couleur** est composée de trois plans monochromes, relatifs à la mesure au travers de filtres rouge, vert et bleu, en général codés sur 8 bits, ce qui permet 2^8 valeurs pour chaque plan, soit $2^8 \times 2^8 \times 2^8$ = 16 millions de couleurs.

On généralise l'image monochrome ou couleur en fonction de la longueur d'onde λ du plan vertical z, du temps t et finalement une image peut être définie comme un ensemble de points dépendant d'un nombre indéterminé de dimensions correspondant à x, y, z, λ, t...

Le traitement d'image a besoin d'identifier des « objets » reconnus par l'expérimentateur : noyau de cellule, particule, etc. Pour cette représentation, on compose une **image** dite **binaire**, constituée de points ayant deux valeurs possibles, selon que ce point appartient ou pas à cet objet. Plus généralement, une image binaire est composée de valeurs numériques 0 et 1 (ou 0 et 255), estimées point par point, souvent par comparaison de chaque pixel d'une image à un seuil. On regroupe ensuite les pixels voisins (connexes) non nuls, en « objets » auxquels le logiciel attribuera un numéro. Cette opération s'appelle l'étiquetage.

• Capteurs d'image numérique

La saisie d'images sur caméra argentique a pratiquement disparu, d'abord au profit de caméras vidéos qui produisaient un signal de type télévision, noir et blanc ou couleurs, au format PAL en Europe. Le signal était ensuite transmis par câble à un dispositif d'acquisition, souvent dans l'ordinateur. Les contraintes étaient une fréquence d'acquisition fixe (60 images/s aux USA, 50 en Europe) et surtout une taille d'image limitée.

L'image est maintenant convertie dans le capteur, les valeurs numériques étant ensuite transférées à l'ordinateur sans contrainte de taille ni de fréquence. Le capteur peut être matriciel, ponctuel ou linéaire.

Le capteur **matriciel** est composé d'un circuit de silicium, sur lequel sont disposés des systèmes d'électrodes, une par point d'image. Un photon produit dans une plaque fine de semi-conducteur électronique CMOS (Complementary Metal-Oxyde Semiconductor) une paire électron-trou, puis l'électron produit est ensuite immobilisé dans une zone isolante, un « puits de potentiel », sous chaque électrode. Après la période d'exposition, un dispositif permet de lire la quantité d'électrons collectés en chaque point, qui reflète la quantité de lumière reçue. Deux technologies de capteurs diffèrent selon le mode de lecture des puits de potentiel. Les caméras dites « caméras CCD » (Charge-Coupled Device) opèrent en séquence, en faisant glisser les charges d'un point vers le point voisin, pour

ensuite aboutir au point de lecture. Les caméras dites CMOS possèdent un dispositif électronique permettant indépendamment de lire et de transmettre la charge de chaque point.

Avec un capteur **ponctuel**, le champ d'observation est balayé et la quantité de lumière est mesurée point par point par un dispositif à tube à vide (photomultiplicateur), à semiconducteur (photodiode), ou hybride. L'image est ensuite reconstituée à partir de l'ensemble des mesures.

Un capteur **linéaire** peut être constitué comme une caméra à une seule rangée de pixels, dans un scanner qui peut comporter plusieurs milliers d'éléments, ou comme des capteurs ponctuels « accolés », dans un photomultiplicateur multianodes comportant quelques dizaines d'éléments. Les capteurs linéaires permettent une parallélisation de la lecture et du stockage.

Les capteurs couleurs adaptés à la vision humaine dérivent des monochromes, selon principalement trois technologies (figure 1).

La plus répandue est produite par la superposition sur un capteur monochrome d'une lame colorée telle que chaque élément de capteur reçoive de la lumière rouge, verte ou bleue. La répartition est de 25 % pour le rouge et le bleu, et 50 % des pixels pour le vert, pour tenir compte de la meilleure sensibilité de l'œil humain au vert. Cette plaque colorée porte le nom de « matrice de Bayer » (figure 1A). La matrice de Bayer ne permet pas de savoir si deux éléments de couleur différente sont localisés sur le même pixel. Pour une meilleure précision, on utilise alors trois capteurs différents pour les trois couleurs, et placés avec précision pour une correspondance exacte. Des systèmes de filtres et de miroirs renvoient la partie rouge, verte et bleue de l'image sur ces capteurs. Cette technologie s'appelle le tri-CCD (figure 1B).

Enfin, une technologie plus récente utilise un capteur multicouches comme trois capteurs superposés, de telle manière que chacun capte une partie du spectre (figure 1C). La lumière bleue est arrêtée par la

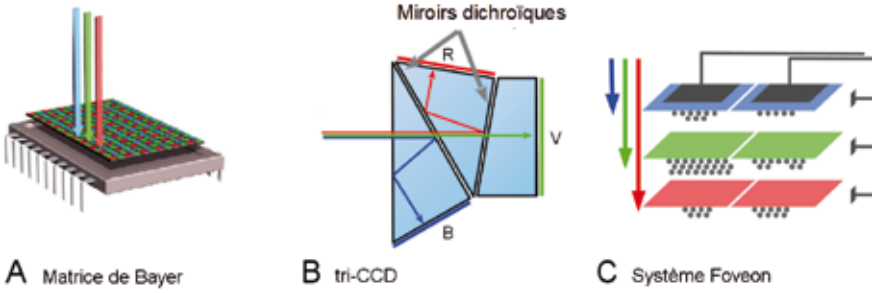


Figure 1 : Trois technologies de capteur couleur **A**, Matrice de Bayer, ou mosaïque de filtres colorés déposée sur un capteur monochrome, **B**, matrice tri-CCD, où l'image est séparée par des miroirs dichroïques en trois couleurs projetés sur trois capteurs ajustés, **C**, capteur Foveon, avec les trois capteurs superposés.

première couche, la verte par la seconde et la rouge par la plus profonde, de sorte que chaque pixel va comporter trois puits de potentiel.

Finalement, quelle que soit la technologie utilisée pour saisir une image, le logiciel de traitement va créer trois plans correspondant aux couleurs rouge, vert et bleu, éventuellement par interpolation des valeurs manquantes si l'image était produite par une matrice de Bayer.

D'autres dispositifs séparent l'image en plus de trois plans de couleurs (image spectrale, ou hyperspectrale), avec une roue de filtres ou avec des dispositifs à cristaux liquides. De nombreux microscopes confocaux permettent aussi de faire une image par bande de longueurs d'onde.

• But du traitement d'images :

A partir de photographies numériques, le traitement extrait des données chiffrées, qui sont transférées à un tableur pour l'analyse statistique. On pourra mesurer une intensité de gris, par exemple sur un gel de migration sur un profil déterminé par l'utilisateur, mais il va souvent s'agir de dénombrer des « objets » ou de mesurer leurs propriétés : couleur, orientation, dimensions. Le problème principal sera d'identifier ces objets, que l'œil humain reconnaît en général, mais dont il faudra transmettre les caractéristiques à l'ordinateur. C'est la « segmentation », étape la plus délicate du traitement, qui consiste à transformer une image monochrome ou couleurs en image binaire.

• Exemple

La figure 1 donne un exemple des étapes pour une situation simple : il s'agit de dénombrer des noyaux marqués au DAPI (figure 2A). La première étape (figure 2B), le seuillage, produit une image binaire en comparant le niveau d'intensité de chaque pixel à un seuil. Cette valeur peut être fixée avec la souris ou le clavier par l'utilisateur, mais on préférera un calcul statistique. Le logiciel libre imageJ propose une dizaine de méthodes de calcul pour évaluer la valeur de seuil la plus probable en fonction de l'histogramme des niveaux de la totalité de l'image, selon l'hypothèse la plus appropriée au problème posé. L'étape

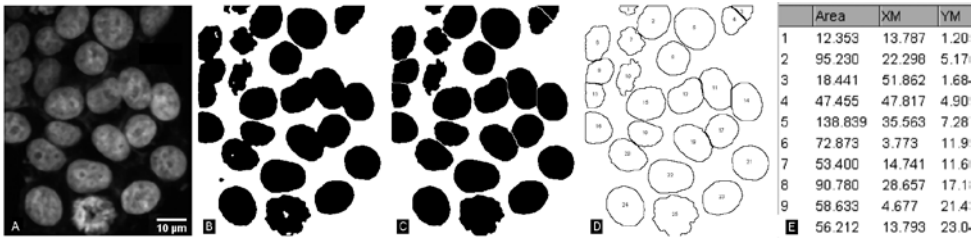


Figure 2 : Exemple de traitement d'images. **A** : image brute issue de microscopie confocale, **B** : Segmentation par seuillage, **C** : Suppression des objets trop petits et séparation des objets collés **D** : Mesure sur les objets, **E** : transfert vers une feuille de calcul.

suivante (figure 2C) consiste ici à préciser les paramètres requis pour les objets binaires : le logiciel identifie les objets, ils ne peuvent pas être trop petits, et leur forme est arrondie, ce qui permet d'en éliminer certains. Ensuite, le programme étiquette et calcule les mesures demandées, pour finalement transférer les résultats dans un tableur (figure 2D, E).

Dans beaucoup de situations, il sera nécessaire d'effectuer un traitement de l'image avant le seuillage pour faire ressortir les objets d'intérêt et atténuer les éléments de l'image qui n'apportent pas d'information utile, comme les poussières, les rayures, ou encore un éclairement inhomogène.

Opérations sur les images

• *Manipulation d'histogramme*

L'histogramme d'une image monochrome représente le nombre d'occurrences d'un niveau donné. L'œil humain distingue environ 50 niveaux d'intensité différents, beaucoup moins que le nombre de niveaux de l'image. Il est courant qu'une image de fluorescence apparaisse noire, faute de représentation adaptée (figure 3). Beaucoup de logiciels de visualisation proposent d'ajuster automatiquement une répartition des niveaux de l'image enregistrée entre le noir et le blanc de l'affichage (figure 3B).

• *Les opérateurs : généralités*

Pour modifier les images avant le seuillage, trois grandes familles de traitement peuvent être appliquées, avec des résultats parfois similaires. Les trois types d'opérateurs décrits dans la suite sont les opérateurs locaux, et les opérateurs globaux.

Les « opérateurs locaux » consistent à calculer une nouvelle image dont chaque point est obtenu par un calcul simple à

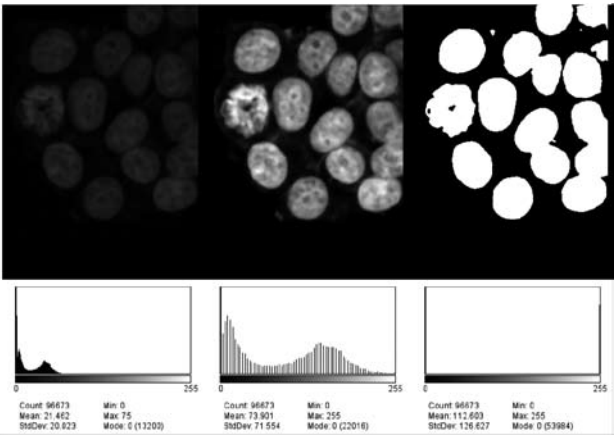


Figure 3 : Correction d'histogramme : **A**, image brute, **B**, image corrigée, **C**, image seuillée. Sous chaque image, son histogramme

partir du point correspondant dans l'image d'origine, et de ses voisins. Le voisinage d'un point est en pratique un tableau de dimension impaire, souvent 3x3 pixels, centré sur ce point. Certains des points de ce tableau peuvent être ignorés dans le calcul. On distinguera les opérations de morphologie mathématique, pour lesquelles les seuls calculs sont le maximum ou le maximum des intensités du voisinage et du point considéré, et les opérateurs de convolution, qui font une moyenne pondérée. On peut mentionner également un autre opérateur également basé sur le tri, le filtre médian, très utilisé, mais qui n'est pas intégré à la morphologie mathématique. Ce filtre a pour effet d'éliminer les valeurs extrêmes d'un pixel par rapport à ses voisins (blanc ou noir), et est nommé « antipoussière » dans les logiciels de photographie (figure 4).

Le principal opérateur global est la transformée de Fourier.

- ***Opérateurs de morphologie mathématique***

En morphologie mathématique (Serra, 1982), la zone de calcul porte le nom d'« élément structurant ». Les opérateurs utilisés sont basés sur le tri des pixels de l'image d'origine. L'opération consistant à choisir le minimum des points du voisinage s'appelle l'érosion. Sur une image en couleurs, le min s'applique respectivement à chacun des plans R, V et B (figure 5). Une érosion assombrit l'image et fait disparaître les zones claires isolées (figure 5B). L'opération opposée s'appelle une dilatation, et consiste à prendre le maximum. La dilatation fait disparaître les zones sombres isolées (figure 5F). L'application d'une dilatation après une érosion s'appelle une ouverture (figure 5C), et d'une érosion après une dilatation s'appelle fermeture (figure 5G). Ces opérations ont pour effet de restaurer une image de niveau moyen semblable à l'image d'origine.

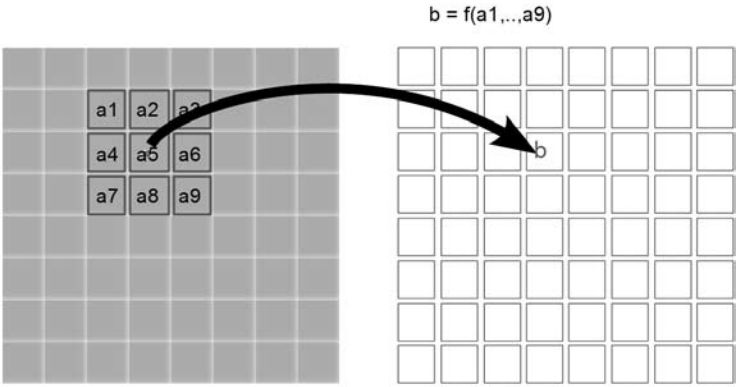


Figure 4 : Principe de calcul d'un opérateur local sur une zone de 3x3 pixels. La valeur d'un point (ici b) est calculée par la fonction f du point correspondant (ici a5) et des points voisins (a1 à a9). En morphologie mathématique, b est soit maximum, soit minimum. Pour une convolution, la fonction f est une moyenne pondérée des points a1..a9.

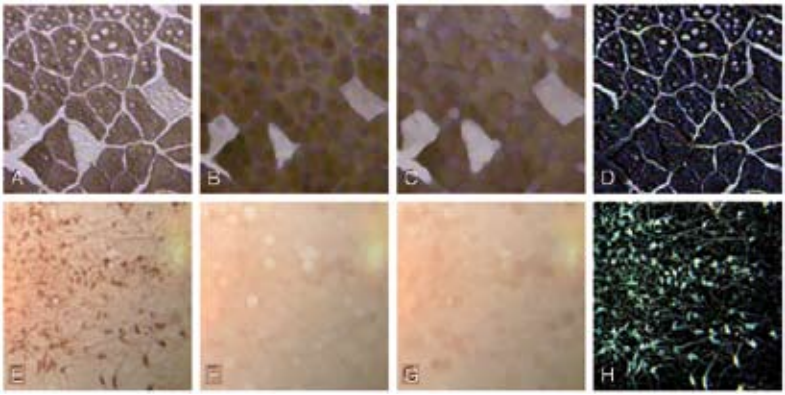


Figure 5 : Opérateurs de morphologie mathématique. **A**, image, marquage de neurones, **B**, dilatation, **C**, érosion de B ou « ouverture » de A, **D**, différence entre A et C, ou « chapeau haut de forme » de A (éclaircie).

On souligne des objets clairs par différence entre l'image d'origine et l'image ouverte (figure 5D), et les objets sombres par différence entre l'image fermée et l'image d'origine (figure 5H). Ce type d'opérations s'appelle un chapeau haut-de-forme.

Pour des images binaires, l'érosion et la dilatation prennent un sens particulier. L'exemple de la figure 6 illustre l'intérêt d'une ouverture de l'image binaire B, qui permet de séparer les deux objets.

• Opérateurs de convolution

Dans une convolution, chaque point de l'image résultat est calculé comme une moyenne pondérée des points correspondants dans l'image d'origine (figure 7). L'opérateur de convolution est défini par les coefficients de pondération.

- Lorsque tous les coefficients sont positifs, cette opération produit un lissage de l'image. Les filtres de lissage les plus courants peuvent être représentés par une matrice de convolution dont la représentation graphique est un cylindre (lissage uniforme) ou une courbe en cloche (filtrage gaussien, figure 7, A, B).
- Lorsque les coefficients portent des signes différents, le produit de convolution fait intervenir des différences entre des points voisins, et ce type de filtre est utilisé pour souligner les zones de contraste, par exemple les contours. Les représentations graphiques de ces filtres sont les chapeaux mexicains. Parmi les filtrages de ce type, on note le filtre laplacien (le filtre par défaut dans « Process / Filter / Convolve » dans imageJ), ou le filtre de Sobel (« find edges » dans imageJ, figure 7, C, D).

L'opération de convolution par calcul est semblable à celle que réalise un dispositif optique qui introduit un flou. L'objectif de microscope produit sur une image un

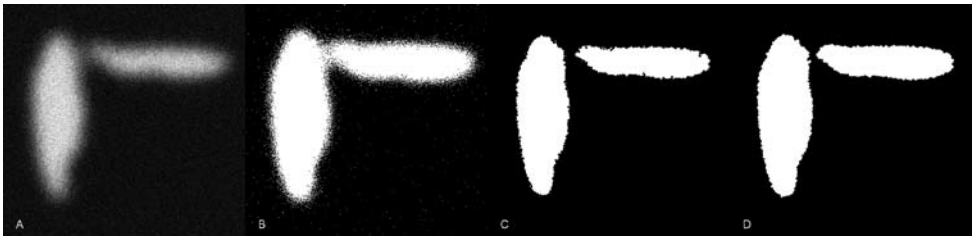


Figure 6 : Exemple de morphologie mathématique sur une image binaire. **A**, image, **B**, image binaire après seuillage, **C**, érosion, **D** dilatation (ouverture). L'ouverture a permis de séparer les deux objets.

tel flou (PSF pour point spread function), qui dépend principalement de son ouverture numérique.

Opérateurs basés sur la transformée de Fourier :

• *Principe de la transformée de Fourier*

Pour comprendre le principe de la transformation de Fourier, il faut imaginer une seule ligne d'image comme un signal que l'on peut transmettre à un amplificateur et écouter sur un haut-parleur, pour le reconnaître. Si on remplace ensuite le système par une chaîne composée de trois haut-parleurs, le son sera reconnu à l'identique. Le signal adressé à chacun des haut-parleurs est alors différent du signal d'origine, plus rapide pour le tweeter, plus lent pour le haut-parleur de basse. Leur combinaison par addition reconstitue le signal d'origine. On peut imaginer un grand nombre de haut-parleurs, chacun passant une étroite bande de fréquences. Le son obtenu en additionnant les signaux sera toujours le même. Si on dispose d'un nombre infini de haut-parleurs, chacun ne passe plus qu'une fréquence, le signal qui lui est envoyé est alors une fréquence pure, donc une fonction sinus, mais la somme de ces signaux reconstitue toujours le signal d'origine. On peut donc concevoir simplement qu'un signal quelconque puisse être décomposé en somme de sinus, et que la somme de ces fonctions reconstitue le signal d'origine. Chaque composante sinus est représentée par son amplitude et sa phase.

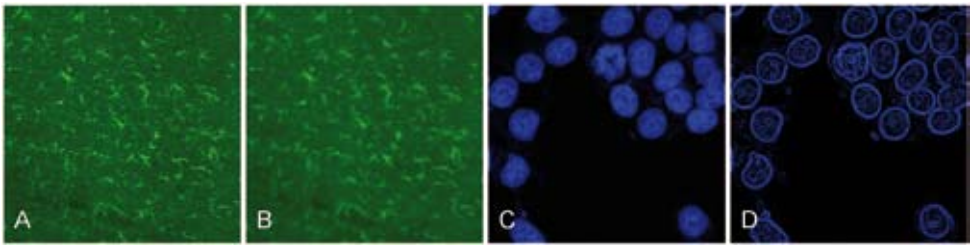


Figure 7 : Exemples de convolutions : **A**, image brute, **B** lissage de A par convolution, **C**, image brute, **D**, filtre de contour par convolution (filtre de Sobel).

La transformée de Fourier effectue une opération similaire par calcul, en décomposant toute fonction physique en un ensemble de fonctions sinus dont elle donne l'amplitude et la phase, et la somme de ces fonctions « recompose » le signal d'origine. Le calcul a été rendu possible en diminuant le nombre d'opérations par la méthode de la Fast Fourier Transform (Cooley, J.W. Tukey, 1965).

Cette transformation s'opère de manière similaire dans deux dimensions, pour une image. Sur une image, on peut se représenter chaque composante comme une image de type « tôle ondulée » dans une direction, et la décomposition prend en compte toutes les orientations. Un exemple d'utilisation est donné (figure 8) ; le fond d'éclairement n'est pas uniforme. Cette non uniformité représente une évolution lente dans l'espace, donc une composante de basse fréquence. Sa suppression permet d'homogénéiser le fond et d'augmenter le contraste. Dans imageJ, cette opération est facilitée : le filtrage FFT permet de définir les bandes de fréquences à conserver par la taille des objets qu'ils représentent. (process / FFT / Bandpass filter), on conserve les ondulations dont la taille est comprise entre 1 et 50 pixels, dans cet exemple, pour éliminer les autres.

Les filtres FFT peuvent donc être utilisés sans entrer dans le formalisme mathématique de la transformation de Fourier. Ils sont très utiles pour lisser une image (filtrage passe-bas, choix des objets de grande taille), pour faire ressortir des objets de petite taille (filtrage passe-haut, choix d'objets dans une gamme de taille réduite), ou comme dans l'exemple précédent, pour éliminer des inhomogénéités d'éclairement.

Les nouveaux outils disponibles

• *Déconvolution*

De nombreux programmes permettent d'améliorer la résolution de l'image en compensant le flou que produit le système

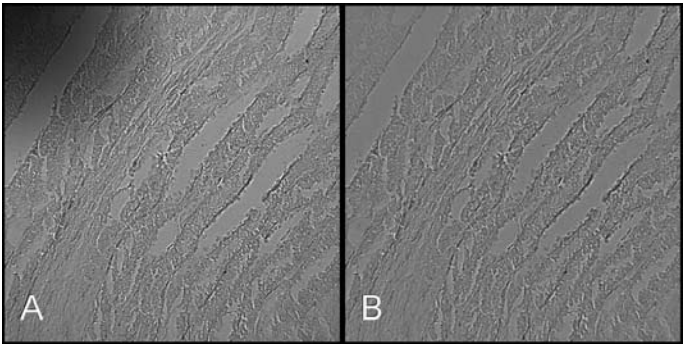


Figure 8 : Composantes de Fourier d'une image : A, horizontale, B, verticale, C, oblique. Le théorème de Fourier indique qu'une image est la somme de telles composantes à toutes les fréquences et dans toutes les directions. D, exemple d'image, E, image traitée par filtrage passehaut.

optique, la convolution par la PSF du système. Cette opération s'appelle la déconvolution. On montre que la déconvolution stricto sensu est impossible, mais on peut s'en approcher par différentes techniques mathématiques. Le mode de déconvolution le plus direct consiste à prendre en compte les propriétés de l'objectif utilisé pour se rapprocher d'une opération inverse de celle qu'il a produite. Ceci demande de faire une mesure de l'image d'objets ponctuels sur une lame identique. Avec un objectif à forte ouverture numérique, la PSF varie dans les trois dimensions et la déconvolution doit trouver un moyen d'en rendre compte (Maalouf, Colicchio, & Dieterlen, 2011). A l'intérieur de l'objet observé, la déformation de l'image n'est pas seulement due à l'objectif, mais aussi à la partie de la préparation traversée par le faisceau. Dans des préparations épaisses, on ne peut utiliser l'image de petits objets ponctuels et des techniques permettent d'estimer en parallèle la PSF et l'objet observé : la déconvolution aveugle (Soulez, Denis, Tourneur, & Thiébaut, 2012).

• ***Autres approches de traitement d'image***

De nouvelles méthodes de traitement ont été proposées.

- L'analyse d'image logarithmique permet de donner de l'importance aux zones sombres dans des images de transmission, dont la représentation numérique est faible et la contribution est diminuée par les convolutions, la morphomathématique et l'analyse de Fourier, alors que ce sont les objets les plus denses (Jourlin & Pinoli, 1988).
- Alors que l'analyse de Fourier traite globalement toute l'image, les techniques par ondelettes (Mallat, 1989) permettent des nombreux outils de filtrage et d'analyse par région de l'image.
- Enfin, les caractéristiques de l'image permettent de définir les propriétés statistiques locales et de déterminer les caractères pertinents par des méthodes d'apprentissage de classification (Wei, Flaschel, Friehs, & Nattkemper, 2008). On recherche à se rapprocher de la vision humaine et la reconnaissance de texture par exemple.

De nouvelles techniques de microscopie exploitent principalement les propriétés non-linéaires du phénomène de fluorescence pour atteindre une précision de dizaines de nanomètres en utilisant des principes de traitement d'image lors de l'acquisition (Betzig et al., 2006; Patterson, 2009; Toomre & Bewersdorf, 2010). Parmi elles, des technique permettent d'observer et d'analyser successivement les différentes sources fluorescentes d'une image (Bates, Huang, Dempsey, & Zhuang, 2007).

• ***Logiciels libres***

On doit à W. Rasband l'initiative du logiciel libre d'analyse d'images avec NIH Image sur Mac, puis, en 1997, imageJ, sur toutes plateformes (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012). Parmi les logiciels actuels, on trouve Fiji, une distribution d'imageJ refaite, disposant d'un éditeur évolué de macro-instructions, des outils 3D, et interfaces avec d'autres logiciels (Schindelin et al., 2012), et Icy, développé par l'Institut

Pasteur, qui dispose d'outils de base plus sophistiqués, comme la reconnaissance de texture (De Chaumont et al., 2012). Cell Profiler, et Cell Profiler Analyst permettent l'analyse à haut débit, le traitement s'effectuant comme en cytométrie de flux (Carpenter et al., 2006).

Ces nouveaux outils (et d'autres) ont en commun une démarche :

- les sources sont libres, ce qui permet de comprendre et éventuellement d'améliorer le programme.
- des sites de discussion permettent aux utilisateurs de discuter des améliorations et se partagent le travail
- des macro-instructions permettent d'enchaîner les opérations et de conserver la trace des traitements effectués.
- ils permettent d'écrire du code dans un langage public, comme C, C++, java, python.

De nombreux autres logiciels sont disponibles (Eliceiri et al., 2012). Des efforts sont faits pour créer des ponts entre ces différentes initiatives, et une conférence a réuni en avril 2012 les principaux acteurs à l'initiative du projet EuroBioImaging, en vue de coordonner leurs approches et les rendre compatibles.

Conclusion

La multiplication des images numériques oblige à un regard plus critique : l'image en tant qu'illustration doit maintenant être complétée par une analyse quantitative. Le traitement d'images est devenu une technique de laboratoire. Il repose principalement sur des techniques de calcul simples, mais reproduites un grand nombre de fois. Les logiciels de traitement de base sont en accès public, et font l'objet de nombreuses discussions sur des forums.

En France, l'organisation de la microscopie autour de plateformes en collaboration a permis une croissance rapide du savoir-faire, de projets de recherche multidisciplinaires, d'ateliers et d'écoles de formation spécialisés soutenus par le CNRS, et une importante contribution au développement de méthodes et logiciels d'imagerie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T., & Zhuang, X. (2007). Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science (New York, N.Y.), 317*(5845), 1749–53.

2. Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., et al. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.), 313*(5793), 1642–5.

3. Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., et al. (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome biology, 7*(10), R100.

4. Cooley, J.W. Tukey, J. W. (1965). An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Math. Comput.,* (19), 297–301.

5. De Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., et al. (2012). Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nature methods, 9*(7), 690–6.

6. Egner, A., & Hell, S. W. (2005). Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections. *Trends in cell biology, 15*(4), 207–15.

7. Eliceiri, K. W., Berthold, M. R., Goldberg, I. G., Ibáñez, L., Manjunath, B. S., Martone, M. E., Murphy, R. F., et al. (2012). Biological imaging software tools. *Nature methods, 9*(7), 697–710.

8. Jourlin, M., & Pinoli, J.-C. (1988). A model for logarithmic image processing. *Journal of Microscopy, 149*(1), 21–35.

9. Maalouf, E., Colicchio, B., & Dieterlen, A. (2011). Fluorescence microscopy three-dimensional depth variant point spread function interpolation using Zernike moments. *Journal of the Optical Society of America A, 28*(9), 1864.

10. Mallat, S. G. (1989). A Theory for Multiresolution Signal Decomposition : The Wavelet Representation. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 11*(7), 674–693.

11. Patterson, G. H. (2009). Fluorescence microscopy below the diffraction limit. *Seminars in cell & developmental biology, 20*(8), 886–93.

12. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods, 9*(7), 676–82.

13. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods, 9*(7), 671–5.

14. Serra, J. (1982). *Image analysis and mathematical morphology.* (English ve.). London ; New York: Academic Press.

15. Soulez, F., Denis, L., Tourneur, Y., & Thiébaut, E. (2012). Blind deconvolution of 3D data in wide field fluorescence microscopy. … *Imaging (ISBI), 2012 9th* …, (6).

16. Toomre, D., & Bewersdorf, J. (2010). A new wave of cellular imaging. *Annual review of cell and developmental biology,* 26, 285–314.

17. Watanabe, S., & Jorgensen, E. M. (2012). *Visualizing proteins in electron micrographs at nanometer resolution. Methods in cell biology* (Vol. 111, pp. 283–306). Elsevier.

18. Wei, N., Flaschel, E., Friehs, K., & Nattkemper, T. W. (2008). A machine vision system for automated non-invasive assessment of cell viability via dark field microscopy, wavelet feature selection and classification. *BMC bioinformatics,* 9, 449.

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 97 à 106

MISE EN EVIDENCE IMMUNOHISTOCHIMIQUE DES PROTÉINES DE JONCTIONS SERREES DANS LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DE SOURIS

Marion GAY et Anna BENCSIK*
*anna.bencsik@anses.fr

Unité Maladies Neurodégénératives (MND), Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES), 31 avenue Tony Garnier 69364 Lyon cedex 07

RESUME

Au sein du système nerveux central, la barrière hémato-encéphalique (BHE) participe au maintien de l'homéostasie cérébrale. C'est une interface dynamique dont les caractéristiques structurales et métaboliques sont le fruit d'une coopération entre cellules vasculaires (cellules endothéliales et péricytes) et nerveuses (cellules gliales et neurones). Etroitement régulée, elle peut cependant être altérée au cours de différents processus pathologiques, tels qu'au cours de méningites, d'accidents vasculaires cérébraux ou de tumeurs. Le dysfonctionnement peut alors entre autres se traduire par une altération de l'expression des protéines de jonctions serrées qui assurent physiquement la perméabilité restreinte propre à la BHE. Dans les études neurologiques expérimentales, la souris de laboratoire est au cœur de nombreuses modélisations, aussi il apparait primordial de mettre au point la visualisation de ces protéines de jonctions serrées dans le cerveau de souris en conditions normales saines. Nous présentons ici les conditions de détection immunohistochimiques de 5 protéines de jonctions serrées différentes, mises au point sur des coupes de cerveaux de souris fixés en paraffine.

INTRODUCTION

Au sein du système nerveux central (SNC), on distingue trois types de barrières physiologiques, la barrière hémato-liquidienne, arachnoïdienne et hémato-encéphalique. La barrière hémato-liquidienne sépare le sang du liquide céphalo-rachidien (LCR). Les propriétés de barrière sont portées par les cellules épithéliales choroïdiennes, liées entre elles par des jonctions serrées (JS) étanches et non pas par

les cellules endothéliales choroïdiennes fenêtrées et donc non liées entre elles par des JS qui juxtapose cet épithélium. Cette barrière est située au niveau des plexus choroïdes responsables de la synthèse de LCR et localisés dans les ventricules. La paroi de ces ventricules est bordée de cellules épendymaires liées entre elles au pôle apico-latéral par des jonctions serrées. On peut distinguer les organes circumventriculaires, présentant un épithélium fenêtré et dont les propriétés de barrière sont portées par les tanycytes, des cellules épendymaires spécialisées aux nombreuses microvillosités permettant d'augmenter la surface d'échange avec le LCR. En dehors des organes circumventriculaires, les cellules épendymaires présentent de nombreux cils. Les méninges constituent la barrière arachnoïdienne. Elles sont composées, de l'extérieur vers l'intérieur, de la dure mère, l'arachnoïde, l'espace sous arachnoïdien (dans lequel se trouve le LCR) et la pie mère. Les vaisseaux sanguins de la dure mère sont caractérisés par des espaces extracellulaires multiples et peu de contacts intercellulaires impliquant un manque de cohésion structurelle dans cette couche. A l'inverse, les cellules extérieures à l'arachnoïde possèdent de nombreuses JS sans espace extracellulaire significatif. Cette couche cellulaire est de ce fait considérée comme une barrière morphologique et fonctionnelle efficace entre le sang situé dans la dure mère et le LCR de l'espace sous-arachnoïdien (Correale et Villa, 2009).

Le concept de barrière entre le sang et le cerveau apparaît pour la première fois en 1885 et le terme de barrière hémato-encéphalique (BHE) est employé dès 1922. Sa localisation fut établie au niveau des capillaires lorsque les jonctions serrées ont été observées par microscopie électronique entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Vorbrodt & Dobrogowska, 2003). Aujourd'hui la BHE est reconnue comme une interface dynamique, dont les caractéristiques structurales et métaboliques sont le fruit d'une coopération entre cellules vasculaires (cellules endothéliales

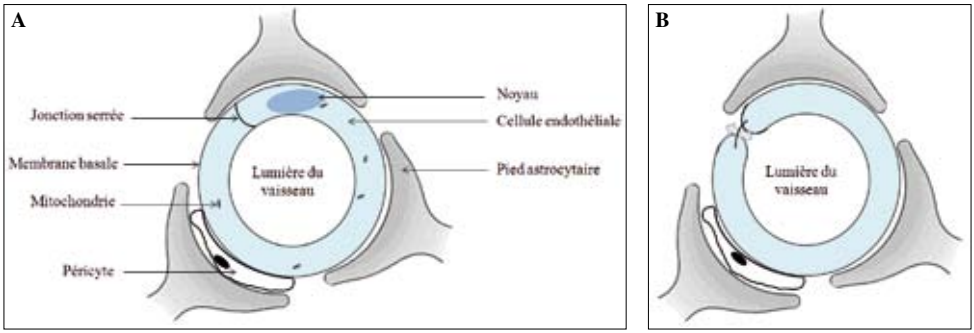


Figure 1 : Représentation schématique d'un capillaire de la barrière hémato-encéphalique (BHE) en coupe transversale. **A.** en condition normale, **B.** en condition pathologique illustrant la rupture de la barrière et le passage de molécules entre le sang et le parenchyme cérébral.

et péricytes) et nerveuses (cellules gliales et neurones). Cette coopération cellulaire est appelée unité neurovasculaire (UNV) (Figure 1) (Hawkins & Davis, 2005).

Une couche de cellules endothéliales forme les microvaisseaux sanguins cérébraux (CMV) acheminant le sang au cerveau. Ces cellules présentent des caractéristiques structurales et métaboliques différentes des cellules endothéliales de la circulation périphérique car elles sont composées d'un grand nombre de jonctions serrées (JS) et de mitochondries. Ces caractéristiques permettent aux cellules endothéliales des capillaires de bloquer le passage de toute macromolécule neurotoxique. Les cellules endothéliales présentent un grand nombre de récepteurs et transporteurs sélectifs pour les acides aminés, les protéines, les peptides et le glucose afin de maintenir l'homéostasie cérébrale (Pardridge, 1983). L'espace paracellulaire des cellules endothéliales est caractérisé par la présence de JS et de jonctions adhérentes qui lient les cellules ensemble. Les techniques immunohistochimiques ont permis, depuis les années 80, d'élucider la nature moléculaire des protéines de JS. Ce sont des complexes de protéines situées près de la surface luminale des CMV. Elles sont responsables de la faible perméabilité de la BHE. Les protéines qui les composent sont ordonnées en différentes classes en fonction de leur structure. Il y a les protéines transmembranaires comprenant les claudines, l'occludine et des membres de la famille des immunoglobulines. En parallèle, il y a les protéines intracellulaires incluant les protéines de la famille des zonula occludens (ZO) associées aux protéines transmembranaires (Figure 2) (Perdisky et al., 2006).

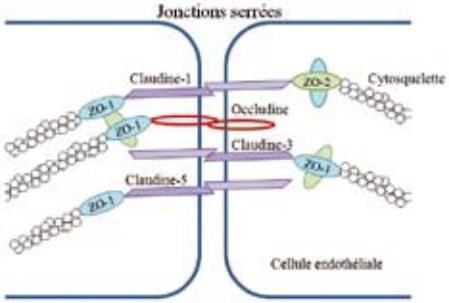


Figure 2 : Représentation schématique des interactions moléculaires entre deux cellules endothéliales caractérisées par des jonctions serrées.

Les données actuelles suggèrent l'implication d'altérations de la BHE dans de nombreuses maladies neurologiques, notamment les tumeurs, les accidents vasculaires cérébraux, la sclérose en plaque, les méningites et les encéphalites (Perdisky et al., 2006, Koto et al., 2007). Dans la mesure où l'expression des protéines de jonctions serrées, claudines, occludines et zona occludens, peut être directement incriminée dans cette perte de l'efficacité des barrières entre le sang, le LCR et le tissu cérébral, il est possible de mettre en évidence ces altérations *in situ* par immunohistochimie. Dans les études neurologiques expérimentales, la souris de laboratoire est au cœur de nombreuses modélisations, ainsi l'objectif de cette étude est d'établir la cartographie de l'expression normale de ces protéines de JS sur des coupes de cerveaux de souris fixés en paraffine. A cette fin, cet article expose les conditions de détection immunohistochimique optimales mises au

point pour 5 protéines de jonctions serrées différentes : les claudines-1, -3 et -5, l'occludine et la zonula occludens-1 (ZO-1).

MATERIEL ET METHODES

Tissu cérébral

Les études sont focalisées sur des cerveaux de souris saines jeunes (6 semaines d'âge). Deux lignées ont été utilisées : une lignée sauvage, la C57Bl/6 et une lignée transgénique utilisée comme modèle d'étude de processus neurodégénératifs, la TgM83 (lignée transgénique exprimant l'α-synucléine humaine mutée en A53T) (Crozet et al., 2001). Une fois prélevés, les cerveaux sont fixés dans une solution tamponnée de formol à 10% pendant 48 heures. Une recoupe macroscopique réalisée à l'aide d'un moule en acrylique permet de standardiser les coupes dans la frontalité et la symétrie comme d'accéder aux principaux sites neuroanatomiques du cerveau. Ces recoupes macroscopiques sont inclues en paraffine selon un protocole standard d'inclusion. A partir des blocs de paraffine, des coupes de 6 µm sont ensuite réalisées et collectées sur des lames traitées (X-tra slides, *Leica*). Placées dans une étuve à 37°C, elles sèchent en attendant d'être utilisées pour l'analyse immunohistochimique.

Immunohistochimie des protéines de jonctions serrées

Les anticorps utilisés dans cette étude sont regroupés dans le tableau 1. Après réception, ils sont conservés sous forme d'aliquotes à - 20°C. Le premier objectif de l'étude a été de déterminer les conditions optimales de détection par immunohistochimie faisant appel à une révélation d'une activité peroxydase. La mise au point a pris en compte différentes méthodes de démasquage antigénique : l'autoclavage (121°C pendant 20 min) (*Prestige medical, AES Lab*), un traitement aux micro-ondes (5 min à puissance maximale puis 5 min en décongélation) combiné à une digestion à la protéinase K (PK) (*Roche diagnostic*) (20 µg/ml) ou enfin une digestion

Ac I	Ref. catalogue	Spécificité	Concentrations (µg/mL)	Ac II anti-lapin
anti-claudine-1	51-9000	homme rat poulet	10, 8, 5, 3, 2, 1	Biotinylé 1/200ème
anti-claudine-3	34-1700	homme souris poulet		
anti-claudine-5	34-1600	souris		
anti-ZO-1	61-7300	homme souris rat poulet		
anti-occludine	71-1500	homme poulet rat souris		

Tableau 1 : Liste des 5 anticorps polyclonaux produits chez le lapin (*Invitrogen*) reconnaissant différentes protéines de jonctions serrées utilisés dans cette étude avec les concentrations testées.

à la PK seule (10 minutes). Puis, différentes concentrations d'anticorps primaire (Ac I) ont été testées 10, 8, 5, 3, 2 et 1 µg/ml (tableau 1) afin de déterminer la concentration optimale à appliquer.

Le protocole débute par le blocage des peroxydases endogènes à l'aide d'une solution d'eau oxygénée (0,3%) (*Merck*). Puis les sites non spécifiques sont saturés avant de déposer l'Ac I dilué dans du tampon phosphate 0.1M, $NaCl_2$ 9g/1000, pH 7,4 et Triton (0,1 %) sur la nuit. Après rinçage, l'Ac II anti-lapin biotinylé est ajouté (1/200ème). Puis, avant de passer aux étapes de révélation, le complexe avidine-biotine couplé à la peroxydase (*Kit ABC Elite-Vector*) est appliqué une demi-heure afin d'obtenir une amplification du signal. Pour la révélation, deux substrats chromogènes de la HRP ont été utilisés dans le but de comparer les intensités des marquages et permettre d'envisager un double marquage des lames par la suite. La diaminobenzidine (DAB) intensifiée par l'ajout de chlorure de nickel (*kit Vector Laboratories*) qui génère des dépôts noirâtres offre un excellent contraste et le 3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) (*kit Vector Laboratories*) produit des précipités de couleur rouge. La révélation est stoppée en plongeant les lames dans un bain d'eau ultra pure. Enfin les lames sont colorées à l'hématoxyline aqueuse.

Analyse de l'expression normale des protéines de jonctions serrées

L'observation et l'analyse des résultats s'effectuent grâce à un microscope (*Olympus BX51*) couplé à une station d'analyse d'images (*logiciels Morpho Expert et Mosaic, Explora Nova*). Les marquages sont plus particulièrement observés sur 4 zones du cerveau : les cellules endothéliales des méninges, les vaisseaux du parenchyme cérébral, les cellules épendymaires qui bordent les ventricules et les cellules endothéliales et épithéliales des plexus choroïdes. L'intensité des marquages obtenus est évaluée à l'aide d'une échelle de score allant de 0 à 3 établie en comparant les niveaux de marquages obtenus comme illustré en figure 3.

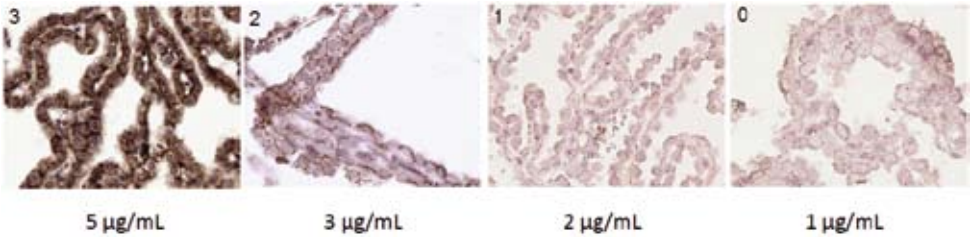


Figure 3 : Illustration de l'échelle d'intensité des marquages utilisée dans la détermination du choix de la concentration optimale d'Ac I. Exemple de l'effet de la concentration sur la détection de la claudine-3 dans les plexus choroïdes.

	Vx parenchyme			Méninges			Plexus choroïdes (endo)			Plexus choroïdes (epith)			Cellules épendymaires		
	A	M/PK	PK	A	M/PK	PK	A	M/PK	PK	A	M/PK	PK	A	M/PK	PK
Claudine-1	0	0	0	1	2	1	0	0	0	3	3	0	0	1	1
Claudine-3	0	3	2	1	3	1	0	0	0	1	3	0	1	0	0
Claudine-5	0	3	3	1	3	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Occludine	0	2	1	2	2	2	0	0	0	1	1	1	2	2	2
ZO-1	0	2	2	2	2	3	2	1	1	2	1	1	2	2	1

Légende

0	Absence de marquage
1	Faible marquage
2	Bon marquage
3	Fort marquage

Tableau 2 : Tests de démasquage des protéines et résultats sur l'intensité des marquages. A : autoclave ; M : micro-ondes ; PK : protéinase K.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'approche immunohistochimique pour étudier l'expression des protéines de jonctions serrées dans le cerveau de souris fixés et inclus en paraffine offre un grand potentiel dans les études de l'intégrité de la BHE. Elle nécessite au préalable de déterminer les conditions optimales d'application. Au cours de cette étude, plusieurs conditions de démasquage antigénique ont été testées et le tableau 2 synthétise les résultats observés. La séquence de démasquage la plus efficace retenue est celle qui offre la meilleure intensité de détection. Pour l'ensemble des 5 anticorps anti protéines de JS, l'association micro-ondes/PK apparait la plus adaptée. Elle a ensuite été systématiquement appliquée dans la deuxième phase dont le but était de déterminer les concentrations optimales. Le tableau 3 résume les résultats d'application de diverses concentrations d'anticorps primaires. La concentration optimale a pu être ainsi définie pour la détection de chaque protéine de JS. Elle est de 5 µg/ml pour les claudines-1 et -3, et de 8 µg/ml pour la claudine-5, l'occludine et la ZO-1.

Enfin l'usage comparé des substrats de la HRP révèle que la DAB intensifiée au chlorure de nickel comme l'AEC sont des chromogènes tout aussi efficaces l'un que l'autre, comme l'illustre la figure 4. Cependant dans la routine et pour l'établissement d'une expression basale des protéines de jonctions serrées dans le cerveau de souris saine, l'usage de la DAB-$NiCl_2$ est privilégiée.

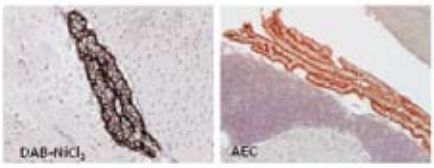


Figure 4 : Comparaison de la révélation de la claudine-1 dans les plexus choroïdes par 2 chromogènes, la DAB-$NiCl_2$ (noir) et l'AEC (rouge).

	Vx parenchyme						Méninges						Plexus choroïdes (endo)						Plexus choroïdes (epith)						Cellules épendymaires					
Concentrations en µg/mL	10	8	5	3	2	1	10	8	5	3	2	1	10	8	5	3	2	1	10	8	5	3	2	1	10	8	5	3	2	1
Claudine-1			0	0	0	0			2	0	1	1			0	0	0	0			3	3	3	2			2	0	1	0
Claudine-3			3	3	2	1			3	2	2	1			0	0	0	0			3	2	1	0			0	0	0	0
Claudine-5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	0	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Occludine			2	2	1	0			2	1	1	0			0	0	0	0			1	1	0	1			2	0	0	0
ZO-1	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	0	1	2	2	1	0	0	0	3	2	1	0	0	0	3	3	2	0	0	0

Tableau 3 : Définition de la concentration optimale en Ac I (révélation DAB), évaluée après application d'un démasquage antigénique reposant sur la combinaison micro-ondes/PK; l'intensité des marquages est indiquée selon le principe de la légende donnée pour le tableau 2.

Sur la base de ces mises au point et en parallèle des souris de la lignée C57Bl/6, il a été possible d'étudier l'expression de ces protéines de JS dans une lignée de souris transgénique utilisée au laboratoire dans l'exploration de processus neurodégénératifs. De la sorte, un référentiel a pu être constitué sous la forme pratique de tableaux récapitulatifs ainsi que d'illustrations caractéristiques à partir de cerveaux de souris saines. Le tableau 4 et la figure 5 résument les marquages typiques observés chez les sujets jeunes sains (2 mois) de la lignée transgénique qui sont tout à fait semblables à ceux de la souris C57Bl/6 jeune et saine. Cette similitude des référentiels obtenus pour la lignée sauvage C57Bl/6 et la lignée transgénique TgM83 suggère une constance dans l'expression de ces protéines de JS au sein de lignées murines différentes dans des conditions saines. Ainsi, les bases sont posées pour étudier les conséquences sur l'expression des protéines de JS au cours de processus neurodégénératifs qui caractérisent ce modèle par une mise en place progressive au cours du temps.

Clairement il apparait que les diverses protéines de JS ont une expression spécifique suivant certains compartiments cellulaires et tissulaires. Ainsi à titre d'exemple, la claudine-5 n'est jamais exprimée dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes. Une difficulté apparait avec le compartiment des cellules épendymaires qui

Figure 5 : Illustration de l'expression des protéines de JS dans le cerveau de souris en conditions normales. Révélation DAB-$NiCl_2$.

	Vx parenchyme	Méninges	Plexus choroïdes (endo)	Plexus choroïdes (epith)	Cellules épendymaires
Claudine-1	0	1	0	3	1
Claudine-3	2	2	0	2	2
Claudine-5	3	3	1	0	0
Occludine	2	3	0	3	3
ZO-1	3	3	1	2	3

Tableau 4 : Récapitulatif de l'expression des protéines de JS dans le SNC de souris (TgM83 semblable à C57Bl/6) en conditions saines (micro-ondes/PK et concentration optimale de 5 µg/mL pour les claudines-1 et -3, et de 8 µg/mL pour la claudine-5, l'occludine et la ZO-1). L'échelle d'intensité définie dans le tableau 2 est utilisée.

bordent les ventricules contenant le liquide céphalo-rachidien. Dans les tableaux sont reportés uniquement les observations faites au niveau des cellules épendymaires situées au niveau des ventricules latéraux, mais des marquages différents ont pu être observés dans d'autres régions épendymaires. En effet, selon la région ventriculaire considérée certaines de ces cellules épendymaires ont des fonctions spécialisées, et leurs expressions de protéines de JS sont différentes. Elles témoignent du fait que toutes les bordures ventriculaires ne sont pas physiologiquement et fonctionnellement identiques. Afin d'assurer leur rôle respectif, il semble que les protéines de JS exprimées dans les cellules épendymaires puissent en partie assurer cette spécificité (Mullier et al., 2010). Une perspective immédiate de ce travail pourrait être de s'attacher à décrire plus précisément les expressions spécifiques de ces régions.

Dans tous les cas, ce travail apparait dès à présent très utile dans une démarche plus globale d'évaluation de l'intégrité de ces barrières qui devra être complétée par une approche quantitative (par des approches biochimiques) comme par des études de perméabilité.

CONCLUSION

La BHE est une barrière physique qui filtre et contrôle le passage des substances sanguines et les empêche de passer librement du sang vers le parenchyme cérébral. Elle isole ainsi le SNC du reste de l'organisme et lui permet d'avoir un milieu spécifique, différent du milieu du reste de l'organisme. Ce mécanisme protège le SNC contre l'intrusion de composés potentiellement nocifs présents dans le sang. Une BHE fonctionnant mal permet l'entrée dans le SNC de molécules hydrophiles

qui normalement en seraient exclues. La thématique de recherche la plus récente du laboratoire fait appel à des modèles expérimentaux permettant d'évaluer le rôle des substances chimiques neurotoxiques, dans les maladies neurodégénératives humaines. Dans ce contexte d'étude des maladies neurodégénératives, il est possible que les propriétés constitutives de la barrière hémato-encéphalique (BHE) soient altérées. Pour le mettre en évidence dans nos modèles de souris sauvages et transgéniques, nous avons mis en place une détection *in situ* par immunohistochimie des différentes protéines associées aux jonctions serrés (JS), constitutives de cette BHE. Le premier objectif de ce travail a été de définir les conditions optimales de détection des protéines de JS à l'aide de cinq anticorps différents. Nous avons pu établir qu'un démasquage antigénique basé sur un double traitement thermique et enzymatique était le plus adapté. Les concentrations optimales ont pu être établies pour chacun des anticorps. Ainsi il est maintenant possible d'appliquer cette approche dans diverses conditions pathologiques. Des résultats préliminaires collectés sur des cerveaux infectés, lésés soulignent la nécessité de faire un examen exhaustif de toutes les protéines de jonctions serrées en prenant en compte les différents compartiments constitutifs des barrières physiologiques du SNC.

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement Jean-Michel Bridon et Mikaël Leboidre, techniciens du secteur histologie prion (P3) de l'Unité Maladies Neurodégénératives pour leur implication dans le développement de ces travaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. CORREALE J. & VILLA A. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochem res* 2009; 34:2067-2077

2. CROZET C., FLAMANT F., BENCSIK A., AUBERT D., SAMARUT J., BARON T. (2001) Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol* 75: 5328-5334.

3. VORBRODT A.W. & DOBROGOWSKA D.H. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res Rev.* 2003;42:221–242.

4. HAWKINS B.T. & DAVIS T.P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57:173–185.

5. PARDRIDGE W.M. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev.* 1983;63:1481–1535.
6. PERSIDSKY Y., RAMIREZ S.H., HAORAH J., KANMOGNE G.D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions, *J Neuro immune Pharmacol* 2006; 1: 223-236.

7. KOTO T., TAKUBO K., ISHIDA S., SHINODA H., INOUE M., TSUBOTA K., OKADA Y., IKEDA E. Hypoxia disrupts the barrier function of neural blood vessels through changes in the expression of claudin-5 in endothelial cells. *Am J Pathol.* 2007;170:1389–1397.

8. MULLIER A., BOURET S.G., PREVOT V., DEHOUCK B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 2010;518:943-62.

Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1, p. 107 à 117

MESURES DYNAMIQUES DES VARIATIONS DE CALCIUM INTRACELLULAIRE

Sabine Lotteau, Sylvie Ducreux et Fabien Van Coppenolle
INSERM U1060-CarMeN-"Equipe 5",
8 Avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 08, France.
Tel. (33) 4 72 43 10 94 - Fax (33) 4 72 44 79 37
E-mail : Fabien.Van-Coppenolle@univ-lyon1.fr

RESUME

Le calcium est un second messager ubiquitaire impliqué dans de nombreux processus physiologiques comme l'exocytose, la contraction musculaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose. A ce titre, la concentration en calcium est finement régulée par la cellule. De manière générale, la concentration calcique est de l'ordre de 1mM dans le milieu extracellulaire et dans le réticulum endoplasmique et oscille de 20 nM à plus de 1µM dans le cytoplasme. L'homéostasie est par définition l'équilibre entre les entrées (influx) et les sorties (efflux) de calcium. L'homéostasie calcique est donc directement responsable du maintien de la possibilité, pour cet ion, de jouer le rôle de second messager.

Afin d'appréhender le rôle du calcium dans la physiologie de la cellule, il est nécessaire d'utiliser des techniques d'imagerie permettant de suivre, dans le temps et dans l'espace, le flux de calcium intracellulaire. L'imagerie calcique est indissociable de l'emploi de sondes calciques qui émettent des photons (par chémoluminescence ou par fluorescence) en se liant au calcium. Le matériel d'imagerie est utilisé pour mesurer et enregistrer ces variations d'intensité de lumière qui sont ainsi liées aux modifications de concentrations calciques intracellulaires. Le choix des sondes calciques doit prendre en compte la sensibilité de ces dernières vis-à-vis du calcium (affinité) ainsi que l'échelle des variations de calcium à mesurer. Par exemple, le fluo3, avec un Kd de 390nM peut détecter des concentrations calciques allant de 100nM à 3µM. Le Mag-Fura5, par contre, avec un Kd de 28µM, sera mieux adapté à des mesures de concentrations calciques beaucoup plus importantes comme celles rencontrées dans les mitochondries ou le réticulum endoplasmique. Il est à noter que le Kd dépend de paramètres physicochimiques de l'environnement de la sonde tels

que le pH, la force ionique, la viscosité et la température.

La vidéomicroscopie permet ainsi de suivre, par imagerie de fluorescence, les variations de concentrations en calcium intracellulaire après avoir chargé les cellules ou les tissus en sondes. Plus résolutive, la microscopie confocale offre une meilleure résolution spatiale, afin d'étudier notamment les échanges de calcium entre les organites intracellulaires.

INTRODUCTION

Le rôle majeur du calcium dans la physiologie cellulaire a été mis en évidence pour la première fois par Sydney Ringer en 1883 sur une préparation cardiaque (1). En 1957, l'emploi de $^{45}Ca^{2+}$ permit à Hodgkin de mesurer les mouvements de calcium dans l'axone géant de calmar (3). L'arrivée de sondes calciques fluorescentes au cours des années 80 a ouvert les portes de l'imagerie calcique en permettant d'observer le calcium libre intracellulaire (3). Chaque jour, de nouvelles publications scientifiques illustrent et détaillent le rôle majeur du calcium dans la physiologie cellulaire. La concentration en calcium dans la cellule est finement régulée et contrôle de nombreuses fonctions cellulaires (Figure 1). Des perturbations de cette dernière se rencontrent dans de nombreuses pathologies comme le cancer (4), les pathologies cardiovasculaires (5), les maladies neurodégénératives (6) et le diabète (7).

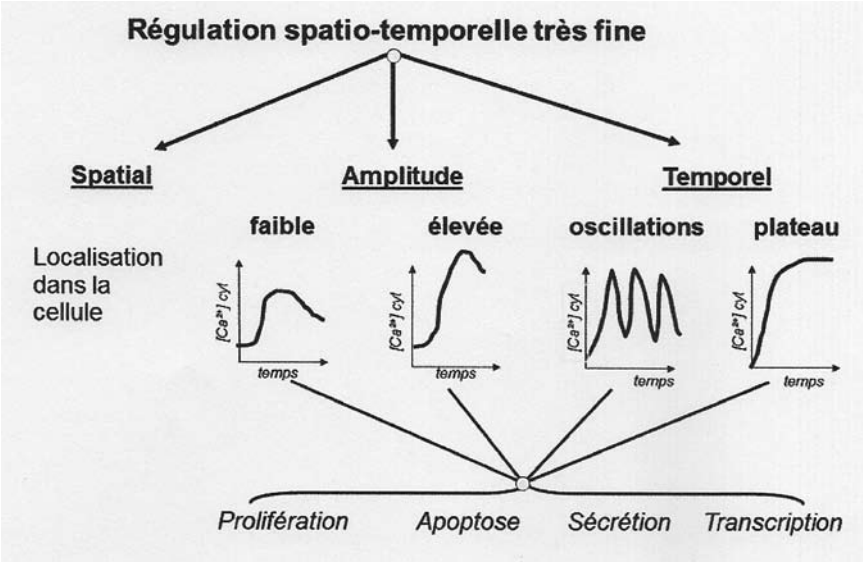


Figure 1 : le calcium est un second messager ubiquitaire. L'homéostasie calcique est finement régulée en amplitude, dans le temps et dans l'espace et contrôle un grand nombre des phénomènes cellulaires. Exemple de variations de concentration calcique ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) en fonction du temps.

LES SONDES CALCIQUES

Qu'est-ce qu'une sonde calcique ?

Une sonde calcique est employée pour mesurer des variations dynamiques de calcium au sein de cellules vivantes. Cette molécule se compose d'une partie qui fixe le calcium de manière spécifique (un ou plusieurs ions). Le chromophore, lié ou non à la sonde, émet des photons en réponse à la fixation du calcium sur la sonde.

Il existe deux grandes familles de sondes calciques :

- Les sondes organiques (Fura-2 ; Fluo-4, …) ;
- Les sondes protéiques :
  - Adressables (certaines sondes type Caméléon, …) ;
  - Bioluminescentes (aequorine, …)

Une sonde calcique pour quel compartiment ?

La concentration en calcium libre varie en fonction de sa localisation intracellulaire. En effet, la concentration calcique cytosolique est, au repos, de l'ordre de 20 à 100 nM et peut augmenter jusqu'à 2 µM suite à une stimulation. Le réticulum endoplasmique (RE) ou sarcoplasmique (SR) est la source principale de calcium intracellulaire. Sa concentration en calcium luminal est de l'ordre de 200 à 500 µM. Les mitochondries jouent également un rôle clé dans les échanges calciques au sein de la cellule. La concentration en calcium mitochondrial évolue de 100 nM au repos jusqu'à 300 µM après augmentation de la concentration en calcium cytosolique et/ou de la libération de calcium par le RE.

Ainsi, le choix d'une sonde calcique dépendra tout d'abord de son affinité vis-à-vis du calcium.

Notion de constante d'affinité.

La constante d'affinité (Kd) d'une sonde calcique correspond à la concentration de calcium à laquelle cette dernière émet 50% de sa fluorescence maximale pour une sonde de stœchiométrie 1/1 (Un ion calcium fixé par molécule de sonde).

De ce fait, une sonde qui possède un Kd faible (ex : Fluo-3 : Kd=390 nM) détectera des concentrations en calcium de 100 nM à 2 µM. Ces variations se rencontrent au sein du cytoplasme des cellules. Le Mag-Fura-2 par contre, possède un Kd plus élevé (Kd=28 µM) compatible avec des mesures de concentrations calciques beaucoup plus importantes comme dans le RE/RS (tableau 1).

Les sondes fluorescentes organiques.

Ces sondes ont été fabriquées pour la première fois par l'équipe de Tsien dans les années 80 (3). Elles résultent de l'association entre un chélateur calcique (type EGTA ou BAPTA) et un fluorophore.

Sondes ratiométriques.

Il existe des sondes calciques dites « ratiométriques ». Elles possèdent soit deux pics d'excitation et un pic d'émission

Sonde calcique	λexc (nm)	λem (nm)	Kd (nM)	Compartiment cellulaire
Calcium Green-1	488	535/615	190	Cytosol
Fura-2	340/380	510	145	
Fura Red	420/480	660	140	
Fluo-3	488	525	390	
Indo-1	355	405/485	230	
Mag-fluo-4	488	520	22000	Réticulum
Mag-fura-2	340/380	510	25000	
Rhod-2	552	580	570	Mitochondrie
Rhod-FF	552	580	19000	

Tableau 1 : exemple non exhaustif de sondes calciques et de leurs caractéristiques choisies pour leur utilisation dans différents compartiments cellulaires. Les valeurs de Kd ont été obtenues *in vitro*. Source : Molecular Probes®.

(ex : Fura-2) ou un pic d'excitation et deux pics d'émission (ex : Indo-1).

Dans le cas du Fura-2, les pics d'excitation sont 340nm (pour le Fura-2 lié au calcium) et 380nm (pour le Fura-2 libre, c'est-à-dire non lié au calcium). En effet, la fixation du calcium sur le Fura-2 provoque un décalage du pic d'excitation de 380 nm vers 340 nm. Le pic d'émission est 510nm. En fonction de la concentration en calcium dans l'environnement du Fura-2, une proportion de cette sonde est liée au calcium, le reste est donc « libre ». Ainsi, en réponse à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, la fluorescence émise à 510 nm après stimulation à 340 nm (notée F340) augmente. A l'inverse, la fluorescence émise à 510 nm après stimulation à 380 nm (notée F380) diminue de manière antiparallèle. Le rapport F340/F380 permet de calculer, après calibration, la concentration en calcium cytosolique. Pour cela, l'équation de Grynkiewicz (ci-dessous) est employée (8).

$$[Ca^{2+}]_{cyt} = Kd.ß.\ (R-Rmin)/(Rmax-R)$$

Kd : constante de dissociation ; ß : F380 bas Ca^{2+}/F380 haut Ca^{2+} ; R : F340/F380 ; Rmin : F340/F380 dans un milieu dépourvu de calcium (0 Ca^{2+} +EGTA) ; Rmax : F340/F380 dans un milieu saturé en calcium (10 mM Ca^{2+}).

L'emploi de la sonde Indo-1 nécessite également l'emploi d'un rapport de fluorescence. Cependant, l'excitation, unique, se fait à 355 nm. L'émission, double, est enregistrée à 405 nm (F405) et à 485 nm (F485).

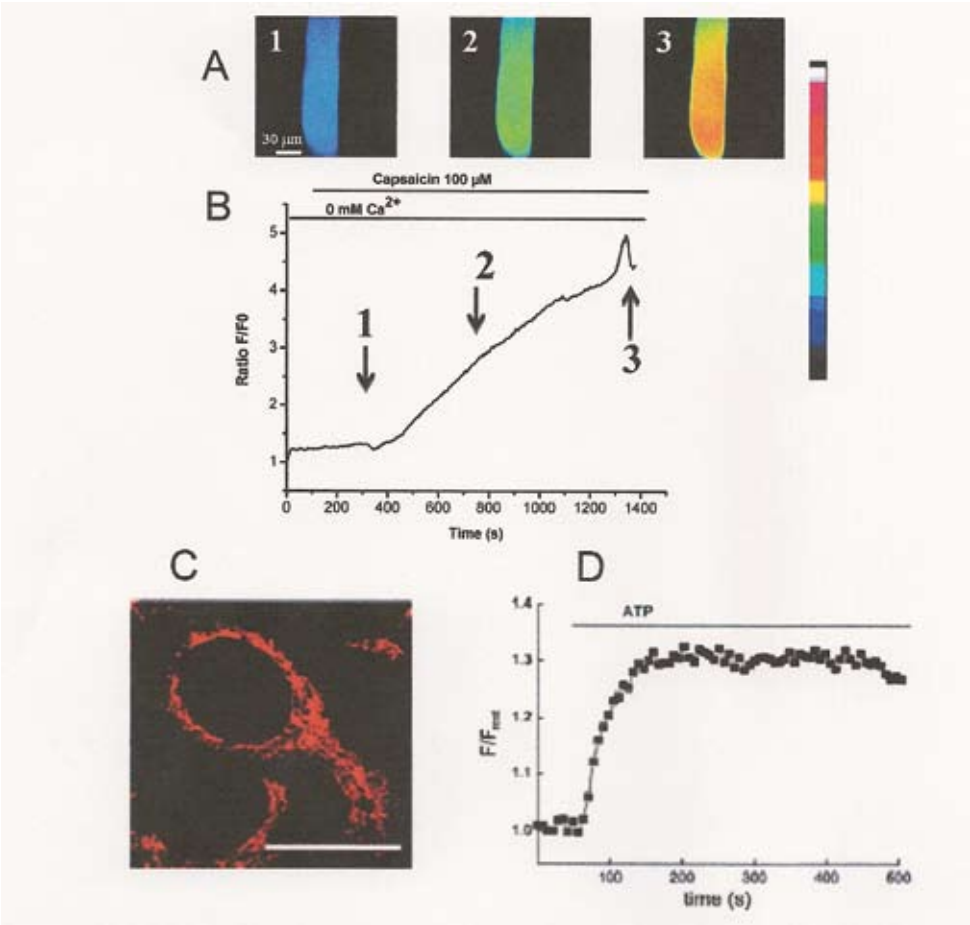


Figure 2 : exemple de mesures de l'évolution, dans le temps, des concentrations calciques dans le cytoplasme et la mitochondrie. **A et B** : expérimentation réalisée sur une cellule musculaire squelettique adulte de souris (9). A- (1, 2 et 3) images en fausses couleurs en microscopie confocale prises lors de l'enregistrement. Barre : 30 µm. B- le Fluo-4 permet de suivre, de manière qualitative l'évolution de la concentration calcique cytosolique en microscopie confocale sur une cellule vivante. La cellule a été perfusée avec de la capsaicine (un dérivé du piment) qui provoque une libération de calcium du RS vers le cytoplasme. Le milieu externe ne contient pas de calcium afin de s'affranchir de toute entrée membranaire éventuelle. Le ratio F/F0 illustre l'évolution de la fluorescence F de la cellule, acquise au cours du temps, divisée par la fluorescence initiale F0. **C et D** : mesures qualitatives de l'évolution de la concentration calcique mitochondriale suite à la perfusion d'ATP (Adénosine tri-phosphate ; 100 µM) sur des cellules LNCaP (lignée cellulaire cancéreuse prostatique humaine (10). C- Image en fausse couleur, en microscopie confocale, du marquage des mitochondries par la sonde calcique Rhod-2. Barre : 20 µm. D- la perfusion d'ATP produit une augmentation de la concentration en calcium mitochondrial dans ce modèle cellulaire. Le rapport F/Frest est calculé de la même manière que F/F0 en B.

Sondes mono excitation/mono émission.

Ces sondes, comme le Fluo-4 et le Rhod-2 (Figure 2) permettent des mesures rapides et sont adaptées à des techniques de microscopie confocale afin de mesurer les variations spatio-temporelles de calcium dans les cellules.

La liaison du calcium à la sonde provoque une hausse de l'intensité de fluorescence. Il n'est pas possible de réaliser une calibration fiable. En effet, pour une excitation unique et d'intensité donnée, l'intensité de la fluorescence d'émission est corrélée à la quantité de sonde fluorescente dans la cellule. Ce dernier paramètre évoluant d'une cellule à une autre (même au sein d'une même préparation), il est difficile d'établir une calibration rigoureuse entre l'intensité de fluorescence émise et la concentration réelle en calcium mesurée par ce type de sonde calcique non ratiométrique. Dans le cas des sondes dites « ratiométriques », le calcul d'un ratio de fluorescence permet de s'affranchir du paramètre que représente la concentration des cellules en indicateur calcique. Néanmoins, si les sondes non ratiométriques ne donnent pas d'indications quantitatives, elles révèlent les variations qualitatives de calcium au sein des cellules.

Excitation dans l'UV vs visible.

Les sondes calciques organiques comme le Fura-2, l'Indo-1, le Mag-Fura-2 et leurs dérivés sont excités dans l'UV. Le grand intérêt de ces sondes est de permettre une calibration des signaux efficaces (voir paragraphes précédents).
Cependant les sondes calciques excitées dans la lumière visible auront les avantages suivants :

- Une interférence réduite avec l'autofluorescence de l'échantillon ;
- Moins de photo-blanchiment ;
- Une plus haute absorbance de la sonde ;
- Une compatibilité avec un emploi simultané de sondes excitées dans l'UV ou de molécules « cagées ».

L'aequorine

L'aequorine est une photoprotéine (protéine luminescente) sensible au calcium (11). Elle a été purifiée à partir de la méduse *Aequorea victoria*. La première utilisation de l'aequorine, en tant que sonde calcique, date de 1967 par Ridgway et Ashley (12).

L'aequorine est constituée de l'apoAequorine et de la coelenterazine qui s'associent en un complexe en présence d'oxygène. Lorsque les 3 sites de liaison de haute affinité de l'aequorine vis-à-vis du calcium (de type « EF hand ») sont occupés par cet ion, un changement de conformation provoque l'oxydation de la coelenterazine en coelenteramide. La coelenteramide se trouve dans un état excité et revient à état électrique plus stable par émission de photons (1 photon/coelenteramide ; λ =469 nm).

Il existe une grande variété de coelenterazines synthétiques possédant des sensibilités et des vitesses de réaction différentes (13, 14). Leurs choix sont également

à prendre en compte lors des expériences à mener.

L'aequorine peut être employée également chez les plantes (15), dans différents types cellulaires ou compartiments cellulaires (16) ainsi que sur des animaux vigils (17).

En résumé, l'aequorine devait initialement être microinjectée dans les cellules. Par la suite, un grand nombre d'aequorines recombinantes ont été générées afin d'être adressées, par transfection, à des organites particuliers (comme les mitochondries) et de couvrir des gammes de concentrations calciques plus larges. L'un des gros avantages de telles techniques réside dans le fait que l'aequorine, exprimée dans des cellules isolées ou dans des tissus, ne « fuit » pas et reste compartimentalisée pendant plusieurs jours (18, 19). Par ailleurs, l'un des grands intérêts de l'aequorine est l'émission spontanée de lumière lors de la fixation du calcium. Il n'est donc pas nécessaire de stimuler cette sonde au cours des enregistrements. Ainsi, ces derniers peuvent se dérouler sur des périodes très longues de l'ordre de plusieurs heures, voire des jours sans toxicité.

Sondes adressables

De nouvelles sondes calciques adressables sont également disponibles. Ces protéines chimériques furent créées initialement à partir de dérivés de la GFP (« Green Fluorescent Protein ») auxquels ont été greffés des molécules liant le calcium (20). Ces sondes, dites en double tonneaux (ex : Cameleons, troponeon, D1) utilisent le principe du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Lors de la fixation du calcium sur la sonde, le donneur fluorescent est excité et transfert son énergie vers l'accepteur. Les sondes dites en simple tonneau (ex : Pericams, Camgaroos, G-CAMPs) sont constituées d'une seule protéine possédant également une structure liant le calcium. Il se produit une émission de photons quantifiable et corrélée à la concentration en calcium qui environne la sonde.

Ces protéines, comme l'aequorine, peuvent être exprimées dans des organismes vivants par transfection et être adressées à un organite particulier. Elles possèdent également l'avantage d'émettre plus de photons par rapport à l'aequorine.

Sondes organiques vs sondes protéiques

Les sondes organiques offrent les avantages suivants :

- Une grande sensibilité ;
- Une réponse rapide ;
- Pas de transfert de gène ;

Cependant, leur emploi peut faire face à des problèmes inhérents à un adressage parfois difficile, des fuites éventuelles et l'impossibilité de réaliser des mesures sur le long terme.

CHARGE DES SONDES CALCIQUES

Les sondes calciques organiques se présentent, en grande majorité, sous forme d'anions polycarboxylés imperméants.

Ces indicateurs fluorescents ne peuvent pénétrer dans la cellule que suite à une perméabilisation de la membrane ou grâce à une microinjection.

Il existe cependant des formes perméantes des sondes calciques. En effet, la greffe d'un groupement acetoxymethylester (AM) rend la molécule neutre et liposoluble. La forme AM de la sonde, insensible au calcium, est clivée par les estérases endogènes. La sonde calcique libérée sous sa forme anionique dans le cytoplasme s'accumule dans la cellule au cours de la période de charge (entre 20 et 45 minutes pour le Fura-2 AM en fonction du type cellulaire utilisé).

La charge de la cellule en sonde peut parfois poser les problèmes suivants :

- Compartimentalisation non désirée de la sonde si la durée de charge est trop longue par exemple. Il conviendra alors de la diminuer et de modifier si nécessaires les paramètres de température et de concentration de la forme AM de la sonde.
- Hydrolyse incomplète de la sonde. L'activité des estérases endogènes est parfois insuffisante.
- Difficultés de perméabilisation de la sonde AM. Ce problème est parfois résolé par ajout d'acide pluronique.
- Fuite de la sonde.

Certaines sondes s'accumulent préférentiellement et spontanément dans des organites intracellulaires. C'est le cas des dérivés de la rhodamine (Rhod-2 ; Rhod-5N) qui, de part la présence d'une charge nette positive, s'accumule dans les mitochondries. La faible affinité de ces sondes vis-à-vis du calcium en fait de bons candidats pour des mesures des variations qualitatives de calcium mitochondrial (10).

AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE L'UTILISATION DES SONDES CALCIQUES

Avantages :

- Spécificité.
- Marquages multiples.
- Haute sensibilité de détection.
- Sensibilité des sondes à l'environnement physico-chimique.
- Haute résolution dans le temps et dans l'espace.

Problèmes rencontrés :

- Bruit de fond: (Autofluorescence : NADP, Flavoprotéines, sonde liée de façon non spécifique.
- « Photo-blanchiment » : Exposition forte à la lumière fluorescente = décroissance de la fluorescence émise; Phénomène utile (FRAP, Décageage, FRET, …).
- Phototoxicité : formation d'espèces toxiques : radicaux libres par réaction de la molécule excitée avec l'O_2.
- Compartimentalisation possible de la sonde.

CONCLUSION :

L'imagerie calcique permet donc de suivre les variations spatio-temporelles de calcium au sein de cellules ou de tissus vivants. Il est nécessaire cependant de rester attentif à l'autofluorescence des cellules (NADP, flavoprotéines, …) ainsi qu'à des liaisons ou à des adressages non spécifiques des sondes. La fréquence d'excitation des indicateurs calciques doit également tenir compte de la cinétique du signal à mesurer, du photoblanchiement (photobleaching) du fluorophore et d'une phototoxicité éventuelle. Le choix des sondes prendra en compte également la concentration en calcium à mesurer, le compartiment à cibler et naturellement les équipements disponibles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol. (Lond),* 1883, 4: 29-47

2. Hodgkin A.L. and Keynes R.D. Movements of labeled calcium in squid giant axons. *J. Physiol.,* 1957, 138: 253-281

3. Tsien R.Y. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 1980. May 27;19(11), 2396-404.

4. Tsai Y. C., Weissman A. M. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer*, 2010, 1, 764-778

5. Minamino T., Komuro I., Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. 2010. *Circ Res* 107, 1071-1082

6. Matus S., Glimcher L. H., Hetz C. Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol,* 2011, 23, 239-252

7. Hotamisligil G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*, 2011, 140, 900-917

8. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1965, 260(6), 3440-50.

9. Lotteau S., Ducreux S., Romestaing C., Legrand C., Van Coppenolle F. Characterization of functional TRPV1 in the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Plos One*, 2013, 8(3), e58673

10. Humez S, Monet M, Van Coppenolle F, Delcourt P, Prevarskaya N.The role of intracellular pH in cell growth arrest induced by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, Dec;287(6), C1733-46.

11. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59, 223-39.

12. Ridgway EB, Ashley CC. Calcium transients in single muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967, 29, 229-34.

13. Shimomura O., Inouye S., Musicki B., Kishi Y. Recombinant aequorin and recombinant semi-synthetic aequorins. Cellular Ca2+ ion indicators. *Biochem J,* 1990, 270, 309-12.

14. Miller A.L., Karplus E., Jaffe L.F. Imaging [Ca2+]i with aequorin using a photon imaging detector. *Methods Cell Biol*, 1994, 40, 305-38.

15. Knight M.R., Read N.D., Campbell A.K., Trewavas A.J. Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *J Cell Biol*, 1993, 121, 83-90.

16. Pauly N., Knight M.R., Thuleau P., Graziana A., Muto S., Ranjeva R., Mazars C., The nucleus together with the cytosol generates patterns of specific cellular calcium signatures in tobacco suspension culture cells. *Cell Calcium*, 2001, 30, 413-21.

17. Curie T., Rogers K.L., Colasante C., Brulet P. Red-shifted aequorin-based bioluminescent reporters for in vivo imaging of Ca2 signaling. *Mol Imaging*, 2007, 6, 30-42.

18. Daguzan C, Nicolas MT, Mazars C, Leclerc C, Moreau M. Expression of membrane targeted aequorin in Xenopus laevis oocytes. *Int J Dev Biol*, 1995, 39, 653-7.

19. Leclerc C, Daguzan C, Nicolas MT, Chabret C, Duprat AM, Moreau M. L-type calcium channel activation controls the in vivo transduction of the neuralizing signal in the amphibian embryos. *Mech Dev*, 1997, 64, 105-10.

20. Pérez Koldenkova VP, Nagai T Genetically encoded Ca(2+) indicators : properties and evaluation. *Biochim Biophys Acta*, 2013, Jan (22), sous presse.

REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE
Rev. Fr. Histotechnol., 2012, **25**, n°1

SOMMAIRE

EDITORIAL :

L'histologie où l'art dans tous ses états
L. VENTEO page 11

ARTICLES :

Description histologique des différents stades de développement ovocytaire de Barbus Callensis (Valenciennes, 1842) dans l'oued soummam (Algérie)
H. DJOUDAD-KADJI, B. KADJI, S. BENSLIMANE, J-M. EXBRAYAT, M. IGUER-OUADA et C. CHEVALIER page 13

Les changements de paradigme en sciences de la vie ou comment obtenir des résultats justes avec des idées et des expériences fausses
J-M. EXBRAYAT page 23

Les tissus : Comment exploiter ces ressources biologiques?
J-Y. SCOAZEC page 41

Approche histopathologique dans l'étude de l'impact du site d'inoculation intracérébrale d'agents prion dans la distribution neuroanatomique de la protéine prion pathologique
M. LEBOIDRE, S. BOURGEOIS, J-M. BRIDON et A. BENCSIK page 51

L'infection à virus Ebola et les modèles animaux associés
O. REYNARD, F. JACQUOT, V. VOLCHKOV page 67

Nouvelles approches du traitement d'images
Y. TOURNEUR page 83

Mise en évidence immunohistochimique des protéines de jonctions sérrées dans le système nerveux central de souris
M. GAY et A. BENCSIK page 97

Mesures dynamiques des variations de calcium intracellulaire
S. LOTTEAU, S. DUCREUX et F. VAN COPPENOLLE page 107

ILLUSTRATION DE LA COUVERTURE :

Hybridation in situ Krt20 technique ADN branché d'intestin de souris.
(Lydie Venteo)