

MÉTHODE DE COLORATION POLYCHROME RAPIDE EN UN TEMPS, POUR COUPES A LA PARAFFINE DE MATÉRIEL FIXÉ PAR LA PLUPART DES FIXATEURS USUELS

J. ROOS

*Institut d'Histologie - Faculté de Médecine - Université Louis Pasteur
4, rue Kirschleger - 67085 STRASBOURG Cedex*

INTRODUCTION

Cette méthode de coloration a été mise au point à l'occasion de travaux de recherche sur le bulbe olfactif chez le rat, en diverses conditions expérimentales et notamment pour l'étude du développement embryonnaire, pré- et postnatal du bulbe olfactif accessoire (1, 2, 3). Comme au cours de ces premiers stades, il importait de fixer, de couper et de colorer les cerveaux *in situ*, il s'est avéré que cette coloration pouvait s'appliquer aussi avec succès à d'autres tissus que le tissu nerveux (Figures 1 à 4). Elle dérive de la méthode trichrome à l'Azan de Heidenhain (4), laquelle représente selon M. Gabe "le *nec plus ultra* parmi les méthodes de coloration dites générales"

(5), mais, seul inconvénient, une technique complexe et longue à réaliser, qui par ailleurs est déjà une modification améliorée de la méthode trichrome à la fuchisine de Mallory (6). La nouvelle coloration, simple et rapide, se fait par une solution d'un mélange de colorants acides, en milieu aqueux acétifié et en présence d'acide phosphotungstique ; elle se réalise en 5 minutes et permet d'obtenir à la fois une excellente coloration nucléaire et des colorations tissulaires différentielles, en fonction des structures présentes.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

• Les réactifs :

- les colorants acides

- l'Azocarmin G, (C.I. 50085, poids moléculaire : 580)
- la Fuchsine Acide, (C.I. 41685, poids moléculaire : 586)
- l'Orange G, (C.I. 16130, poids moléculaire : 452)
- le Vert Lumière, (C.I. 42095, poids moléculaire : 793)
- le Bleu d'Aniline WS, (C.I. 42755, poids moléculaire : 800)

- L'acide phosphotungstique

- L'acide acétique

• Préparation de la solution colorante

On prépare deux solutions colorantes que l'on mélange par la suite à volume égal.

- Solution 1 :

Dissoudre à froid dans 100 ml d'eau distillée :

- 1,5 g de fuchsine acide, - 0,5 g de vert lumière, - 1 g d'orange G et - 1 g d'acide phosphotungstique.

Ces substances sont ajoutées l'une après l'autre dans l'ordre indiqué, en agitant chaque fois, afin d'avoir une bonne dissolution.

- Solution 2 :

Dissoudre à chaud dans 100 ml d'eau distillée :

- 0,5 g d'azocarmin G que l'on porte un court temps (2 à 3 secondes) à ébullition ; on réajuste éventuellement à un volume de 100 ml, puis on ajoute :

- 0,5 g de bleu d'aniline WS, - 1 g d'orange G et 4 ml d'acide acétique glacial.

• Technique de coloration

1. Déparaffiner et réhydrater les coupes

2. Colorer les lames pendant 5 minutes par le mélange de colorants.

3. Rincer à l'eau distillée, puis laisser les lames pendant 30'' à 1 minute dans un bain d'eau distillée jusqu'à ce qu'il n'en reste plus de nuages rouges (ce temps dépend de l'épaisseur* des coupes, pour une coupe de 5 μ environ 30'').

4. Déshydrater directement par de l'alcool absolu, passer dans le toluène et monter au baume.

* Remarque : des coupes plus épaisses (10 à 12 μ), peuvent être différenciées par un bain d'alcool à 70° (différenciation rapide et intense) ou un bain d'alcool à 90° (différenciation plus lente).

• Interprétation et résultats

La coloration dépend à la fois :

- de la texture des tissus fixés,
- de la nature physico-chimique des colorants,
- des réactions physico-chimiques survenant entre les tissus fixés et les colorants.

La texture des tissus fixés est fonction de la nature propre des tissus en présence et du fixateur utilisé ; au cours d'une fixation chimique, les protéines tissulaires précipitent en formant un réseau tridimensionnel plus ou moins dense, à mailles de taille variable, entre lesquelles diffusent les colorants.

Les colorants en solution présentent, chacun, un coefficient de diffusion différent ; ceux à petites molécules ont un coefficient de diffusion élevé, ceux à grosses molécules, un coefficient de diffusion plus faible ; ainsi, la coloration

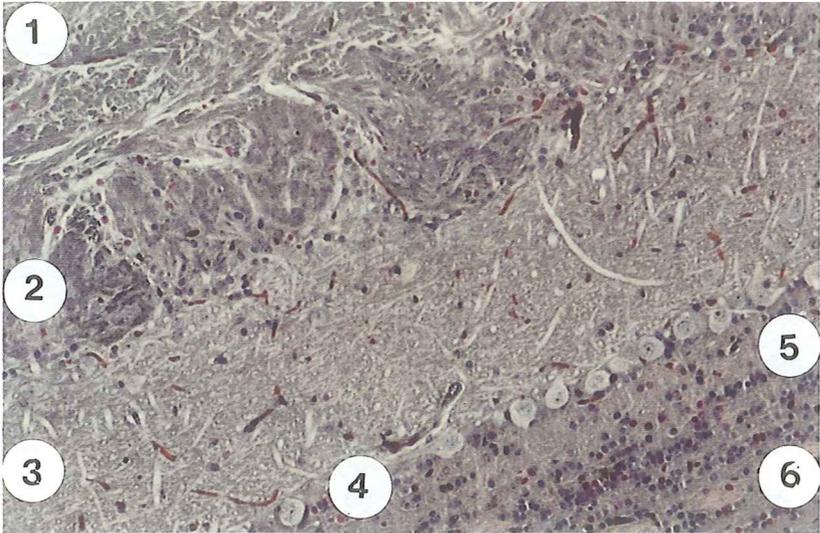


Figure 1 : Tissu nerveux. Les couches du bulbe olfactif de rat adulte :
 - Couche des fibres olfactives (1) ; - couche glomérulaire (2) ; couche plexiforme externe (3) ; couche des cellules mitrales (4) ; couche plexiforme interne (5) ; couche des grains internes (6).

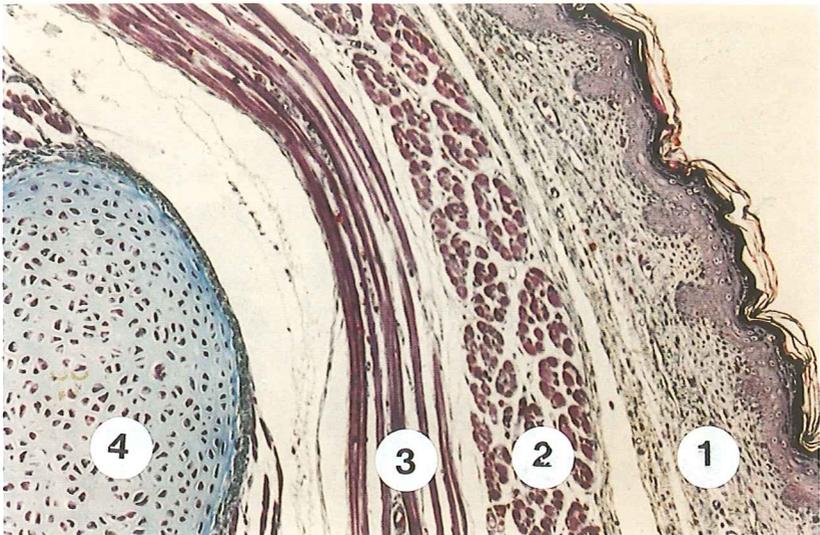


Figure 2 : Rat nouveau-né. Coupe passant par la peau (1), le muscle squelettique transversal (2) et longitudinal (3), le cartilage hyalin (4).

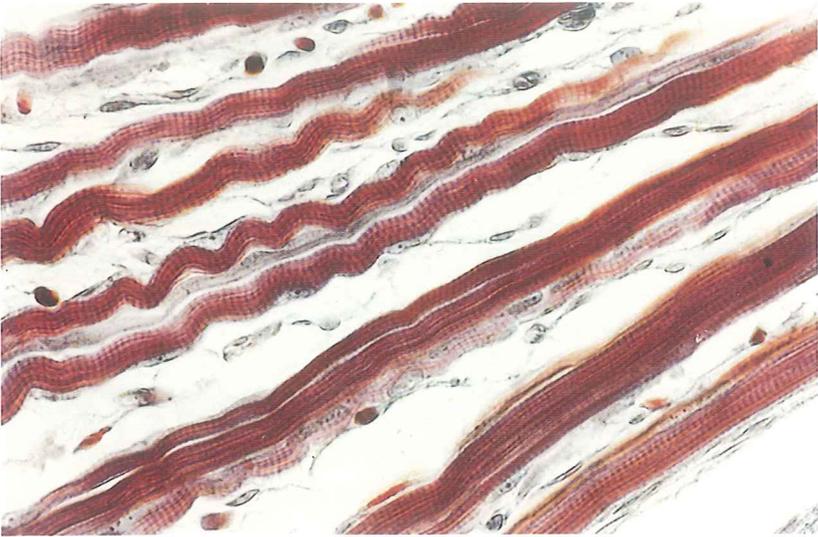


Figure 3 : Rat nouveau-né. Muscle strié en coupe longitudinale ; on observe l'alternance des disques clairs et sombres.

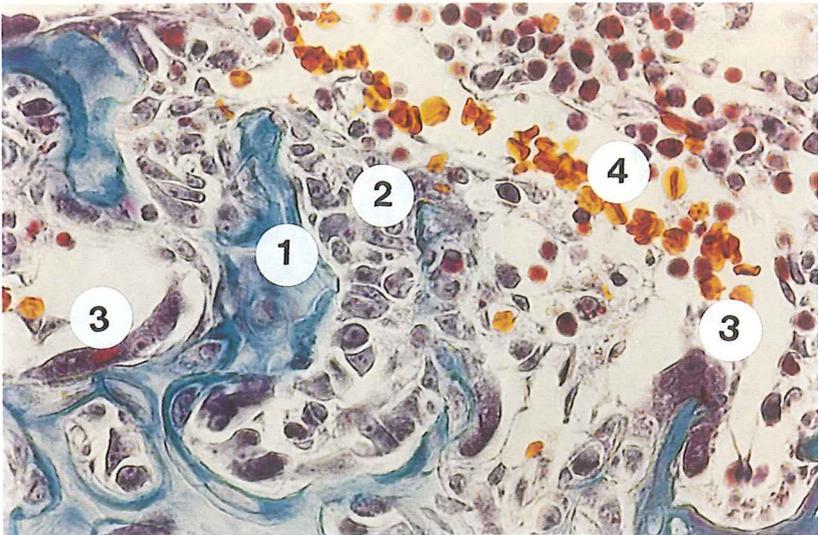


Figure 4 : Rat nouveau-né. En bleu, travées de tissu ostéoïde (1) avec ostéoblastes (2) et ostéoclastes (3). En orange, les hématies (4).

différentielle du mélange de colorants résulte en partie de leur différence de vitesse de diffusion dans les mailles du réseau des protéines fixées. La fuchsine acide et l'orange G diffusent très vite jusque dans les structures tissulaires les plus fines, le bleu d'aniline et le vert lumière progressent plus lentement et ne vont envahir, dans le même laps de temps, que les structures lâches. Ceci survient au bout de 4 à 5 minutes, mais si ce temps de coloration est dépassé, les colorants à diffusion lente continuent à progresser et à envahir les structures les plus fines, en masquant ou en chassant les premiers colorants.

Au cours de l'imprégnation par le liquide colorant, se réalisent des liaisons électropolaires entre les colorants et les protéines fixées, aboutissant à la coloration de ces protéines.

La présence d'acide phosphotungstique (qui a comme propriétés :

- 1 de limiter la prise de certains colorants (ceux à diffusion rapide) sur les fibres de collagène et de réticuline,
- 2 de favoriser, par contre, leur coloration élective par le bleu d'aniline et le vert lumière) rend inutile la différenciation anilinée des coupes.

L'intensité des teintes obtenues varie en fonction des fixateurs utilisés. Par exemple, après une fixation au Bouin-Hollande :

Les noyaux présentent un contour sombre, bien net ; les nucléoles sont de couleur rouge-orange.

Les épithéliums de revêtement sont colorés en rose ou rose-mauve ; la kératine est orange. Les épithéliums glandulaires sont colorés en jaune, rouge, bleu ou indigo, teintes variant en fonction de la nature de leur produit de sécrétion (cellules de l'adénohypophyse). Le muscle

squelettique est de teinte rouge-orange et à striation bien apparente ; le muscle lisse est mauve. Les tissus de collagène et de réticuline varient, selon leur densité, du bleu intense au bleu-vert clair. Les fibres axoniques sont rouges dans les fibres myélinisées et mauves dans les fibres amyélyniques ; la myéline est de teinte orange pâle ; le neurosécrétat du lobe nerveux de l'hypophyse est vert pâle. Les hématies sont de teinte orange.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 ROOS J. : Méthode de coloration polychrome rapide en un temps, pour coupes à la paraffine de matériel fixé par la plupart des fixateurs usuels. *J. de Médecine de Strasbourg*, 1985, **16**, 350-351.
- 2 ROOS J., ROOS M., SCHAEFFER C. et ARON C. : Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1988, **270**, 121-131.
- 3 ROOS J., ROOS M., SCHAEFFER C. et ARON C. : Prepubescent hormonal control of the development of accessory olfactory bulbs in the male rat. *Developmental Brain Research* 1989, **47**, 309-312.
- 4 GABE M. : Techniques histologiques : 1968 (Masson & Cie), 1113 p.
- 5 HEIDENHAIN M. : Ueber die Mallorysche Bindegewebefärbung mit Karmin und Azokarmin als Vorfarben. 1915, *Z. wiss. Mikr.*, **32**, 361-372.
- 6 MALLORY F.B. : A contribution to staining methods. *J. Exp. Med.*, 1900-01, **V**, 15-20.

APPLICATIONS DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A TRANSMISSION A L'ÉTUDE DES TISSUS CALCIFIÉS

F.J.G. CUISINIER

*INSERM CJF 92-04 - Centre de Recherches Odontologiques,
Université Louis Pasteur, STRASBOURG*

INTRODUCTION

La microscopie électronique à transmission conventionnelle (METC) et la microscopie électronique à transmission de haute résolution (METHR) sont deux techniques proches qui permettent l'étude de la partie minérale des tissus calcifiés. Les informations que l'on peut retirer d'un cliché de METC et de METHR sont différentes et souvent complémentaires. Il est important lorsque l'on débute une étude des cristaux biologiques par microscopie électronique de pouvoir choisir la technique la plus appropriée.

L'archétype du METC est le microscope JEOL 100b qui possède une résolution Scherzer de 0,35 nm. Les METHR sont des microscopes à voltages intermédiaires (300-400 kV). Le microscope utilisé dans cette étude est le microscope PHILIPS EM 430 de 300 kV d'accélération des électrons et doué d'un pouvoir de résolution Scherzer (1) de 0,19 nm.

Nous présenterons tout d'abord en détail les techniques de préparation des spécimens propres à l'étude de la partie minérale des tissus calcifiés en microscopie électronique à transmission, puis les méthodes spécifiques de la METHR. Deux travaux sur la partie minérale du tissu osseux alvéolaire humain et sur les cristaux de l'émail foetal humain seront exposés et nous serviront de bases pour illustrer les différences existant entre la METC et la METHR.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

- Préparation des échantillons

Après trois heures de fixation dans une solution de 2 % de glutaraldéhyde et 2 % de paraformaldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,4, les échantillons sont lavés dans trois bains successifs de ce tampon. Puis, ils sont post-fixés au tétraoxyde d'osmium à 2 %

dans le tampon cacodylate, rincés dans l'eau distillée et déshydratés avant d'être inclus dans l'EPON 812 mélange B.

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un ultra microtome Sorvall-Porter MT-2b équipé d'un couteau de diamant et sont recueillies sur de l'eau saturée en hydroxyapatite synthétique afin de prévenir la dissolution des cristaux. Pour la METC nous utilisons des grilles de cuivre de 300 mesh recouvertes d'un film de formvar carboné. Dans le cas de la METHR, nous employons des grilles de cuivre de 1000 mesh recouvertes d'un film de formvar à trous carboné. Les contraintes thermiques générées par le faisceau d'électrons de 300 keV sont fortes et induisent soit une dérive des échantillons soit la déchirure du film si les gril-

les ne sont pas très fines. Les coupes sont ensuite observées sans être colorées.

- Le microscope électronique JEOL 100b

Le microscope JEOL 100b de tension d'accélération des électrons de 100 kV, est équipé d'une platine porte-objet de type "top-entry".

Les caractéristiques de ce microscope sont les suivantes :

- le coefficient d'aberration sphérique (C_s) est de 1,8 mm ;
- le coefficient d'aberration chromatique (C_c) est de 1,5 mm ;
- la résolution Scherzer est de 0,357 nm.

La fonction de transfert de ce microscope est tracée sur la figure 1a.

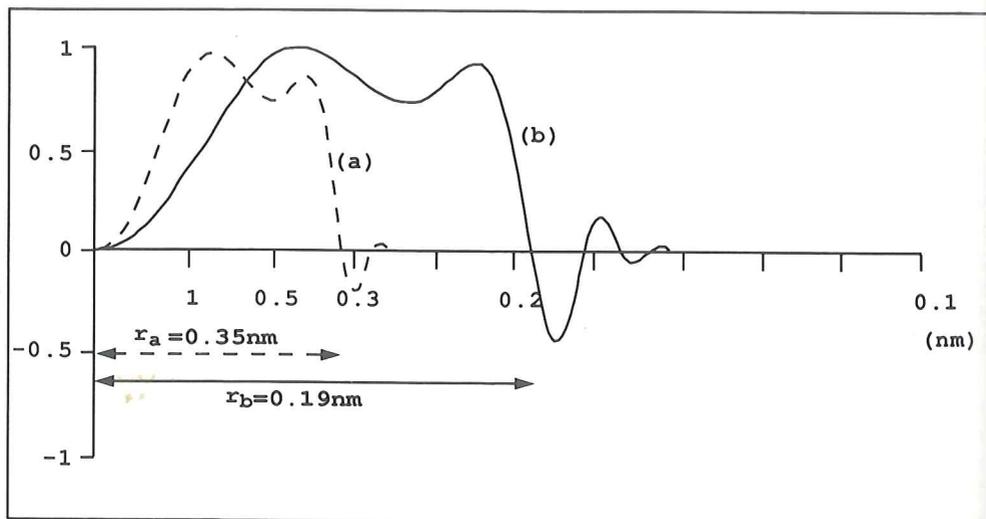


Figure 1 : Courbes de la fonction de transfert à la focale Scherzer :
a : du microscope Jeol 100b, résolution Scherzer $r_a = 0.35$ nm ;
b : du microscope Philips EM 430, résolution Scherzer $r_b = 0.19$ nm.

- Le microscope Philips EM430

Les spécimens sont observés avec un microscope électronique de haute résolution Philips EM430 ST. Ce microscope, dont l'anode est constituée d'un cristal d'hexaborure de lanthane (LaB_6), est équipé d'un porte-objet à double tilt. Les caractéristiques de ce microscope sont :

- une tension d'accélération des électrons de 300 kV ;
- un coefficient d'aberration sphérique de 1,1 mm ;
- un angle de divergence du faisceau de 0,6 mrad ;
- un pouvoir de résolution Scherzer de 0,19 nm.

La courbe de la fonction transfert du microscope à la focale Scherzer (- 57 nm) est reproduite sur la figure 1b.

Les observations sont réalisées, soit sur l'écran fluorescent, soit par l'intermédiaire d'une caméra LH 4036 (Lhesa). Cette caméra qui utilise un scintillateur formé d'un cristal YAG, est couplée à un moniteur vidéo et donne une image agrandie 10 fois par rapport à l'écran phosphorescent.

- Le banc optique

Les micrographies du microscope électronique de haute résolution sont systématiquement analysées par passage sur un banc optique (2). Ceci nous permet de contrôler régulièrement les performances du microscope électronique et d'éliminer les clichés présentant un trop fort astigmatisme ou une dérive du spécimen.

Ce banc est constitué de différents éléments (Micro-contrôle). Il est assemblé sur un rail d'aluminium de 4 mètres de long sur lequel sont fixés par ordre :

- un laser de type Hélium-Néon de 10 Watts de puissance ;
- un système de filtrage spatial et d'agrandissement du faisceau laser ;
- une platine porte-négatif ;
- un obturateur ;
- une lentille divergente ;
- un dos porte-film polaroid.

L'aspect du cliché de diffraction dépend de la structure de l'image de microscopie électronique. S'il s'agit de la photographie d'une zone amorphe, film de carbone par exemple, le cliché de diffraction est formé par un spectre du bruit de fond qui est circulaire et qui est centré sur la tache centrale de diffraction. Ce spectre est altéré par l'astigmatisme, la défocalisation et le coefficient d'aberration sphérique du microscope, ainsi que par la dérive du spécimen. Par contre, si la micrographie contient des informations périodiques, comme l'image d'un cristal, le cliché de diffraction optique fournit alors des informations sur le spécimen. On peut ainsi, dans le cas d'un cristal, définir des équidistances réticulaires et l'axe de zone parallèle du faisceau.

La recherche de l'axe de zone du cristal a été effectuée le plus souvent avec l'aide du programme EMS décrit ci-dessous. Nous avons utilisé la routine In1 de ce programme qui, en fonction de la distance entre trois points du cliché de diffraction et des angles, détermine les axes d'observation les plus probables en fonction de la nature du cristal observé. Pour confirmer ces résultats, nous avons en outre, réalisé la simulation des clichés de diffraction de l'hydroxyapatite suivant les axes de zone rencontrés.

- Simulation d'image de microscopie électronique de haute résolution

Les microscopes électroniques à transmission de haute résolution peuvent être assimilés par le type de formation de l'image aux microscopes photoniques à contraste de phase. Le flux d'électrons qui traverse le spécimen n'est modifié que dans sa phase. Il résulte du déphasage de l'onde électronique, une absence de linéarité entre le potentiel atomique de l'objet et l'image, rendant impossible l'association intuitive d'une partie de l'image avec une colonne d'atomes (2). Pour contourner ce problème, nous utilisons un programme informatique de synthèse d'images qui permet de calculer une image de l'objet étudié en tenant compte de tous les effets du microscope et de l'objet sur l'onde électronique. Lorsque l'image est calculée, nous la comparons visuellement avec l'image expérimentale. Si la concordance entre les deux images est mauvaise, nous recalculons une autre image. Ce processus itératif de comparaison est poursuivi jusqu'au moment où une concordance parfaite est obtenue entre les images. Ce processus permet d'identifier la structure du cristal étudié.

La simulation des images de microscopie électronique de haute résolution a été réalisée avec le programme EMS (3). Ce programme est composé de 58 routines interactives et permet, en plus le calcul des images par la méthode dite multi-tranches :

- la simulation de clichés de diffraction des électrons (Figure 2) ;
- la simulation d'images d'interfaces cristallines ;
- le calcul du Cs et de l'astigmatisme du microscope sur les clichés de diffraction optique (routine Cs1) ;

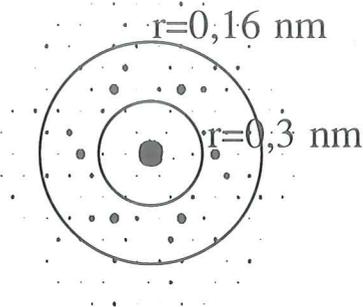


Figure 2 : Cliché de diffraction électronique simulé de l'hydroxyapatite, axe de zone [001].

- la visualisation de la structure des cristaux en fonction de l'axe d'observation (routine Ds1).

Notre version du programme EMS est installée sur deux ordinateurs Silicon Graphics 4d/25 et Indigo.

Les paramètres de la maille élémentaire et les positions atomiques de l'hydroxyapatite utilisées pour la simulation d'image de microscopie électronique à haute résolution sont : $a = b = 0,9432$ nm et $c = 0,6881$ nm (4).

INFORMATIONS

Dans le cas d'un objet cristallin, le contraste en METC est un contraste de diffraction. L'image est formée de quelques faisceaux électroniques diffractés. Ceci est illustré par le diffractogramme électronique simulé de l'hydroxyapatite sur lequel un diaphragme correspondant à une résolution de 0,35 nm a été dessiné (Figure 2a). Seuls les faisceaux correspondants aux réflexions de 1^{er} ordre participent à la formation de l'image. Dans le cas de la METHR le nombre de faisceaux diffractés qui participe à la formation de l'image est beaucoup plus impor-

tant (Figure 2b). On parle alors de contraste de structure (5). Le type de contraste obtenu dépend donc à la fois de la résolution du microscope et des paramètres du cristal observé.

Le type d'information recueilli est différent suivant le type de contraste (Tableau 1). En contraste de diffraction, les informations portent sur la taille et la morphologie des cristaux, la symétrie du réseau cristallin et sur la présence de défauts de structure. Lorsque l'on travaille en condition de haute résolution, on fait un pas en avant dans la compréhension de la structure du spécimen. On peut alors résoudre la structure locale de l'échantillon et dans certains cas à l'échelle atomique.

METC
contraste de diffraction
Taille et morphologie
Réseau cristallin
Visualisation des défauts
METHR
contraste de structure
Structure du cristal
Caractérisation des défauts

Tableau 1

RÉSULTATS

- Morphologie et structure des cristaux du tissu osseux alvéolaire humain

Cette étude a été réalisée avec le microscope JEOL 100b. Pour mesurer les dimensions des cristaux, il faut connaître la direction d'observation [hkl] qui représente la direction du flux d'électrons

(Figure 3). Pour déterminer cette direction d'observation, il est nécessaire que le cristal présente au moins deux familles de plans réticulaires non parallèles. Si la direction d'observation est [001], on peut mesurer directement la largeur et l'épaisseur du cristal et calculer le rapport Larg./Ep. (6). Lorsque la direction d'observation est [100], ce sont les paramètres longueur et épaisseur du cristal qui sont enregistrés (Figure 3).

Nous avons ainsi pu déterminer que les 23 cristaux observés le long de l'axe [001] (Figure 4a) ont une morphologie de plaquettes caractérisées par un rapport L/E moyen de 6,9 avec une longueur moyenne de 46 nm. Pour les six cristaux observés le long de l'axe [100], la longueur moyenne est de 47 nm et l'épaisseur moyenne de 6,4 nm (Figure 4b).

Sur les cristaux présentés dans la figure 4, on note la présence de plans réticulaires. L'équidistance mesurée des plans (100) est de 0,817 nm, celle des plans (002) est de 0,34 nm, valeurs qui correspondent à celles de l'hydroxyapatite.

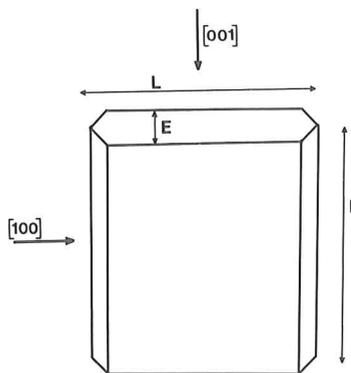


Figure 3 : Représentation d'un cristal du tissu osseux. L = Largeur, l = longueur, E = épaisseur.

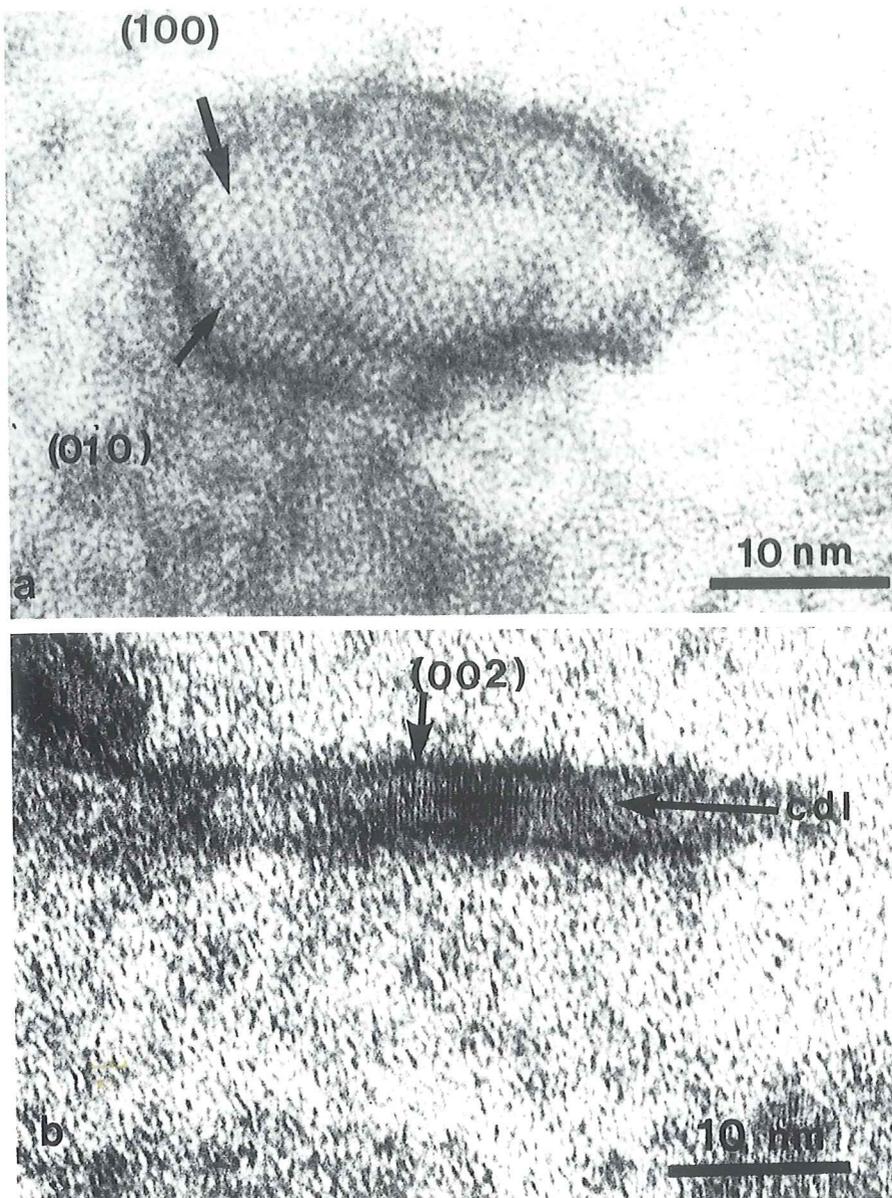


Figure 4 : Cristaux du tissu osseux alvéolaire humain.
 a) direction d'observation [001],
 b) direction d'observation [100], cdl : ligne noire centrale.

Il est également possible en METC, de visualiser des défauts de structures cristallines. La ligne de contraste noir située au centre du cristal est une frange de Fresnel (Figure 4b). Cette ligne de contraste correspond certainement à une dislocation ou à un joint de grains. Il n'est néanmoins pas possible de déterminer exactement le type et la structure du défaut qui génère cette ligne de contraste.

- Structure des cristaux de l'émail foetal humain

La croissance des cristaux de l'émail est classiquement divisée en deux phases : une première phase de développement bi-directionnel très rapide donnant naissance à des cristaux minces en forme de rubans et une deuxième étape plus lente de croissance en épaisseur des cristaux jusqu'à ce qu'ils atteignent leur taille adulte. Les cristaux d'émail de fœtus humain âgés de 5 mois ont été étudiés avec un microscope électronique à transmission de haute résolution Philips EM 430 ST. Il s'agit de cristaux en cours de croissance observés pendant la phase sécrétoire de l'amélogénèse. Ces cristaux en forme de ruban ont tous une structure cristalline identique à celle de l'hydroxyapatite. Ceci est démontré par la correspondance entre des images simulées d'hydroxyapatite et des images expérimentales observées le long de 5 directions cristallographiques différentes. Le cristal d'émail foetal observé selon l'axe de zone [103] présente un défaut de structure de type dislocation vis dont l'axe est parallèle à l'axe [030] (Figure 5a). La défocalisation utilisée pour le calcul de l'image simulée est 77 nm et l'épaisseur du spécimen 20 nm (Figure 5c). L'image du potentiel atomique de l'hydroxyapatite (Figure 5d) projeté est également superposée à l'image expérimentale. L'orientation du cristal par rapport au

faisceau d'électrons est déterminée par comparaison du cliché de diffraction optique (Figure 5e) et du cliché de diffraction simulé de HA (Figure 5f). On notera que pour ce cristal une correspondance particulièrement bonne entre l'image simulée et l'image expérimentale a été obtenue. Les sites j, notés sur l'image du potentiel atomique projeté de l'hydroxyapatite (Figure 5d) et sur l'image simulée (Figure 5f) correspondent à des colonnes formées d'un calcium de type I et d'un phosphore. Les sites K sont formés de 3 calciums de type II, un calcium de type I et un phosphore. La bonne concordance entre les images simulées de l'hydroxyapatite et les images expérimentales démontrent que ces cristaux d'émail en cours de croissance ont une structure très proche de l'hydroxyapatite stoechiométrique.

Dans cette population de cristaux en forme de ruban, plus de la moitié présentent des défauts cristallins, en particulier des dislocations de type vis qui sont plus abondantes que les dislocations de type coin. Des défauts de structures plans de type joints de grains de torsion et joints de grains à forte désorientation ont été aussi observés. Le cristal observé le long de l'axe de zone [102] présente une dislocation (Figure 6). La dislocation est caractérisée par un vecteur de Burgers **b** de module $b : < 110 >$. Cette dislocation entraîne une augmentation en épaisseur du cristal de 1/3 de maille élémentaire. Ce mouvement est souligné par la ligne blanche représentant le plan (030) supplémentaire.

A proximité des cristaux d'émail foetal, nous avons pu mettre en évidence, et cela pour la première fois dans un tissu calcifié en cours de développement, des particules dont le diamètre est compris entre 1 et 3 nm. Ces nanoparticules pré-

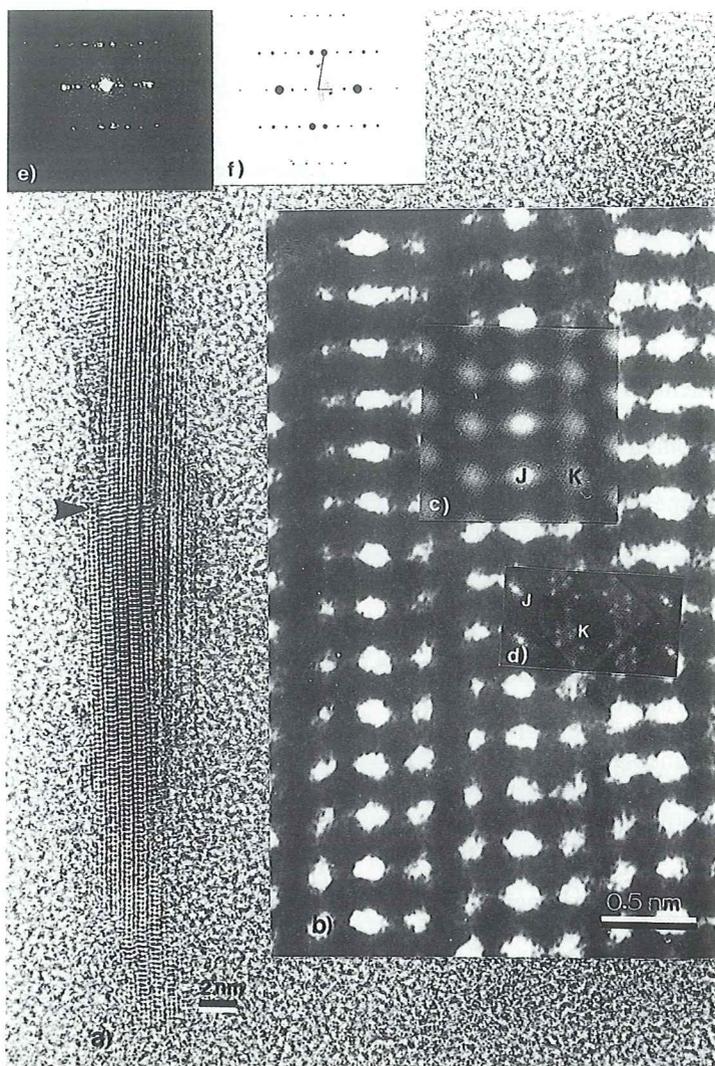


Figure 5 : Cristal d'émail foetal humain observé le long de l'axe [103] :
 a) vue générale, flèche : dislocation vis ;
 b) vue agrandie du réseau réticulaire ;
 c) image simulée (défocalisation = 77 nm, épaisseur du spécimen = 20 nm) ;
 d) image du potentiel atomique de l'hydroxyapatite projeté le long de la direction [103] ;
 e) diffractogramme optique du cristal ;
 f) diffractogramme simulé de l'hydroxyapatite observée le long de l'axe de zone [103].

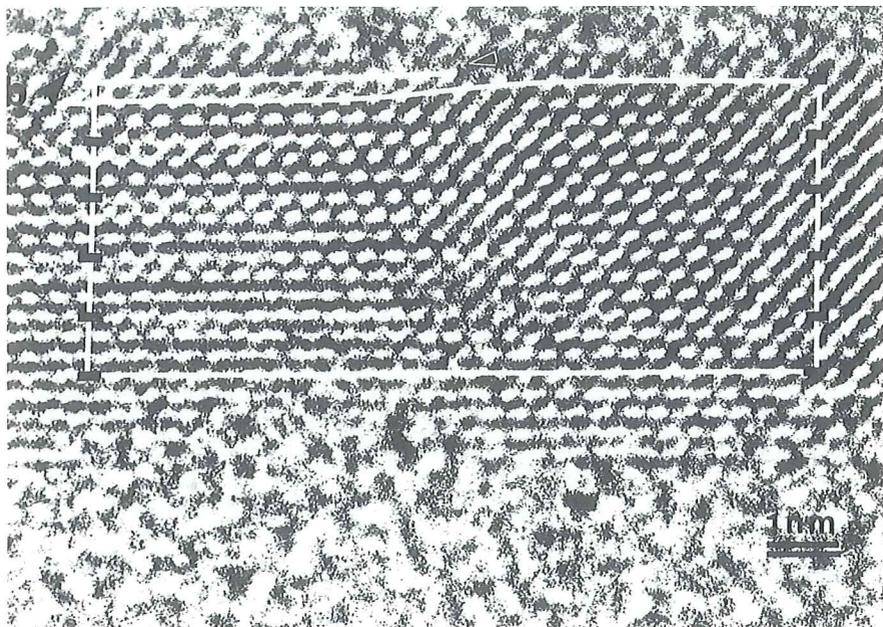


Figure 6 : Cristal d'apatite de l'émail fœtal humain observé le long de l'axe de zone [102] ; vecteur de Burgers $b : \langle 110 \rangle$.

sentent toutes une structure cristalline. Elles sont formées d'un nombre variable de colonnes atomiques et comportent entre une à trois familles de plans réticulaires (Figure 7). Les informations structurales obtenues ne correspondent à aucun phosphate de calcium généralement impliqué dans les phénomènes de biominéralisation. Il faut noter que les informations structurales sont perturbées

par la petite taille des particules et les faibles équidistances entre les plans réticulaires qui sont proches de la résolution du microscope. En utilisant les mêmes méthodes de préparation et d'observation, nous n'avons pas noté de telles nanoparticules dans l'émail adulte (9). Ces nanoparticules pourraient donc être des précurseurs des cristaux d'apatite en forme de ruban.

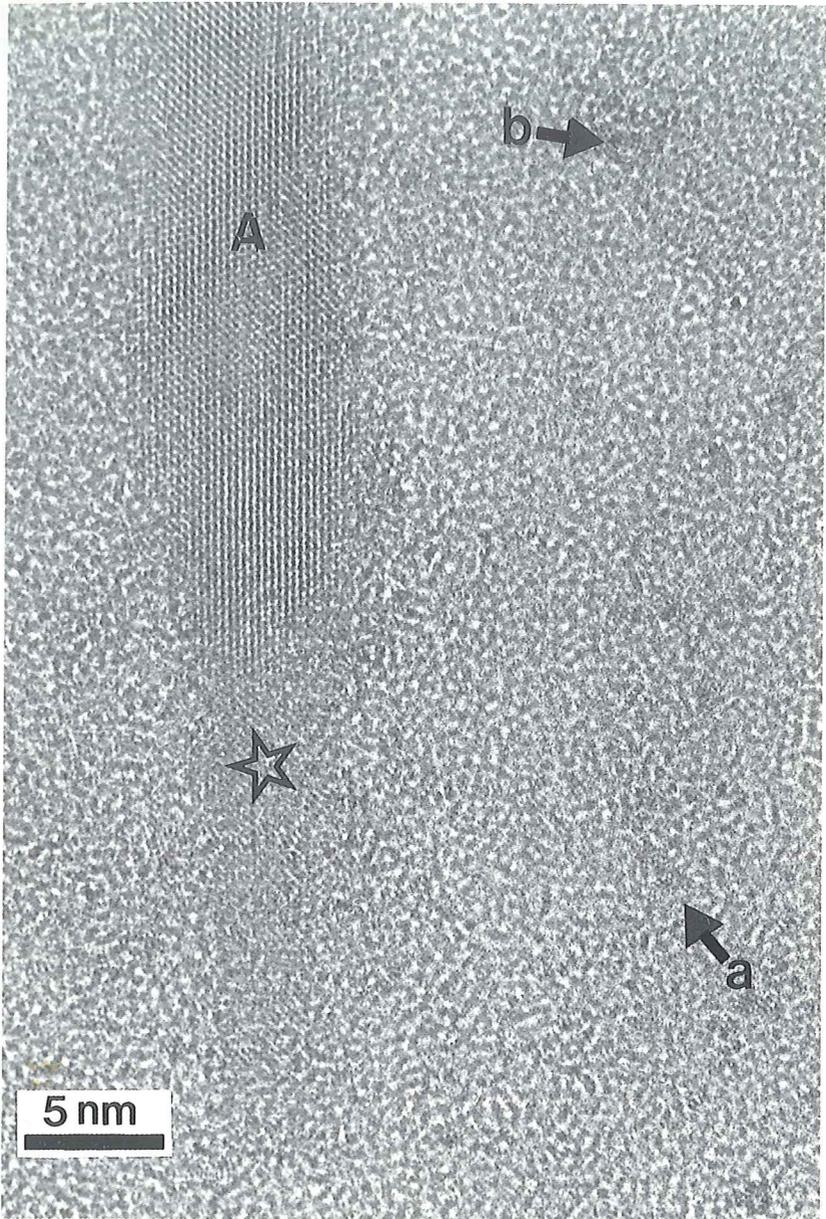


Figure 7 : Email foetal humain, a, b : nanoparticules, A : cristal d'apatite observé le long de l'axe [103], étoile : zone de nucléation.

CONCLUSION

Il apparaît clairement que la METC et la METHR sont deux techniques complémentaires qui peuvent être utilisées conjointement pour l'étude histologique de la partie minérale des tissus calcifiés. La METC fournit des informations sur la morphologie des cristaux et l'organisation du tissu, alors que la METHR nous permettra de déterminer la structure à l'échelle quasi atomique des cristaux biologiques. Cette dernière technique est actuellement la seule qui permet l'étude de la structure de cristaux biologiques individuels et la détection de nanoparticules. Elle doit dans l'avenir nous aider dans la compréhension des phénomènes de croissance et de destruction des cristaux biologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 SCHERZER O. : The theoretical resolution limit of the electron microscope. *J. Appl. Phys.*, 1949, **20**, 20-29.
- 2 SPENCE J.C.H. — Experimental high-resolution electron microscopy. Oxford University Press, Oxford, 1981.
- 3 STADELMANN P. : EMS — A software package for electron diffraction analysis and HREM image simulation in material science. *Ultramicroscopy*, 1987, **21**, 131-146.
- 4 KAY M.I., YOUNG R.A. & POSNER A.S. : Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature*, 1964, **204**, 1050.
- 5 EBERHART J.P. : Méthodes d'analyses chimiques et structurales. Dunod, Paris, 1991.
- 6 VOEGEL J.C. & FRANK R.M. : Microscopie électronique de haute résolution du cristal d'apatite d'émail humain et de sa dissolution carieuse. *J. Biol. Buccale*, 1974, **2**, 39-50.
- 7 CUISINIER F.J.G., BRES E.F., HEMMERLE J., VOEGEL J.-C. & FRANK R.M. : Transmission electron microscopy of lattice planes in human alveolar bone apatite crystals. *Calcif. Tissue Int.*, 1990, **40**, 332-338.
- 8 CUISINIER F.J.G., STEUER P., FRANK R.M. & VOEGEL J.-C. : High resolution electron microscopy of young apatite crystals in human fetal enamel. *J. Biol. Buccale*, 1990, **18**, 149-154.
- 9 BRES E.F., VOEGEL J.-C. & FRANK R.M. : High-resolution electron microscopy of human enamel crystals. *J. Microscopy*, 1989, **160**, 183-201.

TECHNIQUE DE LA CRYOFRACTURE : UN EXEMPLE D'APPLICATION

BINGEN A. et VALLE M.

*Unité INSERM U 74, Laboratoire de Virologie
et Laboratoire Commun ULP/Synthélabo,
3, rue Koeberlé, 67000 STRASBOURG*

INTRODUCTION

L'avènement de la technique de la cryofracture, dans les années 60, a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine de l'étude des cellules.

La formidable expansion et le succès rencontrés par cette technique sont dus à plusieurs raisons, parmi lesquelles :

I) la compréhension de l'architecture cellulaire et en particulier de celle des membranes grâce à l'aspect tridimensionnel obtenu, après évaporation de platine, ce qu'aucune autre préparation n'est capable de réaliser.

II) la conservation de l'architecture moléculaire des cellules qui peuvent n'être fixées que par le froid, évitant ainsi toute fixation chimique.

L'objet de cet article est de mieux faire connaître cette technique, encore assez peu utilisée par les chercheurs en France.

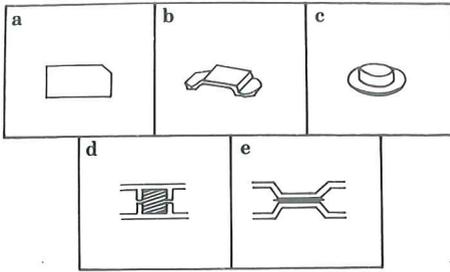
Description de la technique

Le but de cette technique est d'obtenir une réplique métallique du plan de fracture d'un objet préalablement congelé et de l'observer ensuite au microscope électronique à transmission.

Vu les nombreux aléas techniques que nous avons rencontrés lors de l'application de cette méthode, nous détaillerons les différentes étapes, telles que nous les pratiquons au laboratoire.

a) Nature de l'objet

Les spécimens utilisés sont soit des fragments d'organe, soit des cellules isolées. Celles-ci sont, si possible, cultivées en monocouches sur un support spécial, le thermanox (Lux, Miles Laboratories, Naperville, II.) découpé en lamelles de 2 x 4 mm (Figure 1a) adaptables aux supports BUO 55 (Balzers) (Figure 1b). Un coin de la plaque est découpé en vue de



1

Figure 1 : Différents supports utilisés pour la cryofracture

- a) support de thermanox pour la culture cellulaire
- b) support BUO 55 (Balzers)
- c) coupelle N 30 (Reichert)
- d) sandwich réalisé avec 2 coupelles N 30 pour la fracture de fragments d'organes
- e) sandwich réalisé avec 2 coupelles BUO 55 pour la fracture de cellules adhérentes au thermanox

servir au repérage ultérieur de la face où se trouvent les cellules. En cas de non adhérence des cellules, celles-ci sont cultivées en suspension et traitées, sous forme d'un culot de centrifugation, comme un fragment d'organe.

b) Préparation des échantillons

Les organes doivent être découpés, sous la loupe binoculaire, en tout petits fragments parallélépipédiques (0,75 mm/1,25 mm) afin de pouvoir être introduits dans les coupelles creuses N 30 (Reichert-Jung) (Figure 1c) préalablement immergées dans du tampon et débarrassées de toute trace de bulle d'air.

Les échantillons sont fixés soit par congélation, soit par voie chimique. Nous avons toujours recours à cette dernière car nous travaillons avec des cellules ou des organes infectés par différents virus. Les échantillons quels qu'ils soient sont fixés, pendant 1 heure, au moins, par du glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon. Ils sont ensuite cryoprotégés par un traitement au glycérol à 30 % dans le tampon utilisé pour le glutaraldéhyde. Cette étape qui dure de 1 à 4 heures, a pour but d'éviter la formation de cristaux de glace lors de la congélation ultérieure.

c) Montage des échantillons

I) les petits fragments de tissu, ou le culot de centrifugation des cellules sont emprisonnés entre deux disques identiques (N 30) (Figure 1d),

II) les fragments de thermanox sont montés en sandwich entre deux supports BUO 55 (Figure 1e).

d) Congélation

Les échantillons sont alors congelés le plus rapidement possible. Nous utilisons comme agent cryogène de l'azote liquide, rendu pâteux, après avoir été soumis à un vide primaire. La température est alors de -210°C . Sous l'action du froid, les coupelles emprisonnant les objets seront parfaitement soudées l'une à l'autre. Les échantillons ainsi préparés pourront être conservés dans de l'azote liquide jusqu'au moment de la fracture.

e) Fracture

Les sandwichs sortis de l'azote liquide, sont insérés dans un porte-objet adéquat immergé dans de l'azote liquide, qui sera transféré dans l'appareil de cryofracture. Nous utilisons un "cryofract 190" (Reichert-Jung, Leica, Villepinte, France) dont la température d'expérience

désirée (-150°C généralement) est obtenue par refroidissement préalable à l'azote liquide. La fracture, dans ce type d'appareil, est obtenue par ouverture du porte-objet, c'est-à-dire par la séparation des deux disques renfermant le matériel.

f) *Elaboration de la réplique*

Le plan de fracture est ombré par un dépôt de platine sous une incidence de 45° ce qui accentuera les faibles reliefs révélés par la fracture et procurera l'aspect tridimensionnel caractéristique de la méthode. Cette couche de platine de 10 \AA d'épaisseur est ensuite consolidée par un dépôt de carbone sous une incidence de 90° . La fracture et l'élaboration de la réplique ont lieu, dans l'appareil, sous un vide de $1,33 \cdot 10^{-5}$ Pascal (10^{-7} Torr).

g) *Récupération des répliques*

Après retrait du porte-objet ouvert de l'appareil, les répliques métalliques sont récupérées par immersion séparée de chaque coupelle dans de l'eau de Javel concentrée. Les répliques, ou empreintes de la fracture, se décollent et vont flotter à la surface de l'eau de Javel alors que le matériel biologique ou le fragment de thermanox tombe au fond du godet.

h) *Lavages et examen*

Après plusieurs bains de 30 minutes d'eau de Javel à 100 %, 75 % et 50 % puis 3 bains d'eau distillée, les répliques sont récupérées sur des grilles de cuivre à maille hexagonale, 700 mesh, et examinées au microscope électronique à transmission (Philips EM 410).

RÉSULTATS

Le plan de fracture se propage selon les lignes de moindre résistance, ce qui dans les membranes correspond à la zone hydrophobe, séparant ainsi la bicouche lipidique en deux et permettant la visualisation des protéines intramembranaires inobservables en coupes fines (Figure 2). Après fracture, nous sommes en présence de 2 faces, P et E d'après la nomenclature de Branton et al. (1) qui peuvent apparaître en alternance dans une même réplique. La face P, en contact avec le protoplasme est reconnaissable à de nombreuses particules protéiques intramembranaires alors que la face E, en contact avec "l'extérieur" n'en est porteuse que d'un nombre restreint.

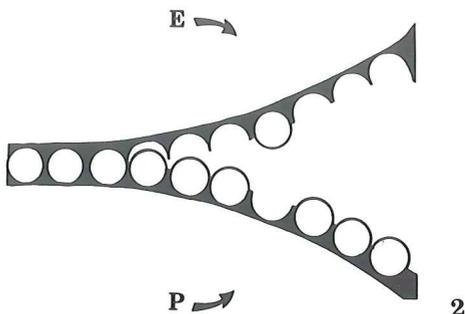


Figure 2 : Séparation de la bicouche lipidique membranaire et mise en évidence des protéines intramembranaires sur les 2 faces de fracture E et P.

La fracture des cellules cultivées sur thermanox (Figure 3) nous apporte des renseignements complémentaires quant à la localisation dans la cellule de ces deux faces. Si la réplique est récupérée à partir du support en cuivre, la face E provient du "haut" de la cellule et la face P

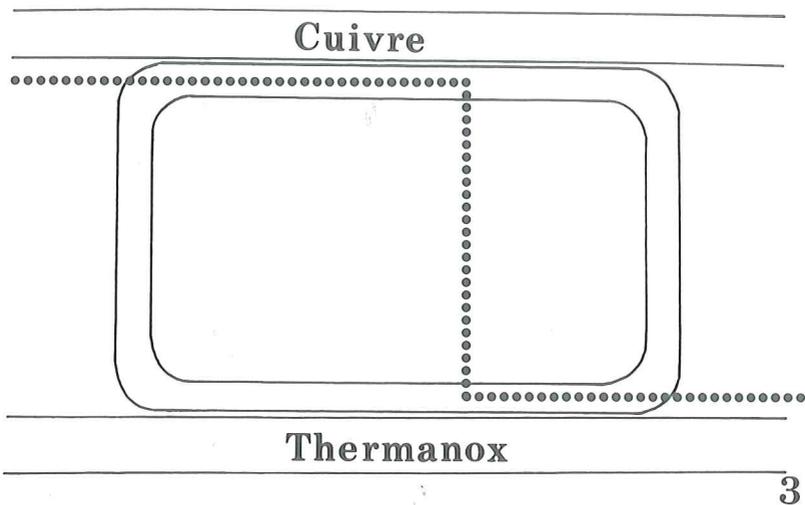


Figure 3 : Exemple de fracture d'une cellule emprisonnée entre son support de culture (thermanox) et le support en cuivre BUO 55

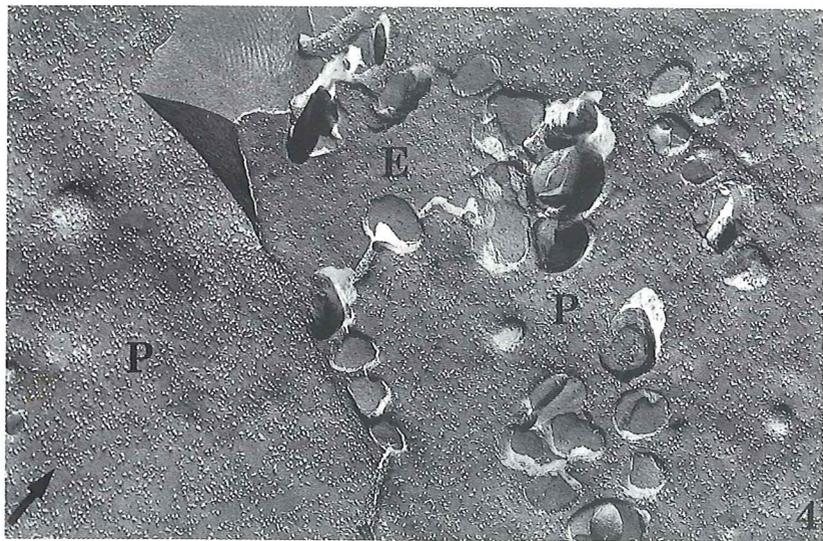


Figure 4 : Réplique de cellule endothéliale de foie de souris récupérée à partir de son support en cuivre. E : face E ; P : face P. G \times 36.000.

du "bas" de la cellule, accolée au thermanox. Si la réplique est récupérée à partir du thermanox, c'est l'inverse. Ainsi, sur la figure 4, qui correspond à une réplique obtenue à partir du cuivre, la face E, pauvre en particules intramembranaires, observable au centre du cliché, provient de la membrane de la cellule non adhérente au substrat, alors que les faces P, présentes de part et d'autre, proviennent de la face opposée de la cellule. Ainsi, en notant simplement l'origine de la réplique (cuivre ou thermanox) on sait à quel niveau de la cellule on se trouve.

L'aspect tridimensionnel obtenu est encore plus frappant sur les images observées à partir d'organe. Prenons comme exemple le tissu hépatique. Sur la figure 5, observée dans le sens de l'ombrage indiqué par la flèche, il est possible de percevoir plusieurs plans en allant de la droite vers la gauche du cliché. Ainsi, les faces P sont toujours plus proches de l'observateur que les faces E. Ce relief est encore mieux perçu à l'aide de clichés stéréoscopiques.

Il nous semble intéressant d'ajouter que cette technique est tout à fait compatible avec des méthodes de marquages cytochimiques ou immunocytochimiques. Ainsi, nous avons récemment (2) localisé le cholestérol dans les membranes des hépatocytes et des cellules sinusoidales en utilisant la filipine comme marqueur (3). Cet antibiotique se lie spécifiquement au cholestérol et aux 3 β hydroxystérols en formant des complexes de 25 nm de diamètre, facilement reconnaissables sur les répliques (Figure 6, encart). Le marquage est réalisé lors de la fixation au glutaraldéhyde, de préférence sur des coupes de tissu (50 μ) faites au vibratome (4). Nous avons ainsi pu montrer que les membranes des hépatocytes contenaient peu de

cholestérol alors que celle des cellules sinusoidales (cellules de Kupffer et cellules endothéliales) en renfermaient beaucoup, ce qui était connu par des travaux biochimiques (5). Cependant la technique de cryofracture a précisé que c'est la face E des membranes des cellules endothéliales qui est la plus marquée (Figure 6).

La cryofracture est la seule méthode, en microscopie électronique, capable d'étudier les phénomènes membranaires avec une telle approche et un tel détail ; elle nous a permis, lors de la formation des fenêtres dans les cellules endothéliales de foie de souris d'élucider ce phénomène de fusion membranaire (6).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N.B., KARNOVSKY M.J., MOOR H., MUHLETHALER K., NORTHCOTE D.H., PACKER L., SATIR B., SATIR P., SPETH V., STAEHLIN L.A., STEERE R.L. & WEINSTEIN R.S. : Freeze-etching nomenclature. *Science*, 1975, **190**, 54-56.
- 2 BINGEN A., MARTIN J.-P., KLEIN F., PESSAH M. : Modification of the amount of cholesterol during hepatic steatosis induced in susceptible and resistant mice infected with MHV₃. A biochemical and ultrastructural study. *Hepatology*, 1992, **15**, n° 6, p. 1137-1146.

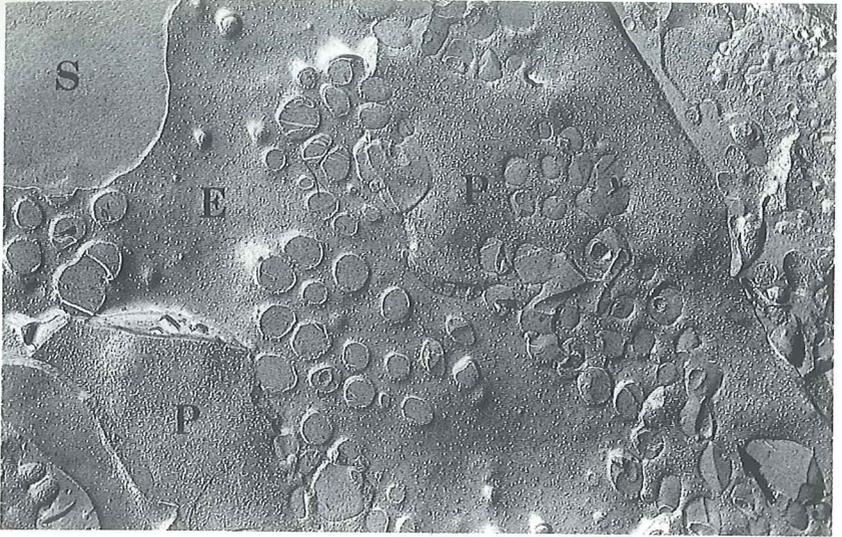


Figure 5 : Réplique de foie de souris. H : hépatocytes ; P : face P ; E : face E ; S : sinusöide. G \times 22.000.

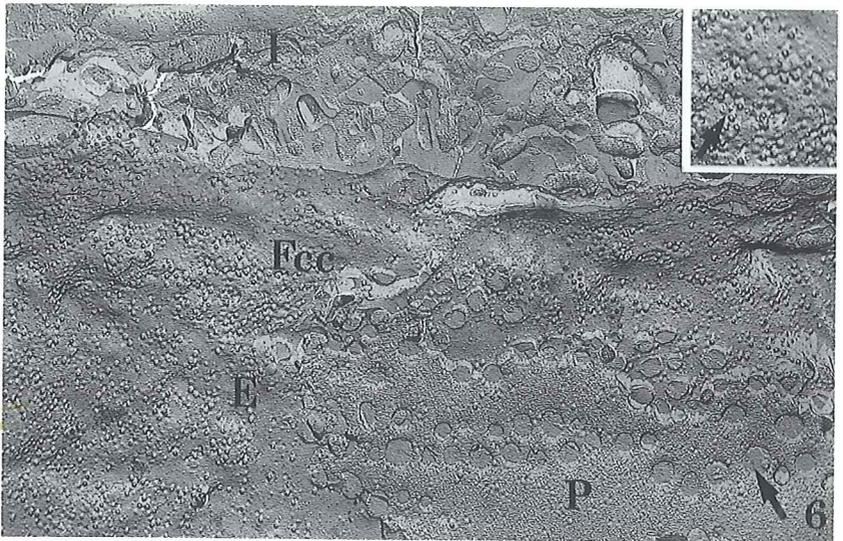


Figure 6 : Réplique de foie de souris après marquage du cholestérol membranaire à la filipine. H : hépatocytes ; P : face P ; E : face E ; FCC : complexe filipine cholestérol. G \times 20.500. Encart 32.000.

- 3 ELIAS P.M., FRIENDS D.S., GOERKE J. : Membrane sterol heterogeneity. Freeze-fracture detection with saponins and filipin. *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, 27, 1247-1260.
- 4 GINSBACH C., FAHIMI H.D. : Labelling of cholesterol with filipin in cellular membranes of parenchymatous organs. Standardization of incubation conditions. *Histochem.*, 1987, 86, 241-248.
- 5 GABELLEC M.M., STEFFAN A.-M., DODEUR M., DURAND G., KIRN A., REBEL G. : Membrane lipids of hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1983, 113, 845-853.
- 6 BINGEN A., GENDRAULT J.-L., KIRN A. : Cryofracture study of fenestrae formation in mouse liver endothelial cells treated with cytochalasin B. *In* : Cells of the hepatic sinusoid, eds Wisse E., Knook D.L., Decker K., Risjwijk, 1989, the Kupffer Cell Foundation, 466-470.

ÉTUDE DE LA STRUCTURE DU VÉGÉTAL A L'AIDE DE TECHNIQUES SIMPLES

Odette ROHFRITSCH

*C.N.R.S. UPR 406, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes,
10 rue du Général Zimmer, 67000 STRASBOURG, France*

INTRODUCTION

Il est possible d'aborder une étude histologique et même cytologique du tissu végétal sans préparation préalable du matériel.

Un microscope, des lames de rasoir, des lames de verre et des lamelles constituent avec les colorants et réactifs le seul matériel nécessaire.

Il est connu depuis les travaux de O'Brien et al. (1) que le bleu de toluidine 0 est un colorant très intéressant des parois végétales. Il colore aussi bien du matériel frais que fixé.

En 1948, Gazet du Chatelier a publié dans les Annales Pharmaceutiques Françaises, la composition d'un réactif destiné à analyser les poudres et les tissus végétaux. Ce réactif, encore appelé réactif lactique, est de manipulation simple, il peut rendre de grands services.

Les deux techniques peuvent être combinées, les coupes traitées dans un premier temps par le réactif de Gazet du

Chatelier, sont ensuite colorées par le bleu de toluidine.

TECHNIQUES

I - Coloration par le bleu de toluidine

1. Composition du colorant

Il suffit de faire dissoudre 0,5 g de bleu de toluidine dans 100 ml d'eau distillée (3). O'Brien et al. préconisent 0,05 % de bleu de toluidine dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 6,8. Personnellement, j'utilise du bleu de toluidine à 1 % dans de l'eau distillée additionnée de borax à 5 %. L'eau et le borax sont chauffés, le bleu de toluidine est ajouté par la suite dans la solution refroidie. Après 24 h la solution est filtrée.

2. Utilisation du colorant

Les sections entre 20 et 50 μm d'épaisseur sont faites à main levée sur le matériel frais à analyser. Les sections sont

déposées dans une goutte d'eau pendant 1-2 minutes. Les meilleures sections sont déposées pendant 2 minutes dans une goutte de colorant. Elles sont ensuite lavées puis montées entre lame et lamelle dans une goutte d'eau.

3. Résultats

Les parois pecto-cellulosiques des cellules végétales sont colorées en rose ou rose-rouge. Les parois lignifiées des cellules du bois ou des fibres sont colorées en vert ou bleu vert. L'amidon et la callose restent incolores.

II - Coupes traitées par le réactif de Gazet du Chatelier

1. Composition du mélange

- acide lactique pur	60 ml
- acide lactique saturé à froid de Soudan III filtré	45 ml
- sulfate d'aniline	1,1 g
- iode bisublimé	0,1 g
- iodure de potassium	1 g
- alcool absolu	10 ml
- acide chlorhydrique concentré pur	6 ml
- eau distillée	80 ml

2. Mode de préparation du mélange

1) Saturer à froid l'acide lactique + Soudan III (plusieurs jours sont nécessaires).

2) Mélanger les 2 acides lactiques dans un ballon de 500 ml.

3) Faire dissoudre à part le sulfate d'aniline dans 70 ml d'eau distillée à chaud (sans faire bouillir). Laisser refroidir, filtrer ce liquide en le recevant dans le ballon contenant 105 ml d'acide lactique. Mélanger par agitation.

4) Faire dissoudre l'iodure de potassium dans 10 ml d'eau, y ajouter l'alcool puis l'iode. Agiter. Après dissolution, verser dans le ballon.

5) Ajouter dans le ballon 6 ml d'HCl fumant. Agiter.

Le réactif peut être immédiatement utilisé, il se conserve indéfiniment.

3. Mode d'emploi du réactif

Les coupes, d'environ 50 µm d'épaisseur, de matériel frais sont effectuées à l'aide d'une lame de rasoir neuve. Elles sont recueillies immédiatement sur une lame dans une goutte du réactif. Les meilleures coupes (les plus fines) sont sélectionnées, elles sont montées entre lame et lamelle dans le même réactif. Pour accélérer la réaction, on peut chauffer quelques instants à feu nu ou sur un plateau chauffant jusqu'à dégagement de bulles gazeuses.

4. Propriétés du réactif

Les tissus deviennent progressivement transparents, le chauffage de la préparation accélère le processus. En même temps, il y a macération cellulaire partielle : il est possible de dissocier les différentes couches cellulaires du tissu et de séparer les cellules les unes des autres. Les parois lignifiées des cellules du bois et des fibres sont colorées en jaune paille par le sulfate d'aniline. La cuticule et la paroi subérisée sont colorées en rouge-brun par le Soudan III. De même, toutes les graisses, huiles, essences, résines et latex sont colorés en orange. L'amidon se colore en violet par l'iode. Le cytoplasme, le noyau et les parois pecto-cellulosiques restent incolores, les cellules deviennent transparentes.

III - Coupes traitées par le réactif de Gazet du Chatelier puis colorées par le bleu de toluidine

1. Mode d'emploi

Les coupes sont effectuées dans une goutte du réactif de Gazet de Chatelier et conservées trente à soixante minutes entre lame et lamelle. Les coupes sont légèrement écrasées, les tissus et les cellules sont partiellement dissociées, ceci en tapotant légèrement sur la lamelle à l'aide d'un crayon. La lamelle doit être maintenue en place pendant cette opération.

Puis la lamelle est enlevée, le réactif lactique est épongé à l'aide d'un papier absorbant. Une goutte de bleu de toluidine est déposée sur le matériel resté en place. Si un précipité apparaît, le bleu de toluidine est épongé et remplacé. Après deux minutes de contact avec le bleu de toluidine, une lamelle propre est appliquée sur le matériau d'étude. On peut continuer à tapoter sur la lamelle, ce qui provoque le départ du bleu de toluidine de la préparation et continue à dissocier les cellules. La préparation doit être observée immédiatement, elle sera observée 30 minutes plus tard, elle se conservera quelques heures ou quelques jours dans une enceinte humide.

2. Résultats

Les tissus perdent de leur transparence, mais les cellules préalablement traitées au réactif de Gazet du Chatelier et écartées les unes des autres, deviennent facilement accessibles au bleu de toluidine. Les noyaux se colorent en premier : ils sont bleu-violet, le nucléole est violette-rose, les chloroplastes sont verdâtres, l'amidon qu'ils renferment est bleu-violacé. Les tannins et les lignines se

colorent en vert foncé. Les tissus nécrosés deviennent bleu-vert foncé, ils prennent plus vite le colorant que les tissus sains. Les huiles et les graisses sont orange-brun, les parois pecto-cellulosiques sont roses.

Cette technique demande un peu plus d'expérience et de doigté que l'utilisation du bleu de toluidine ou du réactif seuls, mais elle permet des observations cytologiques très fines. Elle permet de suivre la différenciation cellulaire, d'observer d'éventuelles anomalies ou irrégularités dans un tissu, d'étudier la surface d'un organe : les cellules épidermiques, stomates et poils. Toute cellule nécrosée est immédiatement décelée. La technique permet de localiser sur la plante ou dans la plante les hyphes d'un champignon. Elle est intéressante pour localiser les pièces buccales des insectes piqueurs dans les tissus végétaux. Il est même possible de localiser et de disséquer les gaines salivaires que le puceron laisse dans les tissus. L'analyse de la distribution de ces gaines salivaires nous renseigne sur le comportement alimentaire du puceron (4).

Il est bon de photographier la coupe avant de provoquer une dissociation des cellules dans le réactif de Gazet du Chatelier, de sorte à pouvoir relocaliser les cellules observées par la suite dans leur tissu d'origine.

Produits utilisés

- Soudan III Merck
- Sulfate d'aniline pur Prolabo
- Iode ioduré Recta pur Prolabo
- Iodure de potassium Norma pur Prolabo
- Acide lactique pur 99 % Prolabo
- Acide chlorhydrique 37 % Prolabo

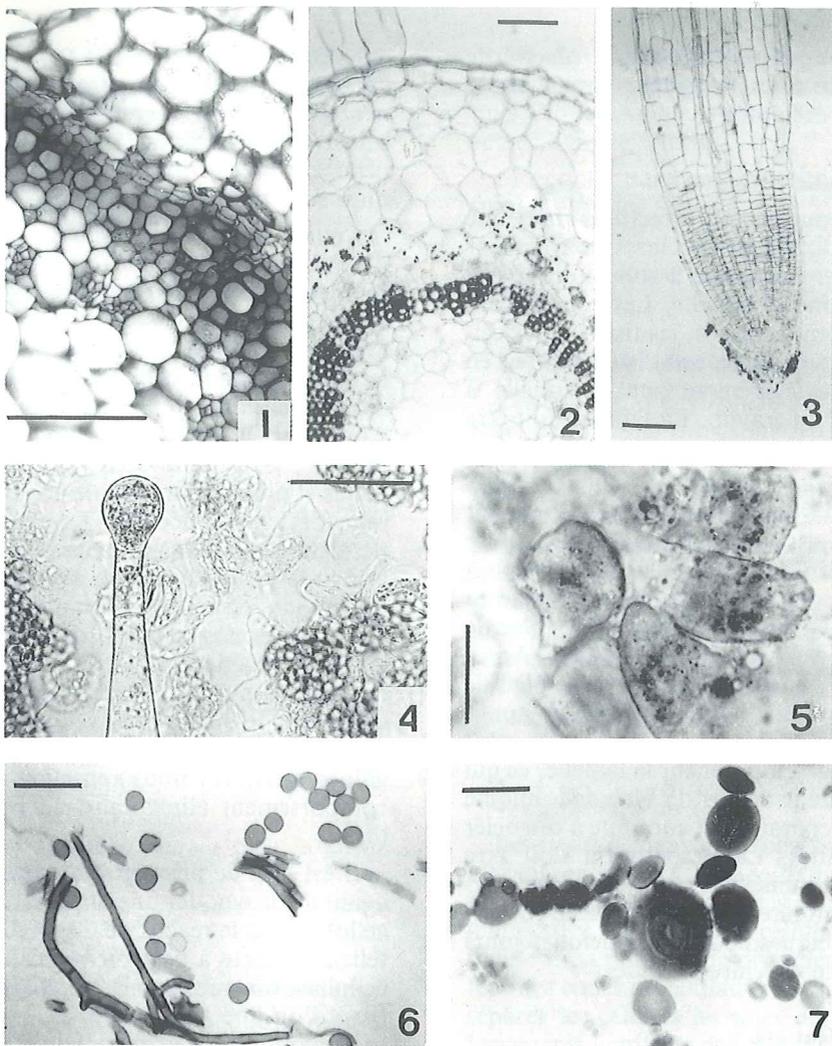


Figure 1 : Portion de couronne vasculaire dans une section de la tige de tabac. Bleu de toluidine : le bois est coloré en bleu vert, le liber et les cellules du parenchyme sont roses.

Figure 2 : Section de jeune tige de tabac. Réactif de Gazet du Chatelier. Le bois est coloré en jaune et les grains d'amidon en bleu-violet. Le reste du tissu est incolore et transparent.

Figure 3 : Jeune racine de tabac (Réactif de Gazet du Chatelier).

Figure 4 : Cellules épidermiques (stomates et poil glandulaire) et quelques cellules du mésophylle de la feuille de tabac (Réactif de Gazet du Chatelier suivi par le bleu de toluidine).

Figure 5 : Cellules d'embryon de blé ou germe de blé. Réactif de Gazet du Chatelier suivi du bleu de toluidine.

Figure 6 : Spores et hyphes de champignon sur l'épiderme de la gaine foliaire du roseau. Réactif de Gazet du Chatelier.

Figure 7 : Grains d'amidon du blé. Réactif de Gazet du Chatelier.

La barre représente 100 μm pour les figures 1-4 et 10 μm pour les figures 5-7

CONCLUSION

Les techniques histologiques présentées sont appliquées sur du matériel végétal frais. Les deux premières techniques permettent d'étudier les structures et la composition des tissus, la dernière nous renseigne sur la cellule. Ces techniques sont complémentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 O'BRIEN T.P., FEDER N & McCULLY M.E. : Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue 0. *Protoplasma*, 1964, 59, n° 2, 367-373.
- 2 GAZET DU CHATELIER G. Un nouveau réactif pour l'analyse des poudres et des coupes végétales. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 1948, VI, 35.
- 3 MARTOJA R. & MARTOJA M. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson, Paris, 1967.
- 4 ROHFRI TSCH O. Behavior and biology of two aphid species related to gall morphogenesis. In *Proc. 5th Int., Symp., Insect-Plant Relationships*, 431-432. Pudoc, Wageningen, 1982.

LES CONCRÉTIONS MINÉRALES DE LA GLANDE PINÉALE DU RAT AGÉ : MÉTHODES D'ÉTUDE ET SIGNIFICATION PHYSIOLOGIQUE

W. HUMBERT (1), F. CUISINIER (2), P. PEVET (1)

(1) *Université Louis Pasteur, CNRS-URA 1332,
Neurobiologie des fonctions rythmiques et saisonnières, Laboratoire de Zoologie,
12, rue de l'Université, 67000 STRASBOURG*

(2) *Université Louis Pasteur, Centre de Recherches odontologiques,
INSERM U157, 1 place de l'Hôpital, 67000 STRASBOURG*

INTRODUCTION

La glande pinéale, située au-dessus du toit du diencephale joue un rôle important - via le rythme de sécrétion de mélatonine - dans l'intégration et la transmission de l'information photopériodique. Les glandes pinéales des rats âgés et adultes contiennent des concrétions minérales alors que les rats jeunes en sont dépourvus.

Le but du travail est d'examiner ces concrétions par différentes techniques : Microscopie électronique à transmission (MET), Microscopie électronique à balayage (MEB), Microanalyse, Micro-

diffraction et Microscopie électronique à haute résolution (MEHR).

L'étude des différents mécanismes de formation devrait permettre de comprendre le rôle physiologique de ces concrétions.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Animaux

Cinq rats Wistar mâles jeunes (2-3 mois) et cinq rats âgés (28 mois), maintenus en conditions photopériodiques 12L/12D, avec libre accès à la nourriture et à la boisson, ont été sacrifiés à 9 h.

- Microscopie électronique à transmission - Microanalyse

Après dissection les glandes pinéales ont été fixées dans la glutaraldéhyde à 3 % dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M et traitées pour la microscopie électronique conventionnelle. Pour la localisation du calcium la méthode du pyroantimonate de potassium a été utilisée (1). La microanalyse a été réalisée avec le microanalyseur CAMEBAX-TEM (CHU Créteil) utilisant les spectromètres en dispersion de longueur d'onde PET. Conditions d'analyse : 45 kV ; 150 nA : Ø de sonde 100-200 nm ; temps de comptage : 50 sec.

- Diffraction électronique

La diffraction électronique a été réalisée sur un microscope électronique JEOL 100B sous une tension de 100 kV. Les références ont été obtenues à l'aide de grilles témoins (LiF). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une règle de précision Siemens (Siemens type 941, Erlangen). L'indexation a été réalisée à l'aide des fichiers ASTM.

- Microscopie électronique à balayage (MEB) - Microanalyse

Les glandes pinéales ont été congelées dans un mélange de propane liquide (80 %) et d'isopentane (20 %) refroidi à l'azote liquide. Les fractures du tissu réalisées sur un support en laiton refroidi à l'azote liquide ont été lyophilisées à basse température (-90°C) sous un vide de 3.10^{-5} T. Les pièces ont été carbonées ou métallisées à l'Au/Pd et observées au microscope à balayage Philips PSEM 501B (Unité INSERM U61, Strasbourg-Hautepierre). Les analyses élémentaires du tissu et des concrétions ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre en disper-

sion d'énergie (Link System, series 2) ; conditions d'analyse : 20 kV ; courant de sonde : 20 µA. Les comptages semi-quantitatifs sont exprimés sous la forme de cps/50 sec et concernent la somme des émissions calcium des compartiments tissulaires intra et extracellulaires (2).

- Microscopie électronique à haute résolution (MEHR) - Simulation informatique

Des coupes ultrafines déposées sur grilles recouvertes de membranes de carbone trouées ont été observées au MEHR Philips EM 430 sous une tension de 300 kV (Centre de recherches odontologiques, Strasbourg).

Les simulations informatiques ont été réalisées à l'aide d'un ordinateur Silicon Graphics 4d/25 et du programme EMS (3).

RÉSULTATS

Des concrétions minérales sont présentes dans la glande pinéale chez le rat adulte et âgé exclusivement et se présentent sous la forme cristalline ou amorphe. Leur taille varie de 0,5 µm à 15 µm (Figures 1, 2). La forme cristalline généralement intracellulaire est constituée de couches concentriques de microcristaux de 30 à 40 nm en longueur et d'un diamètre de 4 à 5 nm (Figure 3). Par microanalyse X la composition élémentaire minérale et en oligoéléments a pu être déterminée. Il s'agit essentiellement de S, P, Ca, Fe, Cu, Zn. La diffraction électronique permet de mettre en évidence la symétrie cristalline typique des différents phosphates de calcium (Figure 5). La forme amorphe, située le plus souvent dans l'espace périvasculaire est constituée

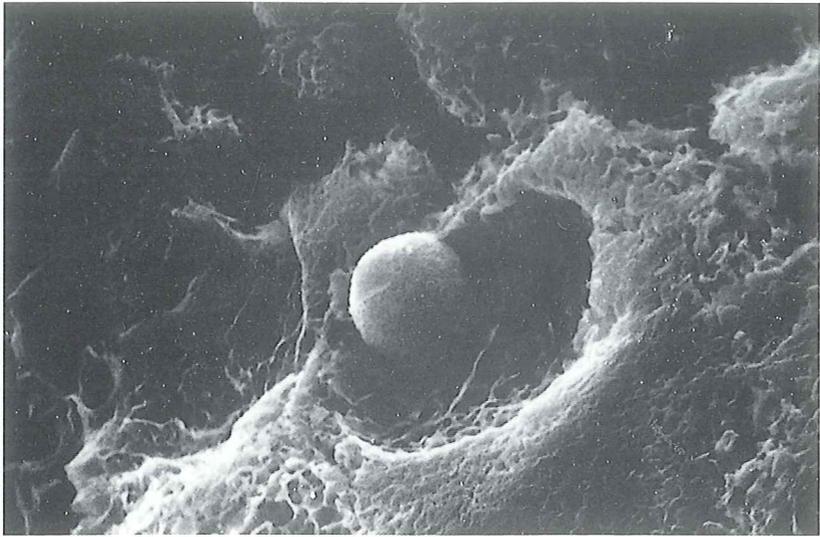


Figure 1 : Concrétion dans une vacuole de pinéaloocyte observée au M.E.B. X 2500.

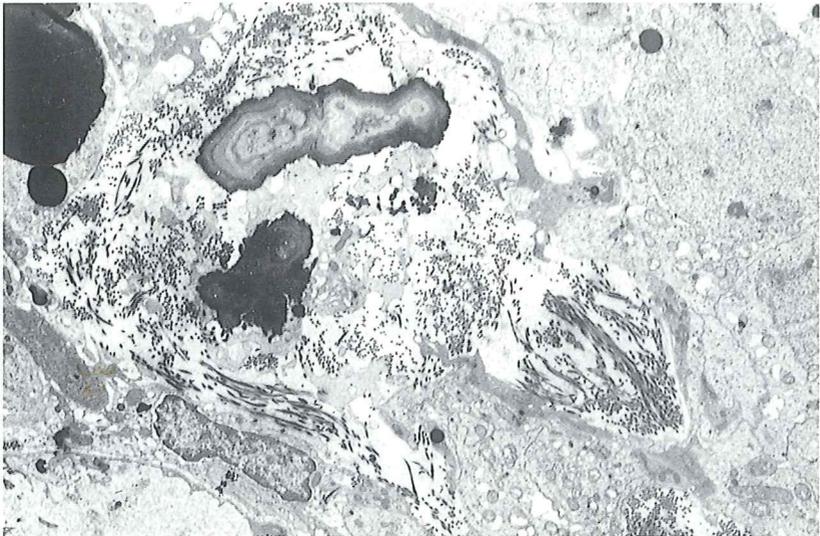


Figure 2 : Concrétion amorphe dans l'espace extracellulaire entourée de collagène. X 6200.



Figure 3 : Concrétion intracellulaire à structure cristalline. X 42000.

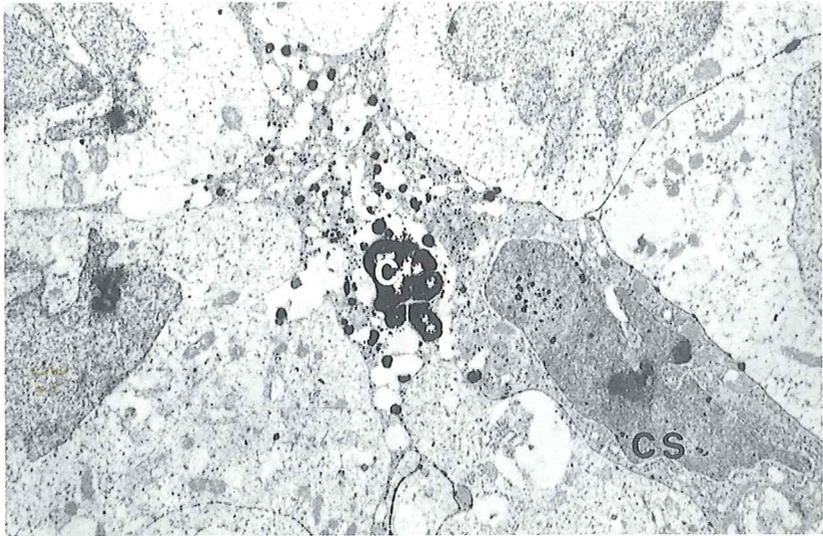


Figure 4 : Cellule sombre (cs) riche en précipités de pyroantimonate de K avec concrétions (c) en formation. X 8000.

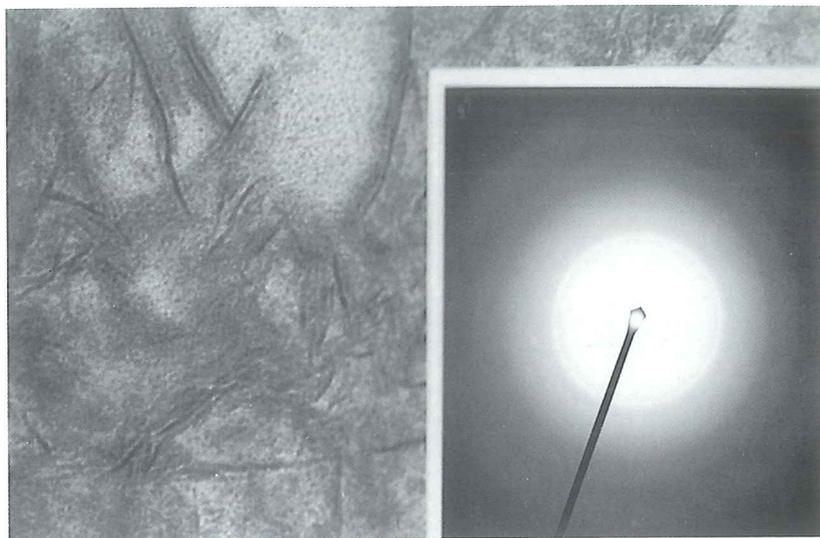


Figure 5 : Agrandissement des cristaux et cliché de diffraction électronique caractéristique de phosphate de calcium. X 160000.

de couches concentriques alternativement denses et claires (Figure 2).

La forme cristalline a été observée avec un microscope électronique à haute résolution (Figure 6) ; grâce au pouvoir de résolution de $1,9 \text{ \AA}$ il a été possible d'observer la structure du cristal dans sa maille élémentaire. La correspondance entre les images simulées et les images expérimentales observées le long des directions cristallographiques (2,2,1) permet de conclure que ces cristaux ont une structure identique à celle de l'hydroxyapatite. Par la technique du pyroantimonate de potassium il est possible de localiser le calcium à l'échelle ultrastructurale. Plusieurs observations peuvent être faites :

- de nombreuses cellules sombres, dont certaines présentent des signes de

dégénérescence contiennent des quantités importantes de calcium (Figure 4). La présence de calcium est confirmée par microanalyse,

- de nombreux organites intracellulaires (vésicules, vacuoles, mitochondries, lipides, lipopigments) sont caractérisés par des précipités de calcium et sont impliqués dans la genèse de nouvelles concrétions. La présence de soufre suggère que le noyau des concrétions formé de substances protéiques est la structure sur laquelle vont se fixer de nouvelles couches minérales.

DISCUSSION

Les concrétions minérales de la glande pinéale, dont le nombre augmente avec l'âge, ont été signalées chez l'Homme (4).

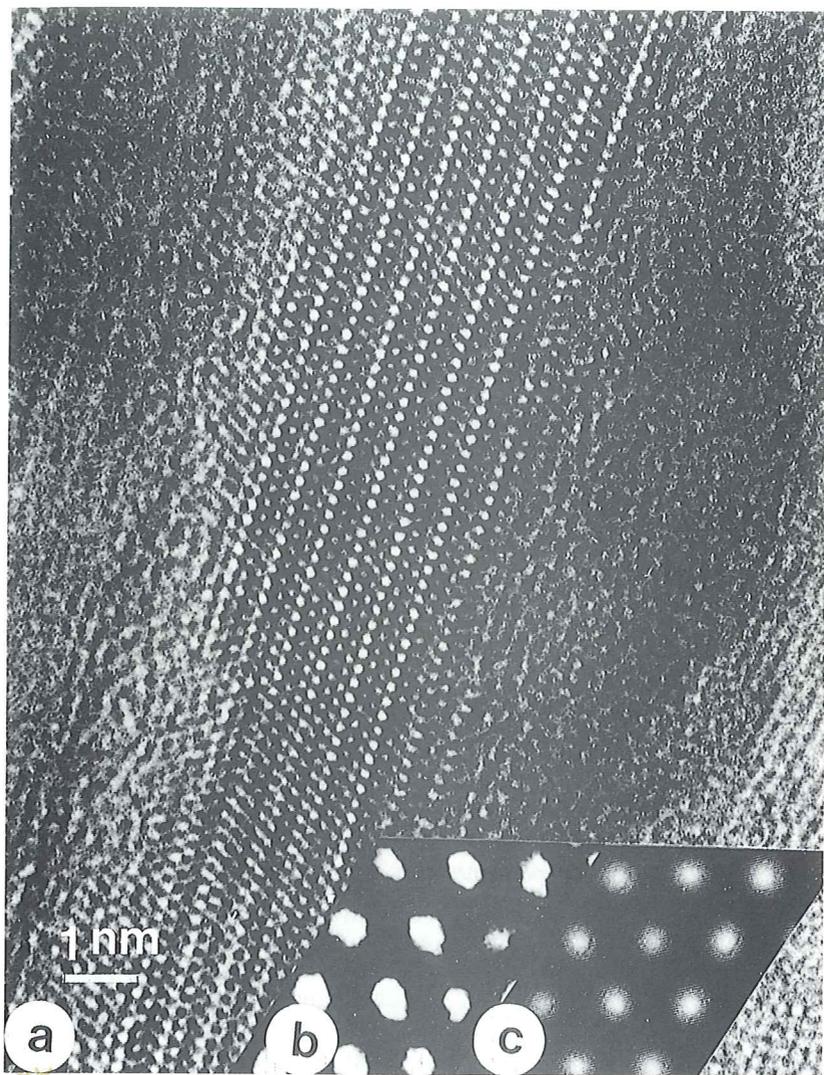


Figure 6 : Image de Microscopie électronique à haute résolution montrant la structure typique des cristaux d'hydroxyapatite (a) la diffraction optique du cristal (b) et l'image simulée informatique (c).

Chez la gerbille les concrétions sont en rapport avec l'activité fonctionnelle de la glande (5). L'apparition des concrétions chez les rats adultes et âgés a pu être mise en relation avec la concentration de calcium de la glande pinéale (2). L'utilisation conjointe de différentes techniques d'analyse a permis de localiser et d'analyser les concrétions minérales.

La microscopie électronique à haute résolution en particulier, grâce à son pouvoir de résolution de $1,9 \text{ \AA}$ a permis d'étudier la maille élémentaire des cristaux. De petite taille, ils ressemblent aux cristaux de l'émail foetal humain (6) et ont une structure cristalline correspondant à celle de l'hydroxyapatite.

De nombreuses accumulations de matériel dense, riche en calcium ont été observées dans différents organites intracellulaires, vésicules, vacuoles, mitochondries, granules lipidiques, lipopigments qui pourraient jouer un rôle dans la genèse des concrétions.

Krstic (7) suggère que la Ca ATP ase membranaire dont la concentration diminue sur les membranes des pinéalocytes était incapable d'éliminer le calcium de la cellule et favorisait ainsi la genèse des concrétions.

La croissance par voie extracellulaire a été suggérée par Lukaszyk et Reiter (5), les cellules dégénérées ou des produits de sécrétion pouvant être à l'origine des calcifications.

Chez le rat âgé, les cellules sombres de la glande pinéale, perméables au lanthane (8) et au calcium (en préparation) peuvent donc être à l'origine de cette genèse. De nombreux organites cytoplasmiques en particulier les mitochondries

sont capables de stocker le calcium. Le collagène abondant dans l'espace extracellulaire des rats adultes et âgés est capable d'accumuler calcium et phosphore. Son rôle inducteur de la nucléation dans la minéralisation a été démontré (11, 12).

Les concrétions de la glande pinéale du rat âgé apparaissent donc formées de phosphates de calcium, existant sous la forme amorphe ou sous une forme cristalline proche de celle de l'hydroxyapatite. Leur genèse semble se réaliser dans les pinéalocytes sombres.

CONCLUSION

Cette étude montre que la calcification de la glande pinéale est un phénomène complexe. Plusieurs questions restent pour l'instant posées :

1) ces concrétions sont-elles :

a) des indicateurs d'activité sécrétoire similaire à celle observée dans la glande pinéale de la gerbille (5) ?

b) des indicateurs d'une accumulation active de calcium et de matériel organique (7) ?

c) des indicateurs d'une minéralisation postérieure à une dégénérescence ou à la mort des pinéalocytes ?

2) une augmentation de la calcification de la glande pinéale (liée au phénomène de vieillissement) entraîne-t-elle une diminution de l'activité fonctionnelle de la glande ou la calcification est-elle une conséquence de la diminution de l'activité de la glande pinéale (production nocturne de mélatonine par exemple) ?

BIBLIOGRAPHIE

- 1 EISENMAN D.R., ASRAFI S., NIEMAN A. : Calcium transport and the secretory ameloblast. *Anat. Rec.* 1979, **193**, 403-422.
- 2 HUMBERT W., PEVET P. : Calcium content and concretions of pineal glands of young and old rats. A scanning and X-ray microanalytical study. *Cell Tiss. Res.* 1991, **263**, 593-596.
- 3 STADELMAN P. : EMS-A Software for electron diffraction analysis and HREM image simulation in material science. *Ultramicroscopy*, 1987, **19**, 253-266.
- 4 WILDI E., FRAUCHIGER E. : Modifications histologiques de l'épiphyse humaine pendant l'enfance, l'âge adulte et le vieillissement. *Prog. Brain Res.* 1965, **10**, 218-233.
- 5 LUKASZYK A., REITER R.J. : Histophysiological evidence for the secretion of polypeptides by the pineal gland. *Am. J. Anat.* 1975, **143**, 451-464.
- 6 CUISINIER F.J.G., STEUER P., FRANK R.M., VOGEL J.-C. : High resolution electron microscopy of young apatite crystals in human fetal enamel. *J. Biol. Buccale*, 1990, **18**, 149-154.
- 7 KRSTIC R. : Ultracytochemical localisation of calcium in the superficial pineal gland of the Mongolian gerbil. *J. Pineal Res.*, 1985, **2**, 21-37.
- 8 HUMBERT W., PEVET P. : Permeability of the pineal gland of the rat to lanthanum : the significance of dark pinealocytes. *J. Pineal Res.*, 1992, **12**, 84-88.
- 9 GLIMCHER M.J. : Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone. *Rev. Mod. Phys.*, 1959, **31**, 359-393.
- 10 GLIMCHER M.J. : Mechanism of calcification : role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat. Rec.* 1989, **224**, 139-153.

LES ANTICORPS ANTI-THROMBOMODULINE INDUISENT UNE ENDOCYTOSE MÉDIÉE PAR RÉCEPTEUR SUR DES CELLULES ENDOTHÉLIALES HUMAINES

C. BRISSON*, G. ARCHIPOFF*, M.-L. HARTMANN*, D. HANAU**,
A. BERETZ¹, J.-M. FREYSSINET², M. FABRE³, J.-P. CAZENAVE*

* *INSERM U.311, Biologie et Pharmacologie des Interactions du Sang
avec les Vaisseaux et les Biomatériaux*

** *Laboratoire d'Histocompatibilité, Centre Régional de Transfusion Sanguine,
STRASBOURG, France*

¹ - A. Beretz, Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire,
Faculté de Pharmacie, ILLKIRCH, France

² - J.-M. Freyssinet, Institut d'Hématologie et d'Immunologie,
Faculté de Médecine, STRASBOURG, France

³ - M. Fabre, Service Central de Microscopie Electronique,
Faculté de Médecine, STRASBOURG, France

INTRODUCTION

La thrombomoduline (TM), glycoprotéine membranaire présente à la surface des cellules endothéliales (CE), est un des récepteurs spécifiques de la thrombine. Elle possède une fonction anticoagulante : la thrombine liée à la TM permet l'activation de la protéine C, intervenant finalement dans l'inhibition de génération de thrombine. La TM est synthétisée et exprimée par les CE *in vivo*, détec-

tée sur les mégacaryocytes et les plaquettes. Elle peut être purifiée à partir de placentas humains. Sa structure est connue, l'ADNc cloné et le gène présente la particularité d'être dépourvu d'introns. La protéine est organisée en trois domaines : cytoplasmique (C-terminal), transmembranaire hydrophobe et extracellulaire. La grande homologie de séquence démontrée avec la lipoprotéine de faible densité (L D L) pourrait expliquer une fonction biologique dans le phénomène

d'endocytose (1). Le devenir du complexe thrombine-TM reste controversé : internalisation (2) ou maintien de son activité fonctionnelle d'activation de la protéine C (3).

L'étude de l'interaction des cellules endothéliales humaines avec la thrombine et/ou les anticorps anti-TM a été réalisée au microscope électronique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les anticorps anti-TM sont obtenus chez le lapin (4). Les anticorps sont caractérisés par 3 méthodes différentes :

- méthode d'Ouchterlony contre du plasma normal : pas de protéine plasmatique détectée,

- après électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS et transfert sur nitrocellulose : les anticorps anti-TM visualisent une bande majeur Mr 75.000,

- la spécificité est analysée par une méthode ELISA en présence de TM purifiée ou d'albumine bovine, de même que pour les fragments Fab des anticorps anti-TM : une réaction n'est observée qu'en présence de TM. Les fragments Fab seront les seuls employés au cours de ce travail.

- Couplage à l'or colloïdal

Les billes d'or colloïdal, 5 ou 15 nm de diamètre, sont préparées comme décrit par Frens (5). La thrombine dont le site actif est bloqué (Phe-Pro-Arg-CH₂Cl-thrombine) est couplé à des billes d'or de 5 nm, les fragments Fab d'anticorps anti-TM à des billes d'or de 15 nm.

- Cellules endothéliales

Les CE sont préparées comme précédemment décrit (6) : elles proviennent de veines saphènes humaines et sont cultivées en présence de 30 % de sérum humain dans des boîtes de Pétri de 35 mm préalablement recouvertes de fibronectine.

- Immunocytochimie

Pour la microscopie photonique, la méthode "indirecte" permet de détecter la TM dans les CE par immunofluorescence : les cellules sont fixées en paraformaldéhyde - glutaraldéhyde (2 % - 0,05 %), perméabilisées par du Triton X-100 0,1 %, 4 min, puis incubées avec les anticorps spécifiques et complémentaires fluorescents.

Pour l'étude en microscopie électronique, les CE sont incubées en milieu sans sérum de 1 à 30 min à 37°C avec les protéines ou les anticorps couplés à l'or colloïdal. Après incubation, les cellules sont fixées en glutaraldéhyde 1,25 % en tampon phosphate 0,1 M pH 7,2, 30 min. Elles sont ensuite postfixées en acide osmique 1 %, 1 heure à 4°C, puis préparées pour une inclusion en Epon. Les coupes ultra-fines sont contrecolorées en acétate d'uranyle et citrate de plomb, puis observées sur un M.E. Siemens Elmiskop 102.

RÉSULTATS

L'étude en immunofluorescence montre que la TM est localisée dans la zone de l'appareil de Golgi et autour du noyau, sous forme d'un fin marquage (Figure 1). Ce marquage est spécifique des CE, il n'est pas retrouvé au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires,

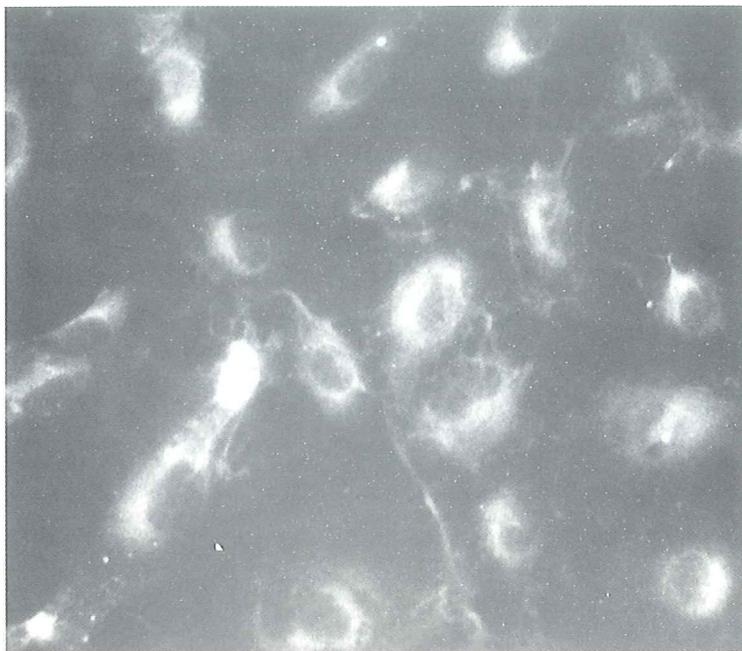


Figure 1 : **Thrombomoduline dans les CE par immunofluorescence ($\times 40$).**

des fibroblastes ou des capillaires de cerveau humain (communication personnelle).

L'étude en microscopie électronique montre que dès la première minute d'incubation, les anticorps anti-TM sont associés aux vésicules recouvertes ("coated pits") (Figure 2a). Après 5 min. d'incubation, le marquage se trouve autant au niveau membranaire qu'au niveau des "coated pits" et apparait maximal, tandis qu'après 10 min. d'incubation, le marquage est visible au niveau des endosomes. Aucun marquage intracellulaire n'est retrouvé après incubation à 4°C, inhibant le phénomène d'endocy-

tose médiée par récepteur (RME). L'incubation de fragments Fab d'IgG non immunes, couplés aux mêmes billes d'or, se traduit par aucun marquage, même si l'incubation est prolongée (Figure 2b). Ce résultat permet d'exclure le rôle des billes d'or comme initiateur du phénomène de RME observé.

Une nette diminution du marquage (environ 70 %) est observée avec les anticorps anti-TM couplés à l'or, si les cellules sont préalablement incubées avec de la thrombine active. L'incubation de cellules avec de la thrombine couplée à l'or 5 nm montre un marquage réparti sur la membrane cellulaire, en dehors des "coa-

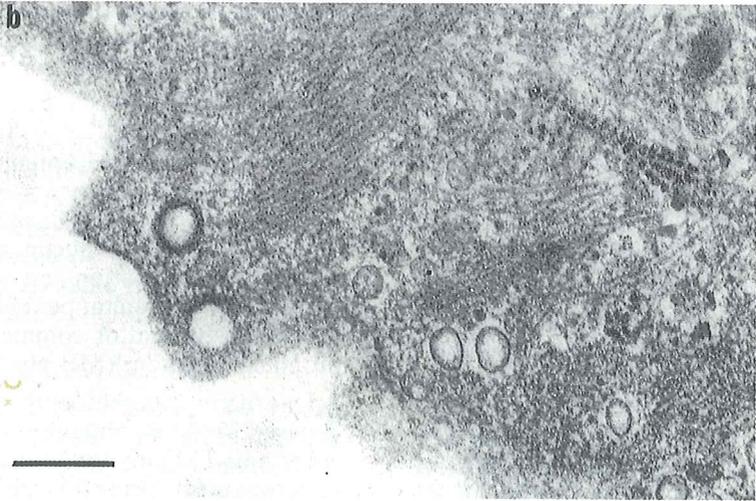
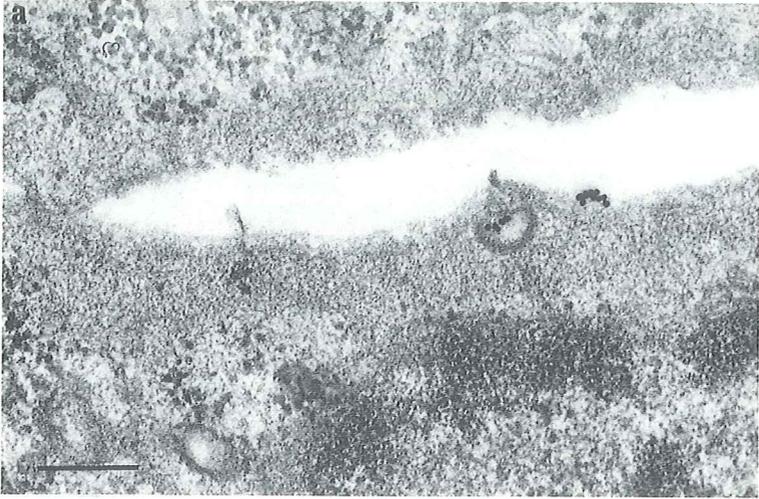


Figure 2 : a : Marquage des "coated pits" par les anticorps anti-TM.
b : Contrôle : aucun marquage par IgG non immunes.

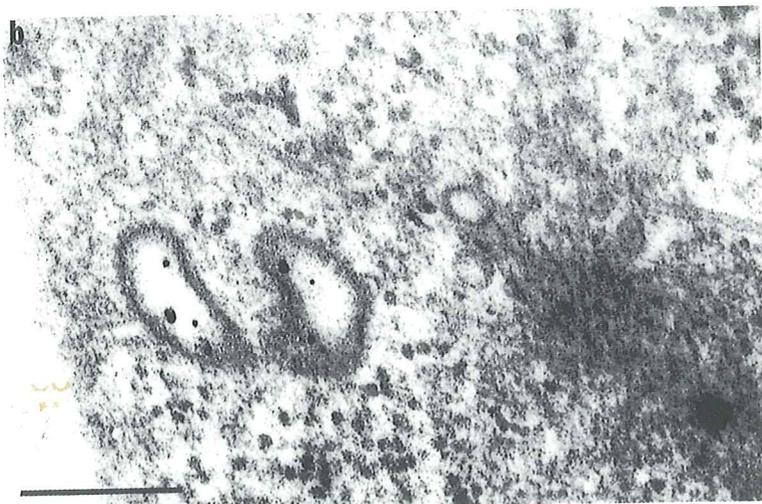
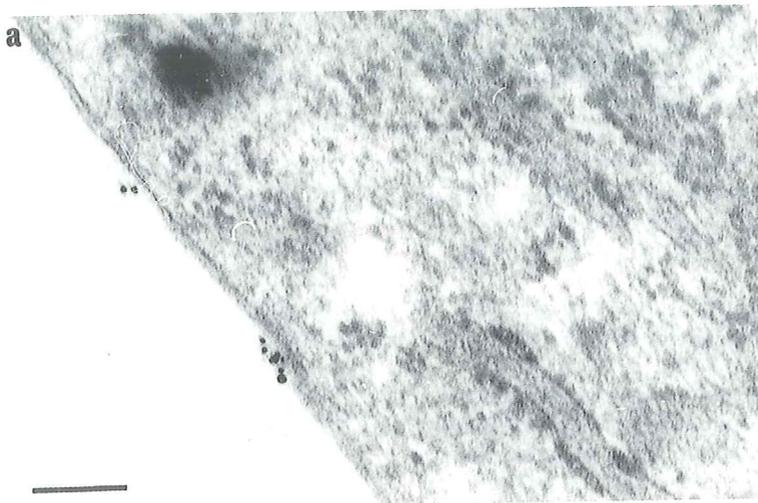


Figure 3 : Double marquage : anticorps anti-TM or 15 nm et thrombine-or 5 nm
a : Présence du double marquage au niveau "coated pit"
b : Cointernalisation dans "coated vesicles".

ted pits'', sans internalisation ni observation du processus de RME.

Dans des expériences de double marquage, l'incubation des cellules en présence de thrombine - or 5 nm et fragments Fab d'anticorps anti-TM - or 15 nm a montré qu'il n'y a internalisation de la thrombine qu'en présence des anticorps anti-TM (Figures 3a et b).

DISCUSSION

La thrombine est une sérine protéase multifonctionnelle. Sa spécificité s'applique particulièrement aux phénomènes de l'hémostase : son interaction avec le fibrinogène, les facteurs V, VIII, XI et XIII de la coagulation, les plaquettes, se traduit par la coagulation sanguine. En même temps, la thrombine se lie très rapidement aux CE, provoquant différentes réponses biologiques comme la sécrétion du facteur Willebrand. Seuls certains sites de la liaison de la thrombine ont été indentifiés : 1) un récepteur faisant partie de la famille des récepteurs présentant des domaines transmembranaires ; 2) un site de liaison covalente comparable à la protéase nexine 1 des plaquettes ou des fibroblastes ; 3) la thrombomoduline qui représente 60 % des sites de liaison de la thrombine sur les CE (environ 40.000 sites/cellule).

Le site catalytique de l'enzyme n'est pas nécessaire à la liaison de la thrombine sur la TM ; thrombine active ou bloquée se lie aussi efficacement à la TM. Qu'advient-il du complexe thrombine-TM ainsi formé sur la membrane des CE ? Certains auteurs (2) décrivent une internalisation du complexe en utilisant des anticorps monoclonaux. D'autres (3) montrent que l'activité TM (l'activation de la protéine C) est maintenue durant

plus de 2 heures avec des cellules en culture. Les observations publiées par ces derniers auteurs (Beretz *et al.*) sont confirmées par cette étude en M.E. des CE de veine saphène en présence des anticorps anti-TM associés ou non à la thrombine. Après incubation des CE avec la thrombine couplée à l'or colloïdal, les particules d'or colloïdal restent fixées au niveau de la membrane plasmique sans que l'on observe leur internalisation. Par contre, la présence d'anticorps anti-TM conduit à la cointernalisation de la thrombine et du complexe TM-anticorps anti-TM. Ce résultat est spécifique du phénomène de RME : les molécules rentrent dans la cellule, sans toutefois que les mécanismes soient clairement connus. Dans cette étude, nous avons observé que la thrombine seule ne peut induire le processus de RME. La fixation des anticorps anti-TM sur la TM induit ce processus comme les expériences de double marquage le montrent.

En conclusion, nous avons émis l'hypothèse que certains autoanticorps, dirigés contre les CE, pourraient être spécifiques de la TM. Dans ce cas, l'internalisation de la TM conduisant à une diminution de l'activité de la voie de la protéine C, pourrait favoriser les accidents thrombotiques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions spécialement Jean-Claude Garaud pour ses précieux conseils dans le couplage des protéines à l'or colloïdal, Patricia Bos pour les tirages photographiques et Marie-Christine Geyer et Marinette Voyat pour la frappe du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 GOLDSTEIN J.-L., BROWN M.S., ANDERSON R.G.W., RUSSELL D.W. & SCHNEIDER W.J. : Receptor-mediated endocytosis. Concepts emerging from the LDL receptor system. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 1984, **1**, 1-39.
- 2 MARUYAMA I. & MAJERUS P.W. : The turnover of thrombin-thrombomodulin complex in cultured human umbilical vein endothelial cells and A549 lung cancer cells. Endocytosis and degradation of thrombin. *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**, 15432-8.
- 3 BERETZ A., FREYSSINET J.-M., GAUCHY J., SCHMIDT D.A., KLEINSOYER C., EDGELL C.J.S. & CAZENAVE J.-P. : Stability of the thrombin-thrombomodulin complex on the surface of endothelial cells from human saphenous vein or from the cell line EA. hy 926. *Biochem. J.*, 1989, **259**, 35-40.
- 4 FREYSSINET J.-M., BRAMI B., GAUCHY J. & CAZENAVE J.-P. : Coextraction of thrombomodulin and tissue factor from human placenta : Effects of concanavalin A and phospholipid environment on activity. *Thromb. Haemostas.*, 1986, **55**, 112-8.
- 5 FRENS G. : Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature (London). Phys. Sci.*, 1973, **241**, 20-2.
- 6 BRISSON C., ARCHIPOFF G., HARTMANN M.-L., HANAU D., BERETZ A., FREYSSINET J.-M., FABRE M. & CAZENAVE J.-P. : Antibodies to thrombomodulin induce receptor-mediated endocytosis in human saphenous endothelial cells. *Thromb. Haemostas.*, 1992 (sous presse).