

CYTOMÉTRIE EN FLUX

OLIVIER LEES

Immunologie cellulaire et Cytométrie. Hôpital Charles Nicolle ROUEN 76000

LA CELLULE VUE AU MICROSCOPE

La cellule normale ou malade est caractérisée par de nombreux aspects observables au microscope optique ou électronique.

Certains aspects sont visibles au niveau du cytoplasme, du noyau, de la membrane cellulaire de surface, ou des acides nucléiques (ADN-ARN).

Les méthodes classiques d'observation ne permettent d'observer qu'un seul aspect cellulaire à la fois, sur un nombre limité de cellules (quelques centaines).

- de la diffraction à 90°, qui correspond au contenu en organites, membranes, et protéines de la cellule,

- deux signaux de fluorescence, sélectionnés par des filtres appropriés vont être analysés par des photomultiplicateurs très sensibles.

Certains appareils plus complets peuvent produire un signal de taille supplémentaire (volume électrique Coulter) et peuvent être munis de 3 PMT de fluorescence permettant l'analyse en triple marquage.

Il est ensuite possible de trier, d'extraire les cellules qui comportent certains aspects particuliers, définis par l'expérimentateur.

LA CYTOMÉTRIE EN FLUX

La technique récente de cytométrie en flux utilise un appareil équipé d'un laser qui éclaire un flux de cellules passant devant le faisceau laser. La cadence de passage est très rapide puisque 5 000 cellules peuvent être analysées par seconde, et il est possible de détecter les aspects de 100 000 cellules. De plus l'appareil va pouvoir, grâce à son ordinateur, lire de façon simultanée, au moins quatre paramètres au niveau de chaque cellule. Il s'agit alors :

- de l'ombre cellulaire en relation avec la taille de la particule,

APPLICATIONS DE LA CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les applications de cette technologie sont multiples dans des domaines de la pathologie et de la recherche.

Toutes suspensions cellulaires (humaines, animales, végétales, algues, planctons...) ou particulaires (noyaux, organites cellulaires, chromosomes...) de tailles de 0,1 à 100 microns peuvent ainsi être « vues » en cytométrie de flux.

La diffraction de lumière à 90° est fonction de la structure interne de la cellule. C'est-à-dire de son rapport nucléo-cytoplasmique et de son contenu interne.

Le ou les signaux de fluorescence seront spécifiques du marquage effectué et leur signification en dépendra. Par exemple, lors d'un typage lymphocytaire, ne seront fluorescentes que les cellules marquées donc positives au sens immunologique du terme.

Dans le cadre d'une étude du cycle cellulaire au moyen de l'orange d'acridine, l'ADN du noyau fluoresce en vert (530 nm) tandis que l'ARN du cytoplasme fluoresce en rouge (640 nm). Ces deux fluorescences seront mesurées simultanément sur chaque cellule et indiqueront les quantités respectives de ces deux constituants.

En conclusion sur chaque cellule analysée, quatre mesures sont faites simultanément :

- mesure de diffraction dans les petits angles.
- mesure de diffraction à 90° .
- mesure de fluorescence « verte ».
- mesure de fluorescence « rouge ».

Elles sont traitées numériquement par une micro-informatique qui présente les résultats, après avoir enregistré les mesures sur un grand nombre de cellules, sous la forme d'histogrammes de fréquence monoparamétriques ou biparamétriques.

Sur les histogrammes monoparamétriques, nous portons en abscisse l'amplitude du signal et en ordonnée le nombre de cellules ayant donné la même amplitude de signal.

Sur les histogrammes biparamétriques, nous corrélons deux mesures (exemple : diffraction dans les petits angles et diffraction à 90°) indépendantes mais effectuées sur la même cellule.

DESCRIPTION DU PRINCIPE DE TRI

Les critères retenus sont définis sur les histogrammes eux-mêmes, au moyen de fenêtres de tri, s'ils sont monoparamétriques ou de contours, s'ils sont biparamétriques. L'instrument ne pouvant trier que dans deux directions, 2 fenêtres ou 2 contours sont utilisés, la fenêtre ou le contour des éléments triés à droite, la fenêtre ou le contour des éléments triés à gauche.

Pour mettre en œuvre le tri, on fait vibrer verticalement la cellule d'écoulement, à raison de 32 000 vibrations seconde. C'est un cristal piezo-électrique qui se charge de ce travail. Cette vibration brise le jet en gouttelettes ; il se forme 32 000 gouttes par seconde. Aux concentrations habituelles de travail (300 éléments seconde) on s'attend à trouver une cellule toutes les 100 gouttes.

Quand une cellule répond aux critères de séparation définis par l'utilisateur, une charge électrique est placée sur la gouttelette contenant la cellule intéressante. Cette micro-goutte passe ensuite entre deux plaques portées à +2 000 et -2 000 volts et, selon la polarité de la charge - une polarité différente étant attribuée à chaque fenêtre ou contour de tri - elle est déviée soit à droite, soit à gauche et tombe dans des tubes appropriés.

Le Cytomètre peut analyser en taille et en fluorescence plus de 10 000 cellules seconde. Le tri lui, s'effectue à une fréquence plus faible 5 000 cellules seconde.

LA CARDIOTOXICITÉ DE LA DOXORUBICINE

Une étude immunocytochimique du facteur natriurétique atrial (FNA) chez le rat

CO. JOBIT & G. PAULUS

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

RÉSUMÉ

La technique immunocytochimique à l'or colloïdal avec intensification à l'argent (IGSS) est une technique intéressante et d'une grande précision, en ce qui concerne la mise en évidence des produits de stockage des cellules endocrines fixées en routine et incluses en paraffine (1). Cette méthode semble être supérieure à la méthode peroxydase anti-peroxydase (PAP) qui nous a donné des résultats plus faibles et moins précis.

Sensible et rapide, elle utilise des réactifs stables et non toxiques. Nous l'avons utilisé pour caractériser les granules du facteur natriurétique atrial (FNA) dans l'oreillette du rat (2).

INTRODUCTION

Dans le but de préciser les répercussions de l'insuffisance cardiaque sur le stockage intracytoplasmique des granules de FNA dans le myocyte, une étude a été menée chez le rat traité à la Doxorubicine.

La Doxorubicine est un agent anti-cancéreux assez souvent utilisé qui provoque une cardio-

toxicité irréversible aussi bien chez l'homme que chez les animaux de laboratoire. Cette cardiotoxicité irréversible se manifeste par une insuffisance cardiaque chronique.

Le facteur natriurétique atrial (FNA) est une hormone sécrétée par le cœur qui devient de ce fait une glande endocrine à part entière (2). Le facteur natriurétique atrial est un peptide qui, déversé dans le courant sanguin par distension de l'oreillette droite augmente la diurèse par une vasodilatation des artères afférentes du glomérule.

L'insuffisance cardiaque provoque une augmentation du taux de FNA dans le sang ainsi qu'une diminution du FNA dans le myocarde.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

a) Traitement

La Doxorubicine (1mg/Kg) a été injectée par voie intraveineuse deux fois par semaine pendant six semaines à des rats mâles (Sprague-Dawley). Un lot fut sacrifié à la fin de cette période, puis un autre lot après six semaines supplémentaires sans traitement.

Un groupe témoin fut incorporé à chacun de ces lots.

b) Tissu

L'oreillette droite a été prélevée et fixée au formol 10 % tamponné, puis incluse en paraffine. Des coupes de 5 µm ont été effectuées. Lors d'études préliminaires, nous avons comparé 2 fixateurs : le formol 10 % tamponné et le Bouin aqueux.

L'immuno-réactivité de l'ANF est beaucoup mieux préservée quand on emploie le bouin et permet d'utiliser l'anticorps primaire à des dilutions supérieures (1/4000 au lieu de 1/2000 avec le formol). Néanmoins notre choix s'est porté sur le formol car il est notre fixateur de routine.

c) La technique IGSS

La méthode IGSS est une méthode indirecte. Elle repose sur la reconnaissance d'un premier anticorps par un immuno-réactif (anticorps secondaire couplé à des particules d'or colloïdal). L'intensité du signal directement obtenu après incubation avec l'anticorps marqué à l'or est amplifiée par l'addition d'un réactif à l'argent ; ce dernier précipitant à la surface des particules d'or colloïdal. Ce résultat est irréversible et stable dans le temps.

L'amplification du signal permet des dilutions plus importantes de l'anticorps secondaire. La firme Janssen commercialise désormais un réactif d'amplification composé de deux solutions prêtes à mélanger (50/50) beaucoup moins sensible aux contaminations chimiques. Le Ph neutre de la solution d'argent évite les problèmes du « décrochage » de certains anticorps faiblement fixés. Au cours d'études préliminaires, nous avons comparé deux méthodes : l'IGSS et la PAP. La première plus efficace, nous a permis de travailler à une dilution de l'anticorps primaire supérieure : 1/2000 au lieu de 1/1000 avec la PAP (fixateur formol).

d) Technique préalable

- déparaffiner et amener à l'eau.

- xylène
- alcool 100°
- méthanol
- eau

- immerger dans une solution de Lugol pendant 5 mn (l'omission de cette étape abolit toute coloration immunocytochimique).

- rincer brièvement à l'eau.

- placer dans une solution de thiosulfate de sodium à 2,5 % jusqu'à décoloration.

- rincer 10 mn dans l'eau courante.

- placer dans du tampon phosphate à pH7,4 0,05M contenant du BSA (1%) du NaCl (29%) du triton x100 (5%).

e) Technique immunocytochimique

- Appliquer le sérum normal de chèvre : NGS 1/10 (Nordic) pendant 20 mn à température ambiante et essuyer sans rincer les coupes. Cette étape a pour but de diminuer la coloration de fond.

- Incuber 60 mn dans l'anticorps primaire : sérum de lapin anti-FNA de rat au 1/2000 (Peninsula) à température ambiante.

- Rincer dans le tampon 0,05M pH7,4, BSA (1%), NaCl (29%), triton x100 (5%) pendant 10 mn.

- Puis rincer dans du tampon 0,05M pH8,2, BSA (1%), NaCl (9%) pendant 10 mn.

- Appliquer de nouveau du sérum normal de chèvre : NGS (Nordic) au 1/10 dans du tampon 0,05M, pH8,2, BSA (1%), NaCl (9%) pendant 20 mn à température ambiante.

- Incuber avec l'anticorps secondaire : un sérum de mouton anti-immunoglobuline de lapin couplé à l'or colloïdal de 5 nanomètres dans du tampon 0,05M pH8,2, BSA (1%), NaCl (9%) pendant 30 mn à température ambiante.

- Rincer dans le tampon 0,05M pH8,2, NaCl (9%) pendant 30 mn.

- Passage dans de la glutaraldéhyde à 2 % pendant 15 mn.

- Rincer dans le tampon 0,05M pH8,2 NaCl (9%) pendant 15 mn.

- Eau bidistillée sous agitation pendant 30 mn.

- Solution argentique A + B volume à volume (Kit Janssen) environ 8 mn.

Le temps d'incubation varie suivant la température de la solution. Surveiller l'intensité de la coloration au microscope (arrêter la réaction en passant dans l'eau distillée le temps de la visualisation).

- eau courante 10 mn
- hémalun 1 mn
- eau 2 mn
- eau acétifiée 10 sec.
- alcool 100° 2x30 sec.
- xylène 2x4 mn
- montage au DPX

e) Contrôles

- avec le sérum non immun :

L'anticorps primaire est remplacé par du sérum normal de lapin. L'absence de marquage permet de montrer la « spécificité » de la méthode.

- omission de l'anticorps secondaire :

Elle permet la mise en évidence de l'éventuelle argyrophylie du tissu. En effet si cet anticorps est remplacé par du tampon, il n'y aura pas de marquage à l'or donc pas d'intensification avec la solution de développement à l'argent.

- Absorption de l'anticorps primaire :

Ce contrôle permet de mettre en évidence la spécificité du sérum. L'absorption se fait par la recherche de la quantité du peptide, nécessaire et suffisante à l'absorption de l'anticorps primaire utilisé à la dilution de travail.

RÉSULTATS

Au bout de 6 semaines de traitement, l'immunocytochimie a montré que les granules de F.N.A. étaient présents en quantité comparable chez les traités comme chez les témoins.

Après 6 semaines de réversibilité, l'immunocytochimie a montré une diminution marquée de la quantité de granules de FNA dans l'oreillette. Les réactions de contrôle n'ont montré aucun immunomarquage. On a remarqué également une vacuolisation cytoplasmique marquée.

DISCUSSION

Aucun signe d'insuffisance cardiaque n'est observé au terme du traitement de six semaines.

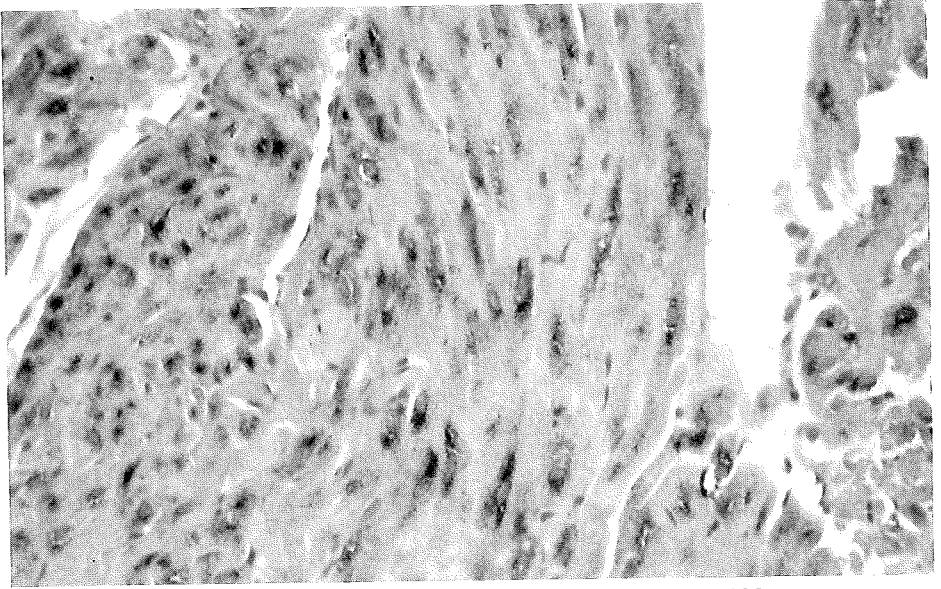
La cardiotoxicité ne se développe qu'au cours des six semaines qui suivent l'arrêt du traitement.

C'est à ce stade que l'immunocytochimie met en évidence la déplétion du FNA au niveau myocytaire. Cette déplétion contraste avec l'augmentation très nette des taux plasmatiques de FNA (3).

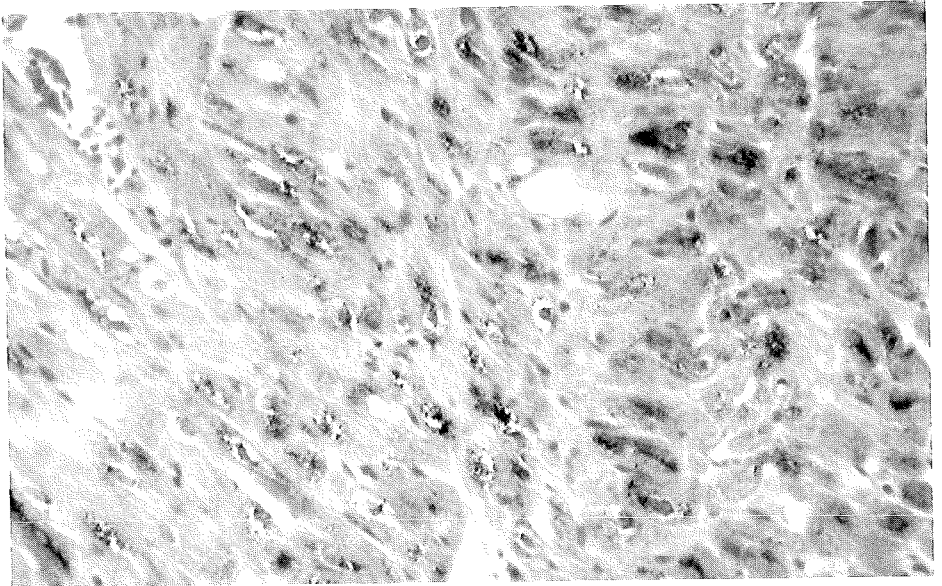
Ces résultats montrent que la déplétion du FNA au niveau myocytaire est liée à l'insuffisance cardiaque chronique.

RÉFÉRENCES

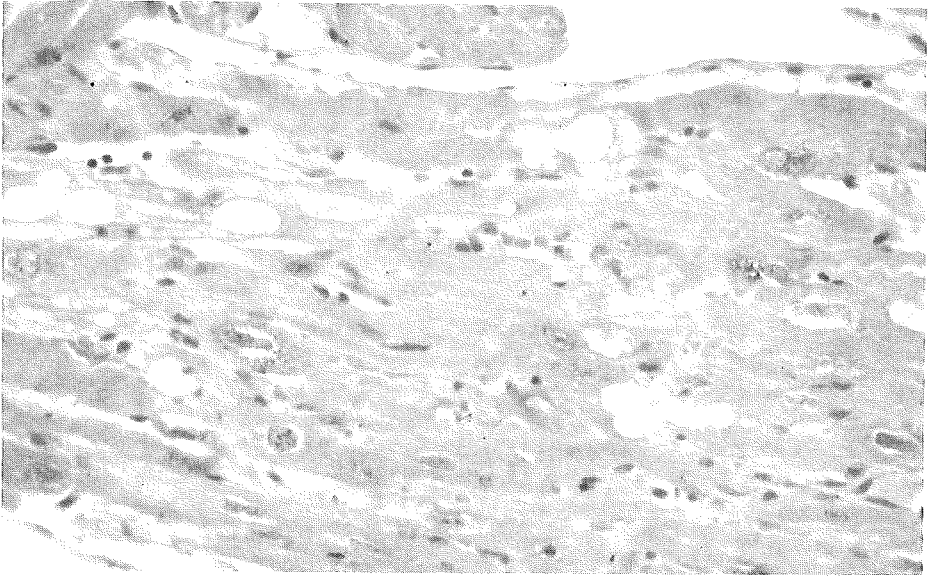
1. SPRINGALL D.R., HACKER G.W., GRIMELIUS L. & POLAK J.M. - The potential of the immunogold silver staining method for paraffin sections. *Histochemistry*, 1984, 81, 603-608.
2. CANTIN M. & GENEST J. - The heart and the atrial natriuretic factor. *Endocrine Reviews*, 1985, 6, n° 2, 107-127.
3. TIKKANEN I., METSÄRINNE K., FYHRQUIST F. & LEIDENIUS R. - Plasma atrial natriuretic peptide in cardiac disease and during infusion in healthy volunteers. *Lancet*, 1985, 13, 66-69.



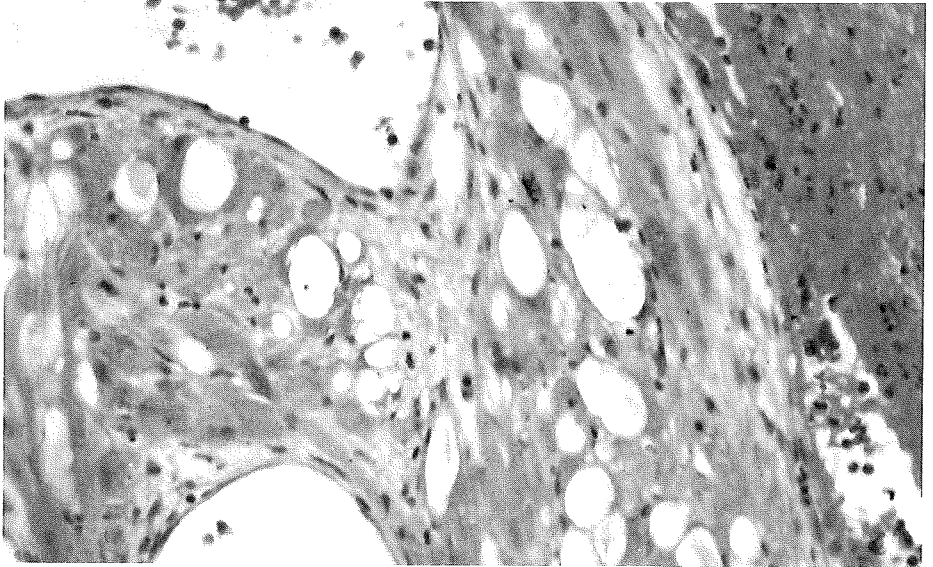
- Oreillette de rat. Immunocytochimie du FNA (IGSS) x 400.



- Oreillette de rat. Immunocytochimie du FNA (IGSS). Après 6 semaines de traitement, le FNA est présent à un taux équivalent à celui trouvé chez les contrôles.



Oreillette de rat. Immunocytochimie du FNA (IGSS). Après 6 semaines de traitement et 6 semaines supplémentaires sans traitement, la quantité de granules de FNA a diminué.



Oreillette de rat. HE. Après 6 semaines de traitement et 6 semaines supplémentaires sans traitement, vacuolisation au niveau des myocytes.

HYBRIDATION MOLÉCULAIRE IN SITU

Patrick BRUNEVAL. INSERM U28 et Laboratoire d'anatomie pathologique,
hôpital BROUSSAIS.

96 rue Didot 75014 PARIS

L'hybridation in situ (HIS) est une technique morphologique permettant la détection et la localisation de séquences nucléotidiques au niveau :

- d'une coupe de tissu
- d'un étalement cellulaire
- d'une préparation chromosomique.

Sur les préparations tissulaire et cellulaire, l'HIS permet de détecter des séquences nucléotidiques virales (DNA et RNA), elle permet aussi de détecter des produits d'expression d'un gène codant pour la synthèse de protéines : ARN messenger. L'HIS est dérivée des progrès récents de la biologie moléculaire qui produit les sondes d'hybridation. L'HIS est complémentaire des autres techniques de biologie moléculaire qui détectent des séquences nucléotidiques dans des extraits tissulaires (Northern blot, dot blot) : ces techniques sont plus sensibles mais ne permettent pas la localisation et le typage cellulaire.

PRINCIPES DE BASE DE L'HIS

L'HIS repose sur la spécificité de l'appariement (hybridation) entre deux séquences nucléotidiques complémentaires : celle à détecter et celle de la sonde. Cet appariement est lié à la complémentarité des bases puriques et pyrimidiques qui s'apparient en formant des liaisons H.

La force de l'hybridation entre la séquence nucléotidique à détecter et la sonde, c'est-à-dire la stabilité de l'hybride, diminue quand :

- la complémentarité des deux séquences nucléotidiques diminue.
- la température augmente.
- la force ionique diminue.
- sont présents dans le milieu des agents chimiques déstabilisant les liaisons H, en particulier la formamide.

Ces paramètres physico-chimiques définissent la **stringence** d'une hybridation ou des rinçages. Plus les conditions sont stringentes, plus on est proche des conditions de dissociation de l'hybride. Donc en théorie, plus les conditions sont stringentes, plus l'hybridation est spécifique et moins le bruit de fond est important. La notion de T_m définit la température où la moitié des hybrides sont dissociés.

LES SONDES D'HYBRIDATION

1) Les sondes DNA :

- DNA complémentaire (**c DNA**) : ces sondes sont le complément de tout ou partie d'un mRNA.

- **DNA génomique** : il s'agit d'un fragment du génome cellulaire comprenant tout ou par-

tie d'un gène à explorer ; c'est-à-dire que cette sonde comprend des segments exoniques (transcrits en mRNA) mais aussi des segments introniques non transcrits. La présence de segments introniques peut être facteur d'augmentation du bruit de fond.

L'avantage des sondes DNA double brin est leur grande stabilité. Leur sensibilité théorique est inférieure aux riboprobes.

2) Les sondes RNA : riboprobes :

Ce sont des sondes de RNA mono-brin clonées dans un vecteur particulier (SP6/t7 par ex.). L'intérêt de ces sondes est leur plus grande sensibilité théorique qui permettrait la détection d'un nombre de copies de mRNA plus faible. Mais ces sondes sont extrêmement instables et nécessitent de grandes précautions d'utilisation (stérilisation du matériel et des produits, laboratoire exempt de ribonucléase).

3) Les oligonucléotides de synthèse (oligomères) :

Ce sont des séquences nucléotidiques courtes d'environ 30 à 40 bases complémentaires de parties du RNA à détecter. L'inconvénient de ces sondes est leur moindre spécificité nécessitant des conditions d'hybridation très stringentes avec de nombreux contrôles.

MARQUAGE DES SONDES

1) *Par un isotope radioactif* qui a la technique de marquage la plus sensible. On utilise des émetteurs β de faible énergie (H3) ou de moyenne énergie (S35). Les émetteurs de forte énergie comme le P32 ont une définition cellulaire trop faible. Le S35 permet un bon compromis entre une définition cellulaire moyenne et une activité spécifique élevée permettant des temps d'exposition plus courts, mieux utilisables. Pour le H3 la définition cellulaire est meilleure mais les temps d'exposition sont souvent extrêmement longs retardant les expériences.

Les techniques de marquage isotopique des sondes sont réalisables grâce à des kits commerciaux. Le marquage repose sur la nick translation utilisant un ou plusieurs nucléotides chauds, et surtout maintenant sur la technique de marquage par amorçages multiples (random

primers) qui permet d'obtenir des activités spécifiques élevées, même pour des sondes courtes. Le marquage des riboprobes se fait en même temps que leur polymérisation.

2) Marquage des sondes par la Biotine (sondes froides) :

On peut incorporer à la sonde des nucléotides biotinylés par les mêmes techniques de nick translation ou d'amorçages multiples. La visualisation de la sonde se fait alors par une réaction immédiate immunohistochimique ne nécessitant pas d'exposition. La révélation de la biotine se fait ou bien grâce à un anticorps anti-biotine couplé à une enzyme, ou bien par l'intermédiaire de la streptavidine couplée à une enzyme. La sensibilité de ces techniques est moindre.

PRÉPARATION DES TISSUS

La préparation des tissus doit obéir à 3 objectifs :

- préserver le signal
- permettre l'accès de la sonde jusqu'au niveau du signal.
- préserver les structures tissulaires et cellulaires.

1) Préserver le signal :

Le RNA est peu stable et doit être préservé des RNases. Ces RNases sont endogènes et s'activent lors de l'autolyse cellulaire, il est donc impératif de congeler ou de fixer les tissus très rapidement après le prélèvement que ce soit en pathologie expérimentale ou humaine. Si les tissus sont congelés, il faut les stocker à une température inférieure ou égale à -80° . L'autre source de RNases est exogène apportée par des surfaces souillées telle la vaisselle, les mains etc...

Pour s'en protéger, il faut manipuler les coupes et le matériel avec des gants et utiliser du matériel stérilisé.

Pour préserver le signal il semble que la meilleure technique soit actuellement une congélation précoce et rapide dans l'azote liquide, suivie de coupes au cryostat, suivies de fixation aldehydique dans le formol tamponné à 4° pendant quelques minutes.

Pour améliorer l'accessibilité de la sonde d'hybridation jusqu'au signal intra-cellulaire, des procédés de perméation ont été proposés faisant appel à l'HCl 0,2 N pendant 10 minutes puis suivi d'une digestion protéasique par exemple protéinase K 15 mg/ml pendant 15 minutes à 37°. En fait, il apparaît que ces techniques de perméation ne sont pas toujours indispensables. Par ailleurs, elles altèrent la morphologie cellulaire et tissulaire.

La réalisation pratique et les différents produits nécessaires sont détaillés ci-dessous.

RÉALISATION PRATIQUE DE L'HYBRIDATION IN SITU

J = 0

Préparation des tissus et des coupes

- I - Tissus non fixés congelés.
- Tissus fixés au formol tamponné $\approx 4\%$, rincés, congelés
- Idem puis inclusion en paraffine
- Tissus fixés au Bouin acqueux, puis inclusion en paraffine.

NB : Durée de la fixation = quelques heures ((12 h sur tranches fines de tissus).

- II - Coupes au cryostat ou au microtome : recueillies sur lames propres, dégraissées et STÉRILISÉES à l'étuve.

N.B. : Pour les tissus en paraffine : bien déparaffiner \rightarrow toluène, alcool 100 % (respectivement 2×15 min. et 2×10 min.)

- III - Pour les tissus en paraffine ou fixés/congelés : « coller » la coupe avec du COLLODION.

Préparation du collodion :

- 1 vol. de collodion 4 % (Merck)
- + 25 vol. d'éther
- + 25 vol. d'alcool absolu

Recouvrir la coupe de cette solution de collodion et laisser sécher (1 goutte/lame).

IV - Stockage de ces coupes à -20°C avec de l'ACTIGEL.

V - Pour les tissus non fixés et coupés à congélation \rightarrow faire une fixation sur lames : par ex. : formol 4 % tamponné PBS pendant 15 min.

BIEN DÉSHYDRATER dans l'alcool (50 % à 100 %) et stocker.

VI - Si fixation au Bouin : blanchissement par le carbonate de lithium à saturation.

J = 1

Contrôle à la RNase, perméation des tissus

I - Contrôle à la RNase

Sur des coupes entre lame et lamelle (non siliconnée) :

- RNase à 50 $\mu\text{g/ml}$ dans le 2 SSC à 37°C pendant 30 min., en milieu humide.
- Rincer dans le 2 SSC pendant 15 min. en agitant.

NB : Stocker la RNase à 10 mg/ml.

II - Perméation des tissus

Pour toutes les coupes.

- HCl 0,2 M pendant 10 min. à T° ambiante.

- rincer rapidement avec H_2O , laisser un peu sécher.

Proteinase K 15 $\mu\text{g/ml}$ dans tampon :

+ tampon : Tris HCl 20 mM (pH = 7.4) + CACl_2 2 mM

Entre lame et lamelle (non siliconnée) pendant 15 min. à 37°C et en milieu humide.

- Rincer avec H_2O en décollant les lamelles.
- Bien laisser sécher.
- Garder à -20°C avec de l'actigel.

NB : Perméation des cellules cytocentrifugées : proteinase K 1 $\mu\text{g/ml}$ ou plutôt *pronase*.

J = 2

Hybridation

- Evaporer sous vide les restes d'alcool pendant 1 h.

- Solution d'hybridation :

Stock	Produit	Final	Dilution
100 %	Formamide désionisée	50 %	1/2
1 M	Tris HCl - EDTA	10 mM	1/100
0,1 M	Tris HCl (pH = 7.4)	1 mM	1/100
50 %	EDTA	10 %	1/5
5 M	Sulfate de Dextran	600 mM	1/8.33
100 %	NaCl	1 %	1/100
20 mg/ml	Denhardt	1 mg/ml	1/20
20 mg/ml	tRNA E.Coli	1 mg/ml	1/20
10 mg/ml	DNA sperme saumon	400 µg/ml	1/25
10 mg/ml	DNA sperme hareng	400 µg/ml	1/25
1 M	DTT	10 mM	1/100
	Sonde	0,2 ng DNA/µl	1/X

Compléter avec de l'eau jusqu'au volume requis si nécessaire.

- Mettre environ 15 µl de solution par lame.
 - Utiliser la solution d'hybridation après dénaturation soit ≈ 2 min. à l'eau bouillante, puis mis sur la glace.

- Hybrider entre lame et lamelle SILICONNÉE (↓ adhérence du cDNA au verre).

- Luter avec Rubber Cement.

- Hybrider 24 h à 37° C en milieu humide.

NB : Si la sonde est (+) concentrée on a un volume inférieur à 1000 µl, on complète avec H₂O (Si le volume choisi au départ est de 1000 µl)

J=3

Rinçages

- *Déluter* en arrachant délicatement la colle.

NB : La lamelle doit glisser doucement.

- Cette opération se fait dans un bain :

50 % formamide ordinaire (Flucka)

50 % 8 SSC (→ en finale 4 SSC).

Rinçage une heure dans ce bain.

- Puis 2 bains dans 2 SSC de 1/2 à 1 h chacun, en agitant doucement, sans bulles le long des lames.

- Puis dans un grand bain (4 litres) de 2 SSC, en agitant, à T° ambiante, toute la nuit.

J=4

Emulsion pour autoradiographie

- Refaire un rinçage dans 2 SSC pendant 5 min.

- Déshydrater dans l'alcool (50 % à 100 %), 1 min./bain.

- Bien laisser sécher.

- Emulsion des lames :

50 % H₂O distillée

50 % émulsion

- Bien mélanger au bain Marie à 45° C.

- Tremper la lame quelques secondes, ressortir et essuyer le dos de celle-ci.

- Bien laisser sécher (au moins une heure).

- Stocker en BOITE NOIRE à 4° C avec de l'actigel.

NB : Tout ceci se fait en chambre noire, lumière rouge.

J=X

Révélation et coloration

- Révélation 3 min. à T° ambiante.

- Fixation 3 min. à T° ambiante.

- Rincer à l'eau froide pendant 15 min.

- Colorer 10 min. à l'hématoxyline et 3 min. à la Phloxine.

- Laisser sécher et monter.

PRÉPARATION DES STOCKS DE
SOLUTION
POUR L'HYBRIDATION IN SITU

- *Formamide désionisée*

- 0,5 g d'amberlite pour 10 ml de formamide Merck
- agiter doucement pendant 15 min.
- filtrer, stocker à l'abri de la lumière à -20°C (15 jours max.)

- *NaCl 5M*

- PM = 58,44 g
- soit 14,61 g pour 50 ml H₂O distillée, stérile
- stocker à -20°C

- *DTT 1 M*

- PM = 154,2 g
- soit 0,0154 g pour 100 μl H₂O distillée, stérile
- faire des aliquots de 10 μl et stocker à -20°C

- *SULFATE DE DEXTRAN A 50 %*

- **ATTENTION** 1 g de sulfate de dextran pour 1,3 ml H₂O distillée, stérile
- diluer avec une pipette pasteur à bout rond dans un tube Eppendorf
- stocker à -20°C
- **NB** : donner un coup de centrifugeuse pour éliminer les bulles.

- *TRIS-HCl 1 M pH=7,4*

- PM = 121,14 g
- soit 6,057 g pour 50 ml H₂O distillée, stérile
- ajuster au bon pH avec HCl ; stocker à $+4^{\circ}\text{C}$

- *TRIS-HCl + CaCl₂*

- diluer tris-HCl à 20 mM
- CaCl₂ : PM = 147,02 g on veut 2 mM
- soit pour 10 ml de tris-HCl 2,9 mg, stocker à $+4^{\circ}\text{C}$

- *TRIS-HCl + EDTA*

- EDTA PM = 372,24 g on veut 0,1 M pour le stock
- soit 1,8612 g pour 50 ml H₂O distillée, stérile

- ajouter volume à volume tris-HCl + EDTA, stocker à $+4^{\circ}\text{C}$

- *rRNA YEAST*

- diluer à 20 mg/ml dans H₂O distillée, stérile
- stocker à -20°C

- *DNA SPERME DE SAUMON ET DNA SPERME DE HARENG*

- diluer à 10 mg/ml dans H₂O distillée, stérile
- stocker à -20°C

- *DENHARDT STOCK 2 % (= 100 %)*

- Ficoll 2 %
- PVP 2 % diluer dans 100 ml H₂O distillée, stérile
- BSA 2 %
- concentration finale lors de l'utilisation 0,02 %, stocker à -20°C

- *HCl 0,2 M*

- *TAMPON 20 SSC*

- NaCl 3 M soit 175,32 g
- ClNa 0,3 M soit 88,23 g
- compléter à 1 litre avec H₂O distillée, ajuster à $\text{pH} = 6,2$ avec HCl
- **NB** : on prend Tri NaCl 2 H₂O PM = 294,10 g, stocker à $+4^{\circ}\text{C}$.

- *PROTEINASE K*

- diluer à 10 mg/ml dans H₂O distillée, stérile
- stocker à -20°C
- pour la perméation on veut 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, on dilue par 666,66 μl
- soit 1 μl de protéinase K + 665,6 μl de tampon (tris-HCl + CaCl₂)

- *RNase*

- diluer à 10 mg/ml dans H₂O distillée, stérile
- stocker à -20°C
- on veut sur les lames 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, on dilue par 200 dans du 2 SSC

LISTE DES PRODUITS
POUR L'HYBRIDATION IN SITU

- *KODAK*
 - émulsion NTB 2 ref. 1654433
- *COGER*
 - Merck
formamide ref.4008 (la plus pure)
 - Fluka
formamide ref.47680
 - Sigma
protéase type XI ref. P 0390
 - ribonucléase A ref. R 5125
 - RNA yeast ref. R 7125
 - DNA type III ref. D 1626
 - DNA hareng type IV ref. D 2251
 - DTT (DiThioTreitol) ref. D 0632
 - PVP 360 (PolyVinylPyrolidone)
- *PHARMACIA*
 - ficoll 400 ref. 17040001
 - sulfate de dextran ref. 17034001
- *TOUZART*
 - Bio-Rad
amberlite ref.1426425

LA COLORATION ARGYROPHILE DES ORGANISATEURS NUCLÉOLAIRES

C. RENAUDON, B. LEBLANC & M. ANDREU

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

INTRODUCTION

Les organisateurs nucléolaires (Nucleolar organizer Regions ou NORs en anglais) sont constitués par les portions d'ADN qui portent les gènes codant l'ARN ribosomal, associés à de nombreuses protéines. Ils ont une localisation précise sur certains chromosomes de la cellule en métaphase et dans le noyau de la cellule en interphase. Chez l'homme et le chimpanzé, les organisateurs nucléolaires sont localisés lors de la mitose au niveau des constriction secondaires sur les bras courts de 5 chromosomes acrocentriques (Paires 13-14-15-21-22), là où le nucléole réapparaît après la mitose (1,2). Lors de l'interphase, les organisateurs nucléolaires se situent à l'intérieur du nucléole, dans les centres fibrillaires et dans une moindre mesure dans les composants fibrillaires associés, deux éléments qui sont visualisés en microscopie électronique (8).

Les organisateurs nucléolaires peuvent être révélés en microscopie photonique en mettant à profit la forte argyrophilie des protéines qu'ils contiennent. Howell et al., 1975 (3) ont initialement développé une technique argyrophile pour la coloration sélective des organisateurs nucléolaires sur les chromosomes. Cette technique a été largement utilisée dans les laboratoires de cytogénétique, notamment pour la

recherche des trisomies 21. Elle a été ensuite simplifiée et améliorée pour être adaptée à différents types de matériels biologiques parmi lesquels des tissus inclus en paraffine : Howell et al., 1980 (4) ont mis au point une technique en une seule étape au lieu de deux précédemment, puis Ploton et al., 1986 (5) ont pu abaisser la température de réaction de la coloration de 60°C à 20°C en diminuant ainsi la coloration de fond.

L'argyrophilie des protéines des organisateurs nucléolaires, liée probablement à la présence de groupements sulfhydryles (7), semble être due pour beaucoup à 2 protéines non histones qui ont un rôle dans la régulation de la transcription de l'ADN ribosomique : la protéine C23 (110K) et l'ARN polymérase 1 (6).

La mise en évidence des organisateurs nucléolaires par l'argent apparaît comme un moyen simple d'apprécier l'activité cellulaire sur des préparations histologiques faites à partir de prélèvements fixés, inclus et coupés selon les techniques de routine de l'anatomie pathologique. De plus, plusieurs travaux récents ont révélé par cette coloration une différence entre des tumeurs bénignes et des tumeurs malignes, illustrant ainsi l'intérêt de la technique en pathologie tumorale chez l'homme (6,9,10,11,12,13, 17).

L'objet de cet article est de présenter la technique de la coloration argyrophile des organisateurs nucléolaires utilisée dans les conditions de notre laboratoire et d'illustrer les résultats obtenus à partir d'un exemple : une tumeur bénigne et une tumeur maligne de la mamelle chez le rat.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le matériel étudié est composé de prélèvements de ganglions lymphatiques, de tumeurs mammaires, pulmonaires ou hépatiques provenant de chiens (Beagle), rats et souris utilisés comme témoins dans des études de toxicologie.

Les tissus sont fixés au formol neutre à 10 % ou dans le liquide de Bouin et inclus en paraffine. Des coupes de 3 μ m sont déparaffinées dans le xylène et réhydratées par des passages dans l'alcool jusqu'à l'eau bidistillée.

La solution colorante d'argent est préparée extemporanément en faisant dissoudre de la gélatine à raison de 2g/dl dans une solution aqueuse d'acide formique à 1 %. Puis un volume de cette préparation est mélangé avec deux volumes d'une solution aqueuse de nitrate d'argent à 50 %.

Les préparations sont recouvertes par la solution colorante à l'abri de la lumière, à température ambiante pendant 30 ou 45 minutes. Après rinçage à l'eau bidistillée, les préparations sont déshydratées jusqu'au xylène puis montées au DPX.

Les modalités de réalisation pratique sont étudiées comme suit :

- utilisation d'une verrerie très propre ou d'une verrerie nettoyée dans un mélange sulfochromique (19).

- déroulement de la coloration à l'abri de la lumière, dans une chambre noire ou dans une armoire du laboratoire.

- différents temps de coloration sur un prélèvement de ganglion lymphatique de chien allant de minute en minute, de 24 à 60 minutes.

- utilisation unique ou répétée de la solution colorante.

- mise en œuvre d'une contre coloration par le rouge nucléaire ou l'hématoxyline.

RÉSULTATS

La coloration argyrophile produit des dépôts d'argent sous la forme de petits grains noirs dans le noyau des cellules surtout visibles avec l'objectif $\times 40$ ou $\times 100$ à immersion. Les noyaux sont colorés en jaune comme le tissu conjonctif, les cytoplasmes sont peu ou pas colorés. Des artefacts sous la forme de dépôts d'argent sur la lame ne sont qu'occasionnellement observés.

Le temps de coloration de 45 minutes donne une coloration générale plus soutenue que le temps de 30 minutes et permet ainsi un bon repérage topographique des tissus étudiés, sans qu'il y ait plus d'artefacts. Après 30 minutes de coloration, les préparations sont plus pâles et la topographie d'ensemble est moins facilement visible. Cependant, le nombre des grains d'argent dans les noyaux ne semble pas varier de façon évidente avec les deux temps de coloration étudiés.

La contre coloration ne semble pas nécessaire pour l'analyse des résultats, notamment après un temps de coloration de 45 minutes.

La technique utilisée donne des résultats similaires sur les prélèvements fixés au formol et sur ceux fixés par le liquide de Bouin.

Des résultats équivalents sont obtenus lorsque l'on utilise une verrerie nettoyée dans un mélange sulfochromique ou plus simplement bien propre. La coloration se développe à l'abri de la lumière, d'une manière égale dans une chambre noire ou seulement dans une armoire fermée. Par contre, la réutilisation d'une solution colorante donne de mauvais résultats avec pratiquement une absence de coloration.

La coloration argyrophile des organisateurs nucléolaires révèle des différences nettes dans le nombre et la taille des grains d'argent entre une tumeur bénigne, un fibroadénome et une tumeur maligne, un adénocarcinome, de la mamelle chez le rat. Les noyaux des cellules épithéliales composant le fibroadénome contiennent un gros grain d'argent, parfois associé à

un ou deux grains de plus petite taille (Fig. 1). Les cellules de l'adénocarcinome possèdent généralement dans leur noyau plus de 4 grains de faible taille (Fig. 2). Il est à noter que dans l'un et l'autre cas, la coloration argyrophile révèle des structures nucléolaires plus nombreuses que la coloration par l'hématoxyline.

DISCUSSION

La technique de coloration argyrophile des organisateurs nucléolaires que nous avons adaptée dans notre laboratoire est identique dans ses grandes lignes aux autres techniques mises en œuvre précédemment par plusieurs équipes (6, 11, 13). Il s'agit d'une coloration qui est simple aussi bien au niveau de la préparation des réactifs nécessaires que dans la réalisation. Plusieurs points concernant les modalités pratiques de la technique méritent d'être soulignés.

On admet actuellement que la coloration argyrophile des organisateurs nucléolaires se déroule en deux étapes : dans un premier temps, les groupements carboxyles chargés négativement, portés par les protéines non histones (C23 et ARN polymérase I essentiellement) fixent initialement les ions argents et les réduisent en argent métal. Il se forme ainsi de minuscules amas d'argent qui seront autant de points de départ pour l'accumulation ultérieure des ions argent attirés par les groupements sulfhydryles, qui sont moins électronégatifs que les groupements carboxyles, et réduits ensuite dans le cadre de la réaction argyrophile. Il s'ensuit une augmentation progressive du diamètre des dépôts d'argent jusqu'à la taille des grains noirs visibles en microscopie optique (14).

La fixation dans le formol neutre à 10 % et la fixation dans le liquide de Bouin donnent des résultats comparables avec les données de la littérature (6-18). Le formol est connu pour former des ponts méthylènes entre les groupements sulfhydryles et carboxyles adjacents (18, 19). Les ponts méthylènes qui pourraient entraver la coloration argyrophile des organisateurs nucléolaires sont ultérieurement détruits lors des passages des prélèvements dans l'alcool 70° en rendant les groupements actifs accessibles aux ions argents (18).

Bien qu'il contient une forte proportion d'acide picrique connu pour se fixer sur les groupements sulfhydryles et disulfides des protéines non histones, le liquide de Bouin donne également de bons résultats pour cette coloration. Ceci pourrait être lié à la plus grande vitesse de diffusion de l'acide acétique et du formol. Les protéines non histones seraient fixées par ces deux derniers avant que l'acide picrique ne puisse agir (18).

La solution colorante doit être préparée extemporanément et ne peut servir qu'une seule fois. Ceci entraîne une forte consommation de nitrate d'argent d'où un coût relativement élevé pour la préparation d'une lame (10 à 20 Francs environ).

Concernant les précautions opératoires à respecter au cours de la technique, notre expérience montre qu'il n'est pas indispensable de nettoyer la verrerie au mélange sulfochromique, qui est d'une manipulation délicate, mais que l'utilisation d'une verrerie très propre est suffisante. D'autre part, si la réaction doit se faire à l'abri de la lumière, il n'est pas nécessaire de se placer dans une chambre noire. Enfin, la réaction de la coloration se déroule à la température ambiante du laboratoire et permet d'obtenir une faible coloration de fond (6).

Le temps de coloration est un élément important de la technique puisqu'une surcoloration se traduit par un empâtement qui biaise l'analyse du nombre et de la taille des dépôts d'argent (15). Nous avons retenu les temps de 30 minutes et de 45 minutes qui nous semblent donner dans les deux cas des résultats satisfaisants. Les temps de coloration notés dans la littérature varient selon les auteurs entre 30 minutes et une heure. Une étude quantitative des résultats obtenus en fonction du temps de coloration reste à faire pour définir dans quelle mesure le facteur temps de la coloration modifie les résultats obtenus.

Un autre aspect qui mériterait également d'être étudié est l'éventuelle influence de l'épaisseur de la coupe sur le nombre de grains d'argent que l'on peut voir dans les noyaux. Nous avons utilisé une coupe de 3 μm d'épaisseur comme beaucoup d'auteurs alors que d'autres utilisent des coupes de 4 μm .

La coloration des organisateurs nucléolaires par l'argent est une coloration argyrophile. L'argyrophilie, qui est un mot dérivant du grec, (argyros = argent et philos = ami), est la propriété des tissus de fixer et de réduire les sels d'argent avec un réducteur présent dans la solution colorante (l'acide formique dans ce cas-ci). Elle doit être distinguée de l'argentaffinité dont les racines sont latines : (argentum = argent et affinis = lié par le mariage), et qui est la propriété que possèdent certaines structures de réduire et de fixer les sels d'argent par elles-mêmes sans adjonction d'un réducteur dans la solution de sel d'argent (16).

Cette coloration appliquée en pathologie tumorale révèle morphologiquement l'existence de différences dans le nombre et la taille des organisateurs nucléolaires chez des cellules normales ou tumorales, bénignes ou malignes. Cela était déjà bien connu dans de nombreux exemples en pathologie humaine, notre expérience montre que c'est également vrai chez les animaux de laboratoire.

Enfin il convient de souligner que si la coloration par l'argent des organisateurs nucléolaires est maintenant bien maîtrisée sur le plan technique, il reste encore à faire un travail de mise au point dans l'analyse quantitative des résultats obtenus par morphométrie avant de bien montrer tout l'intérêt de la technique.

RÉFÉRENCES

1. BOUTEILLE M. & HERNANDEZ-VERDUN D. : Localization of a gene : the nucleolar organizer. *Biomédecine*, 1979, **30**, 282-287.
2. NORSEs- A new method for the pathologist. *Lancet*, 1987, June 20, 1413-1414.
3. HOWELL W.M., DENTON T.E. & DIAMOND J.R. : Differential staining of the satellite regions of acrocentric chromosomes. *Experientia*, 1975, **31**, 260-262.
4. HOWELL W.M. & BLACK D.A. : Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer : a one-step method. *Experientia*, 1980, **36**, 1014.
5. PLOTON D., MENAGER M., JEANNESSON P., HIMBER G., PIGEON F. & ADNETT J.-J. : Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem.J.*, 1986, **18**, 5-14.
6. PLOTON D., MENAGER M., LECHKI Ch., JEANNESSON P., VISSEAU B. & ADNET J.-J. : Coloration des organisateurs nucléolaires (NORs) par l'argent. Application à l'étude de la structure du nucléole et intérêts en pathologie. *Ann. Pathol.*, 1988, **8**, n° 3, 248-252.
7. BUYS C.H.C.M. & OSINGA J. : Abundance of protein-bound sulphhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolar organizing regions. *Chromosoma*, 1980, **77**, 1-11.
8. HERNANDEZ-VERDUN D. : The nucleolar organizer regions. *Biol. Cell*, 1983, **49**, 191-202.
9. CROCKER J. & NAR P. : Nucleolar organizer regions in lymphomas. *J. Pathol.*, 1987, **151**, 111-118.
10. EGAN M.J. & CROCKER J. : Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J. Pathol.*, 1988, **154**, 247-253.
11. DERENZINI M., ROMAGNOLI T., MINGAZZINI P. & MARINOZZI V. : Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Virchows Archiv B Cell Pathol.*, 1988, **54**, 334-340.
12. SMITH R. & CROCKER J. : Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. *Histopathology*, 1988, **12**, 113-125.
13. EGAN M.J., RAAFAT F., CROCKER J. & SMITH K. : Nucleolar organizer regions in small cell tumours of childhood. *J. Pathol.*, 1987, **153**, 275-280.
14. BUYS C.H.C.M. & OSINGA J. : Selective staining of the same set of nucleolar phosphoproteins by silver and Giemsa. *Chromosoma*, 1984, **89**, 387-396.
15. WALKER R.A. : Commentary. The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. *Histopathology*, 1988, **12**, 221-223.
16. GABE M. - Techniques histologiques. Masson, Paris, 1968.
17. UNDERWOOD J.C.E. & GIRI D.D. : Editorial. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. *J. Pathol.*, 1988, **155**, 95-96.
18. SMITH P.-J., SKILBECK N., HARRISON A. & CROCKER J. : The effect of a series of fixatives on the AgNOR technique. *J. Pathol.*, 1988, **155**, 109-112.
19. GANTER P. & JOLLES G. - Histochemie normale et pathologique. Gauthier-Villars, Paris, 1969.

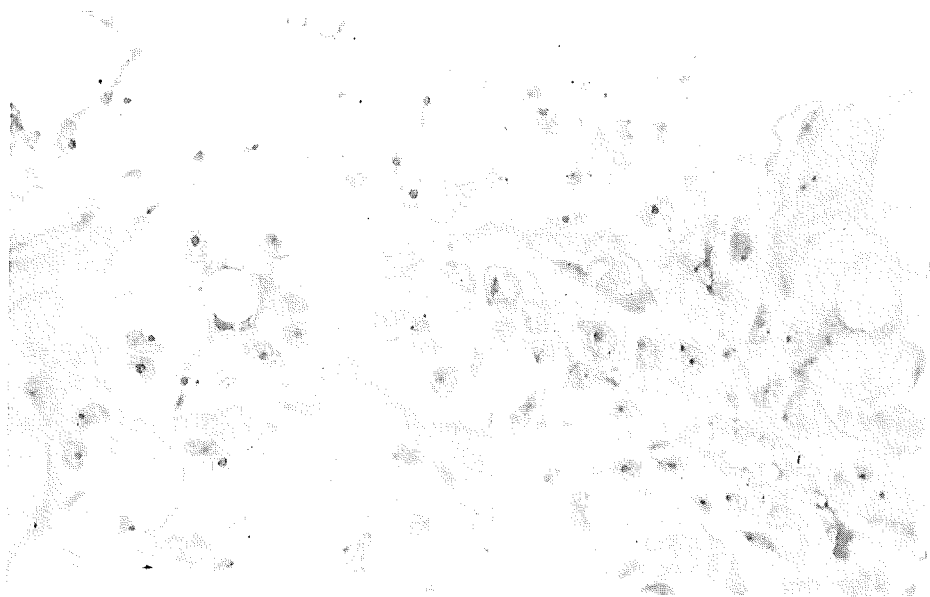


FIGURE 1

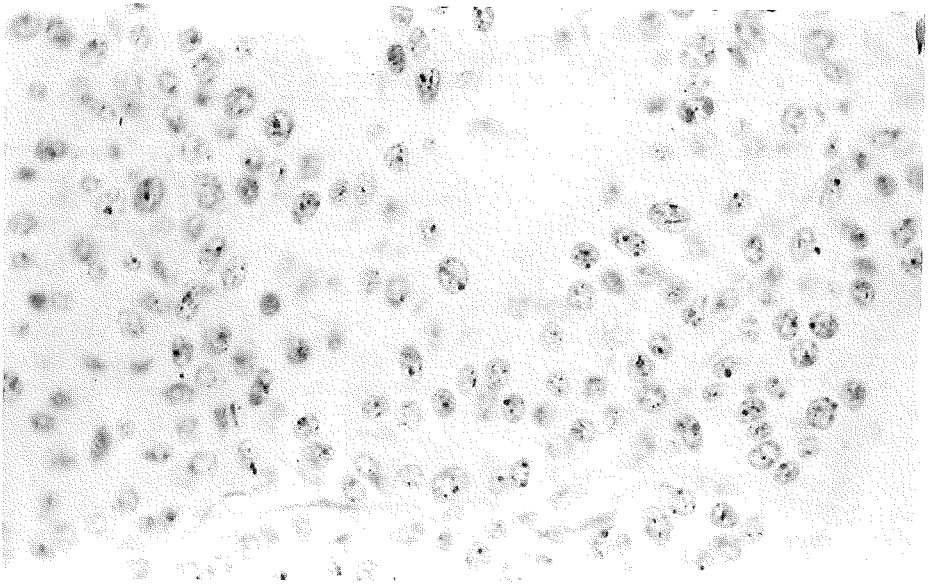


FIGURE 2

TECHNIQUE ET QUANTIFICATION MORPHOMÉTRIQUE DE L'INDEX D'ANEUPLOÏDIE DES TUMEURS SOLIDES ETUDE DE 70 CAS DE CANCER DU SEIN

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

Laboratoire des Technologies Nouvelles Val d'Aurelle 34094 Montpellier cedex

INTRODUCTION

Cette étude a porté sur 70 malades n'ayant subi aucun traitement avant l'intervention chirurgicale. Les comédo K (cancers in situ non invasifs) ainsi que les cancers médullaires (type particulier) ont été éliminés de l'étude.

PRINCIPE

L'ADN est mis en évidence par la **réaction nucléale de FEULGEN**. L'ADN est soumis à une hydrolyse acide brisant les liens purine-désoxyribose, ce qui entraîne la production d'aldéhydes libres qui réagissent spécifiquement avec le réactif de Schiff : coloration rouge de l'ADN qui permet de visualiser et de quantifier le degré d'Aneuploïdie des cellules.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'étalement se fait à partir de tumeurs frai-

ches. Il est important d'éliminer toute graisse et de ne conserver qu'une partie typique. La tumeur est coupée sous forme d'un cube de 0,5 cm de côté, on fait glisser sur la lame une arête de ce cube. L'étalement doit être minutieux car il est important que les cellules soient bien séparées.

Les lames sont ensuite fixées dans un mélange de 1/4 Formaldéhyde, 3/4 Alcool à 95° pendant 10 minutes, puis rincées dans 3 bains d'alcool à 95° (2 mm chaque bain) et conservées à température ambiante.

Les lames sont ensuite réhydratées puis hydrolysées dans HCL 5N pendant 30 minutes à température ambiante. On arrête l'hydrolyse par rinçage dans l'eau distillée froide. Les lames sont ensuite colorées dans le réactif de Schiff pendant 2 heures à température ambiante. Ensuite 3 rinçages de 5 minutes dans l'eau sulfureuse pour éliminer le Réactif de Schiff en excès. Rinçage à l'eau distillée. Alcool, Toluène, montage au baume.

ACQUISITION ET ANALYSE DES DONNÉES

La **quantification** de l'ADN nucléaire se fait par mesure de la densité optique des noyaux à l'aide de l'analyseur d'images **SAMBA 2000**.

Celui-ci comprend :

- un capteur intégrant un microscope relié à une caméra. Assure l'exploration et l'acquisition des images.

- un processeur de traitement et d'analyse des images.

- une imprimante.

- un moniteur de contrôle.

La distribution des densités optiques des cellules analysées pour chaque tumeur peut être appréciée sur un histogramme.

La population cellulaire tumorale est appréciée par rapport à une population témoin (foie) dont on connaît la distribution des cellules diploïdes et tétraploïdes.

On obtient ainsi 3 types d'histogrammes.

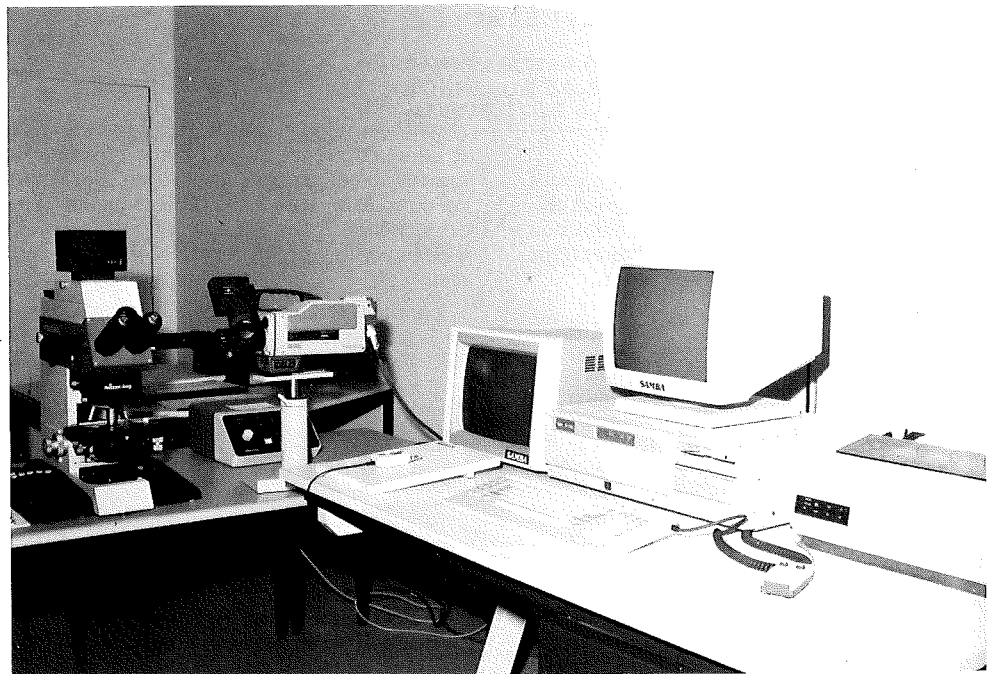
RÉSULTATS

L'index de diploïdie varie en fonction du grade : le nombre de cellules diploïdes diminue quand le grade s'élève. L'écart type important pour les grades élevés montre l'hétérogénéité de ces groupes.

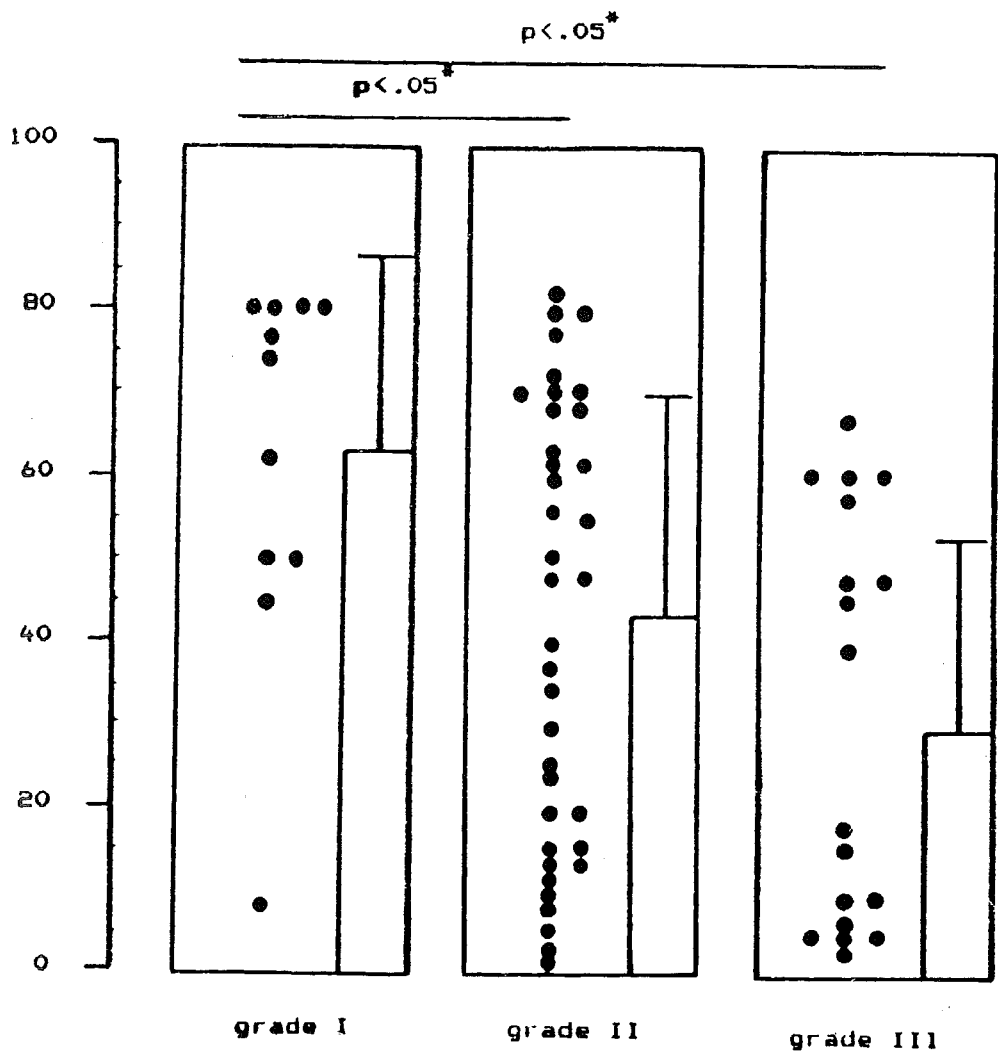
L'analyse de l'intervalle de confiance permet d'étudier l'étalement des histogrammes donc le caractère aneuploïde.

CONCLUSION

Cette technique est utilisable en routine car elle fiable, la réaction est stœchiométrique, la lecture est quantitative. La réalisation est plus simple que la cytométrie de flux (notamment moins d'artefacts pour les études sur les tumeurs solides).

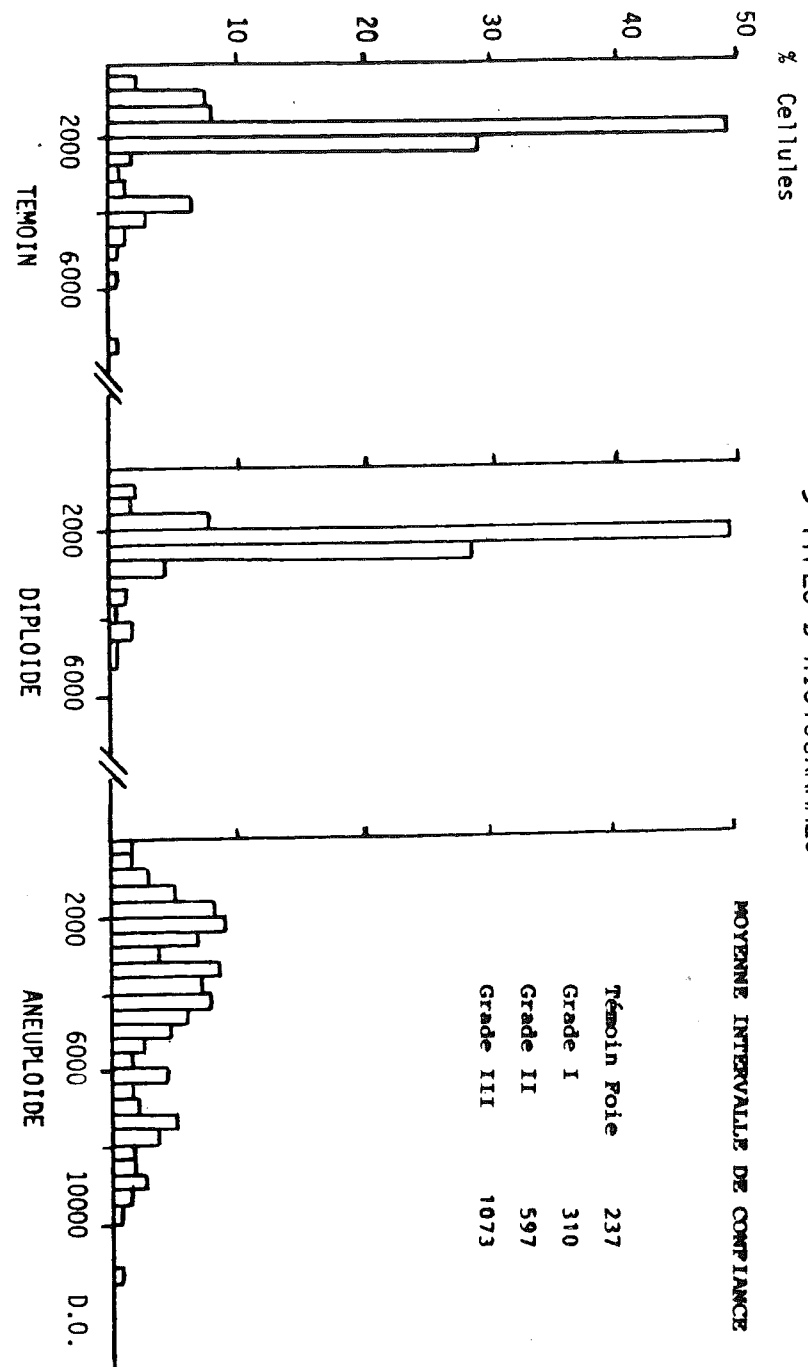


Moyenne de diploidie en fonction du grade histologique



* Mann Whitney U test

3 TYPES D'HISTOGRAMMES



L'HISTOPHARMACOLOGIE : DES TECHNIQUES HISTOLOGIQUES AU SERVICE DE LA PHARMACOLOGIE, OU UNE APPROCHE ORIGINALE DE LA RECHERCHE PHARMACOLOGIQUE ?

J. SECCHI ET D. LECAQUE

Centre de Recherches Roussel Uclaf - 93230 Romainville

Il est communément admis au sein d'un Centre de Recherches Pharmaceutiques que les molécules nouvellement synthétisées par les Chimistes, et dont l'une d'entre elles deviendra un jour peut-être un médicament, sont amenées à effectuer dans les différents laboratoires un long parcours, le plus souvent périlleux et semé d'embûches. C'est le Département de Pharmacologie qui, le premier, accueille ces molécules et se charge d'en démontrer l'activité au moyen de tests pratiqués chez l'animal. Dès lors, une sélection sévère s'opère, et les composés choisis pour leur efficacité dans un domaine donné de la thérapeutique, sont ensuite expérimentés « in vitro » au niveau moléculaire. C'est ainsi que la Biochimie, à l'aide de ses propres techniques d'analyse, recherche leur affinité pour les récepteurs cellulaires et tente d'en expliquer leur mécanisme d'action. Si, à la suite de ces études, l'une des molécules se distingue de ses voisines par des propriétés originales, elle est alors adressée au Département de Pharmacocinétique qui va s'efforcer d'en suivre la distribution tissulaire dans l'organisme et d'en con-

naître le devenir par l'isolement de ses métabolites. D'autres disciplines, telle la Galénique, mettront au point le vecteur ou l'excipient adéquat tout en contrôlant la pureté et la stabilité du nouveau produit. Enfin, avant son passage en clinique, étape très attendue parce qu'elle doit donner un verdict définitif quant à son efficacité chez l'homme, il convient de s'assurer que la molécule « élue » se trouve dénuée de tout effet toxique. Pour ce faire, le Département de Toxicologie, s'appuyant sur des essais à long terme et à des doses élevées, menés chez plusieurs espèces animales, cherchera à déceler les effets nocifs susceptibles de survenir en cours de traitement. Et c'est seulement en fin d'essai, après le sacrifice des animaux, que les Anatomo-Pathologistes procéderont à l'examen histologique des divers organes prélevés.

Ainsi, il faut attendre l'ultime étape des recherches biologiques pour que soient pris en compte les changements se manifestant dans les structures cellulaires et tissulaires des animaux traités, et pour que l'Histologie mette sa métho-

dologie au service de l'Anatomo-Pathologie, perdant de la sorte le caractère de science fondamentale que généralement on lui prête. Nul, à ce jour, ne contesterait la nécessité impérieuse d'une telle discipline en Toxicologie. Mais alors, on est en droit de se poser la question suivante : l'Histologie n'a-t-elle pas aussi un rôle à jouer dans d'autres étapes de la recherche du médicament et, en particulier, lors des investigations pharmacologiques ? Curieusement, les informations pouvant être fournies par des études de morphologie microscopique ou d'histochimie, n'ont trouvé dans ce secteur de la recherche que peu d'échos semble-t-il. Il est pourtant acquis que, dans certains domaines comme l'Endocrinologie, des observations faites sur le ou les organes cibles d'un nouveau composé hormonal à tester, montrent l'existence de modifications tissulaires d'ordre trophique, les unes observables à l'œil nu, mais d'autres n'étant visibles qu'en microscopie. Un examen attentif de coupes histologiques peut, en effet, révéler des transformations structurales précoces en réponse au traitement. Il permet, de plus, de faire la distinction entre les différents types cellulaires intéressés et de donner davantage de précisions quant à la spécificité d'action de la molécule étudiée. Enfin, l'intensité de la réponse peut être appréciée en fonction de la dose administrée. Voilà seulement quelques remarques issues de l'expérience et qui devraient inciter la Pharmacologie à prêter à l'Histologie une part plus active dans ses recherches, d'autant plus que cette dernière possède, dès à présent, des outils qui lui permettent d'appréhender d'une manière quantitative les phénomènes observés.

Pour illustrer notre propos, voyons à l'aide d'exemples, quelles sont les possibilités offertes par ce que nous appellerons désormais l'Histopharmacologie. Ces exemples ont été choisis plus précisément dans le cadre de l'Endocrinologie sexuelle où sont étudiées trois grandes familles d'hormones : les estrogènes et les progestagènes chez la femelle, et les androgènes chez le mâle.

- L'effet d'une hormone **estrogène** sur un organe cible comme l'utérus est, en pharmacologie générale, rapidement apprécié par une

pesée de l'organe en fin de traitement. Cette hormone provoque en trois jours une augmentation considérable de la taille et, par conséquent, du poids de cet utérus. Des effets-dose avec des composés estrogéniques voisins de l'hormone naturelle, l'estradiol, ainsi que des activités antagonistes provenant de nouvelles molécules de synthèse, peuvent être évalués par cette simple méthode (Test de Lauson chez le rat). Mais, dans ce cas, aucune information ne nous est apportée sur l'état des différentes couches cellulaires qui entrent dans la composition de l'utérus en question. Si l'on procède, par contre, à un examen histologique en microscopie optique, et ce dès les premières heures qui suivent l'administration du produit, on constate que plusieurs sortes d'événements sont en cours. Des mitoses en nombre important affectent l'épithélium qui borde la lumière et, à un degré moindre, le stroma de l'endomètre ainsi que le myomètre. Elles témoignent, selon les couches, d'un effet plus ou moins hyperplasiant de l'hormone administrée. Ces mitoses, après un blocage à la colchicine, peuvent être aisément comptées et les index mitotiques qui en résultent, comparés. Le degré d'œdème du stroma, reflet d'une imbibition massive et passagère, propre aux estrogènes (phénomène d'Astwood) peut être apprécié de façon semi-quantitative. Il est possible aussi d'estimer l'activité hypertrophique de l'hormone de manière précise par des mesures des hauteurs épithéliales ainsi que des épaisseurs des couches cellulaires qui entrent dans la constitution de l'organe (réf. 1). De cette manière, avec l'aide de l'histologie, sont réalisées des séries d'observations et de mesures qui permettent de mieux évaluer les effets propres de chacun des stéroïdes ou autres hormones testés et de mieux les comparer entre eux ainsi qu'au corps de référence (voir fig. 1).

- La **progestérogène**, l'autre hormone femelle issue du corps jaune de l'ovaire et responsable des phénomènes de nidation et de gestation, n'agit qu'en synergie avec l'estradiol. L'utérus, qui est la cible préférentielle de cette hormone, doit être dans un premier temps sensibilisé (« priming » des Anglo-Saxons) par l'estrogène, et ce n'est que plusieurs jours après que la progestérogène est en mesure de jouer son rôle en induisant les transformations tissulaires propices à une bonne implantation du blastocyste.

Le test de pharmacologie le plus couramment employé pour mimer cette séquence hormonale est le Test de Clauberg-Mc Phail chez la lapine. Chez cet animal, l'hormone progestative administrée après le « priming » à l'estrogène, a la propriété de faire proliférer l'épithélium glandulaire de l'utérus, à tel point que cet épithélium prend, en 4 à 5 jours, un aspect dentelé caractéristique (dentelle utérine déjà décrite par Bouin et Ancel en 1924). Un tel effet ne peut être apprécié que sur des coupes histologiques des cornes utérines prélevées après le sacrifice des animaux. Le degré de prolifération épithéliale, reflet de l'activité hormonale, est évalué de façon semi-quantitative selon une échelle de valeurs allant de 0 à 4. Par cette méthode, il est possible de tester des molécules agonistes données à la place de la progestérone dans la deuxième partie du test, ou des anti-hormones qui seront, elles, administrées conjointement à la progestérone. Cependant, ce test ne permet qu'une estimation globale portant sur une somme d'événements qui se sont déroulés dans le temps et dans lesquels sont confondus les effets de l'estradiol et ceux propres à la progestérone. Afin de mieux saisir un effet précoce et, si possible, plus spécifique de la progestérone, il s'avérait nécessaire d'examiner de plus près et dans un temps court, les premières manifestations cellulaires après l'induction hormonale. Celles-ci, d'ordre métabolique, apparaissent, entre autres sous la forme d'une mise en réserve de glycogène dans les cellules de l'épithélium glandulaire quelques heures avant l'apparition de mitoses. La charge en glycogène, révélée sur des coupes à la paraffine par la réaction à l'APS, atteint son maximum d'intensité à la 6^e heure. La même réaction adaptée à la microscopie électronique (méthode de Thiéry) montre que la synthèse débute dès la première heure sous l'aspect de granules opaques aux électrons et disséminés dans tout le cytoplasme. Il s'agit d'un phénomène transitoire mais qui a l'avantage d'être quantifiable. Il constitue un test d'activité hormonale et l'expérience montre qu'il est approprié à la progestérone et aux hormones progestomimétiques de synthèse (réf. 2). Des stéroïdes antagonistes, comme le RU 486, empêchent son apparition lorsqu'ils sont donnés en même temps que la progestérone (voir fig. 2).

- Pour évoquer l'activité d'une hormone **androgène**, nous prendrons comme modèle d'étude les glandes sébacées. Il se trouve, en effet, que ces glandes, responsables de la sécrétion permanente de sébum, sont sous contrôle endocrinien et, plus spécialement, dépendantes de la testostérone. Leur hyperactivité se caractérise par une hyperséborrhée qui est, elle-même, une des composantes de l'acné juvénile. Disposant de molécules anti-androgènes susceptibles d'agir par voie topique, il était intéressant de mettre au point un test chez l'animal afin de prouver leur efficacité dans ces conditions. Mais la petite taille des glandes sébacées et leur situation dans le derme profond qui rend leur accès difficile, constituent des obstacles à leur étude pharmacologique. D'autre part, les variations morphologiques dues à une privation hormonale ne sont pas suffisantes pour être aisément détectables en microscopie optique dans les jours qui suivent une castration. Il fallait, dans ce cas, recourir à la microscopie électronique. Cette technique permet de révéler les sites de synthèse des lipides du sébum. Il s'agit des vésicules du réticulum endoplasmique lisse visibles dans les cellules de la couche intermédiaire placée immédiatement au-dessus des cellules basales indifférenciées. Ces vésicules se présentent en nombre assez abondant chez l'animal entier et leur densité volumique peut être calculée par stéréologie. L'expérience montre que la densité volumique décroît de façon considérable après la castration et que le retour à la normale se fait rapidement après administration de testostérone par voie générale. Un excès de cette hormone aboutit à des images semblables à celles observées chez le sujet hyperséborrhéique (réf. 3 et 4). Ainsi, par cette méthodologie, il est possible d'apprécier les effets d'hormones antagonistes lorsque celles-ci sont données par voie locale tout en contrôlant, en même temps, leur éventuelle activité sur les organes profonds androgéno-dépendants comme la prostate ou les vésicules séminales (voir fig. 3).

Ces quelques exemples choisis dans un domaine spécifique, l'Endocrinologie sexuelle, ne peuvent certes donner qu'un petit aperçu du rôle dévolu à l'Histopharmacologie en recherche pharmaceutique. Ils ne doivent pas faire oublier non plus les problèmes inhérents à la lourdeur des techniques histologiques prises

dans leur ensemble. Lourdeurs dues essentiellement à la longue préparation des échantillons, ce d'autant plus que leur nombre s'avère être important lors de chaque expérimentation pharmacologique, mais aussi à la lecture des images fournies par les microscopes optiques et électroniques. Cependant, s'il est malaisé, voire impossible, de raccourcir les techniques préparatoires, l'interprétation des images est aujourd'hui grandement facilitée par l'intervention d'analyseurs interactifs associés à des systèmes d'archivage (bandes magnétiques, vidéodisques, disques optiques numériques). Le rappel, à tout moment, de ces images recueillies par caméra, leur comparaison sur écran (imageur documentaire), rendent plus commode, dans un premier temps, l'appréciation qualitative par l'observateur, avant que ne soient faits, dans un deuxième temps, les mesures et les comptes désirés avec les traitements statistiques consécutifs. La figure 4 donne une idée d'une telle configuration dans son développement optimum. Il va sans dire que son caractère modulable se prête à une adaptation aux besoins particuliers de chaque laboratoire.

Arrivés maintenant au terme de notre exposé, est-on en mesure d'apporter une réponse à la question formulée plus haut, dans le titre, à savoir : l'Histopharmacologie est-elle une (ou des) technique histologique au service de la Pharmacologie ou bien une approche originale de la recherche du médicament ?

Le premier terme de l'alternative nous semble trop restrictif et le deuxième, par contre, très ambitieux. A notre avis, l'Histopharmacologie est avant tout une démarche qui permet, à l'aide de techniques propres à l'Histologie, de saisir des informations relatives à des structures ou à des composants tissulaires et cellulaires chez un animal en expérimentation et d'en faire, si possible une analyse quantitative. C'est dans ces conditions, et en liaison étroite avec d'autres disciplines, qu'elle doit contribuer activement à une meilleure connaissance de l'activité des nouvelles molécules étudiées.

BIBLIOGRAPHIE

1. J. SECCHI, D. LECAQUE, C. TOURNEMINE and D. PHILIBERT
Histopharmacology of RU 486 in « The anti-progestin

steroid RU 486 and human fertility control ». Ed. by Etienne-Emile BAULIEU and Schelden J. SEGAL
Plenum Publishing Corporation, 1985.

2. J. SECCHI, D. LECAQUE, C. TOURNEMINE and D. PHILIBERT
Early glycogenesis in the uterine glandular cells of the rabbit induced by progestins : a quantitative investigation.
Cell Tissue Res. (1987) 248 : 359-364.
3. D. LECAQUE and J. SECCHI
Ultrastructural changes of sebaceous glands in castrated and testosterone-treated male rats.
Cell Tissue Res. (1982) 226 : 621-628
4. M.M. BOUTON, D. LECAQUE, J. SECCHI and C. TOURNEMINE
Effect of a new topically active antiandrogen (RU 38 882) on the rat sebaceous gland : comparison with cyproterone acetate.
The Journal of investigative dermatology (1986) vol. 86, n° 2, 163-167.

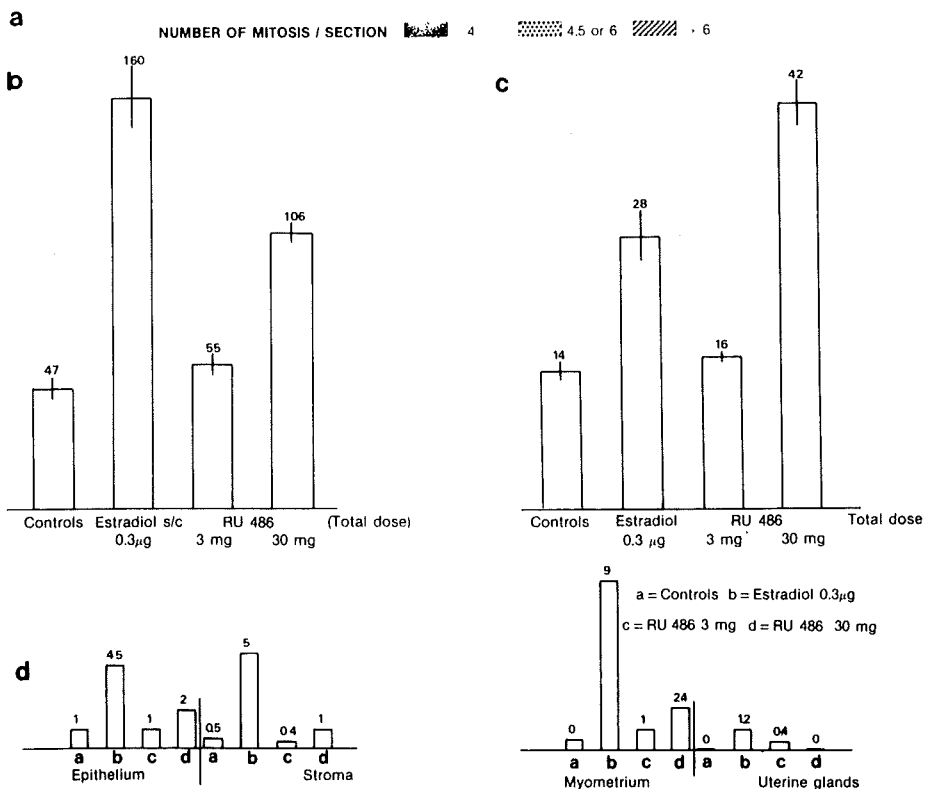
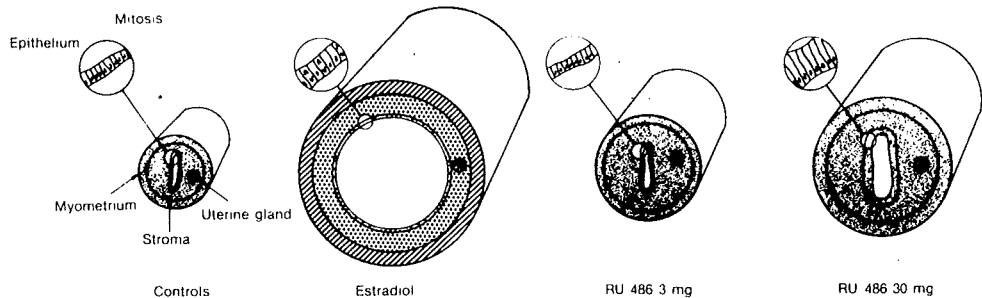


FIGURE 1

Étude histologique de l'utéroprothie chez le rat.

a) Schémas de cornes utérines de rates impubères traitées à l'estradiol et au RU 486.

b) Mesures des coupes transversales de cornes utérines (mm²).

c) Mesures des hauteurs de l'épithélium luminal (μ m).

d) Nombre de mitoses/coupe dans les différentes parties de l'utérus.

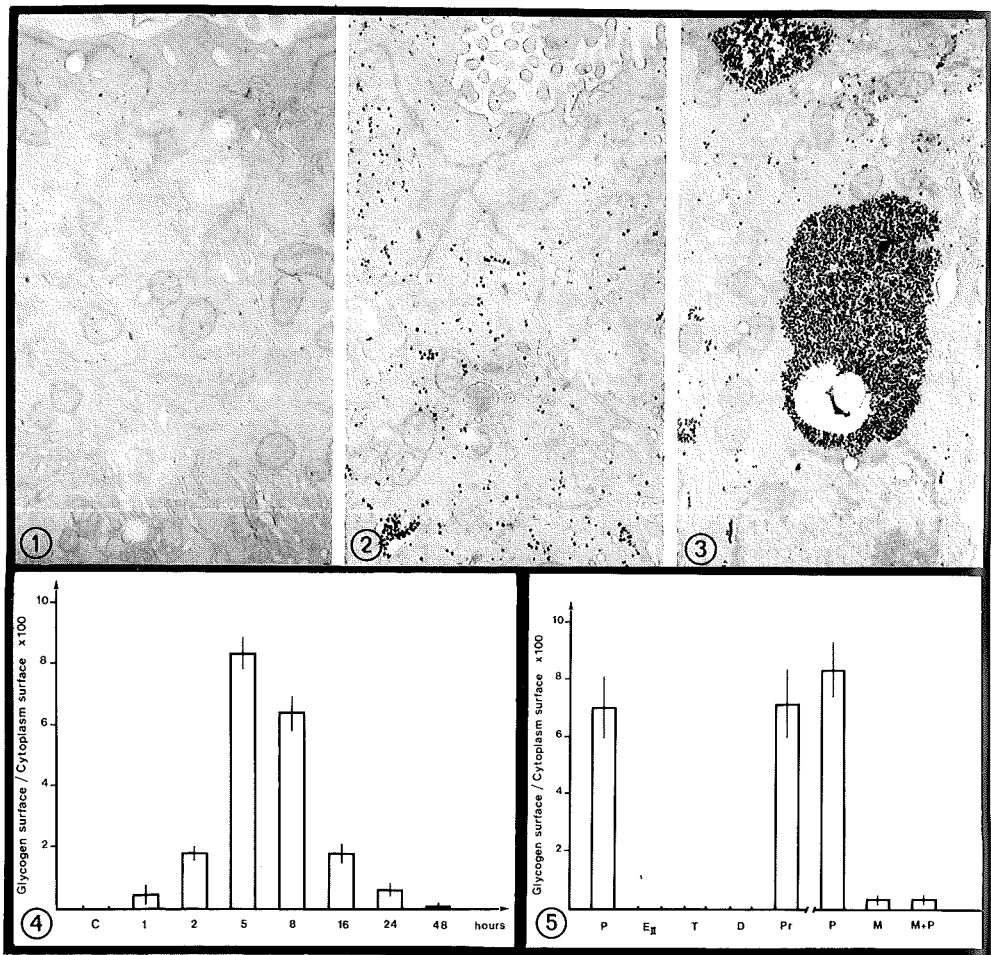


FIGURE II

En haut : portions de cellules glandulaires utérines chez des lapines impubères primées et traitées à la progestérone (P). 1) Contrôle, 2) 1 h après administration de P, 3) 6 h après P. Le glycogène apparaît sous forme de grains noirs. MET x 15 000. En bas : 4) cinétique d'apparition du glycogène après une simple injection de P (surface occupée par le glycogène par unité de surface de cytoplasme). 5) Effets d'une seule administration d'estradiol (E_{II}), de testostérone (T), de dexaméthasone (D) et de promégestone (Pr). La mifépristone (M) ou RU 486 donnée seule n'a que peu d'effets. Par contre, donnée conjointement à P, elle empêche la formation du glycogène.

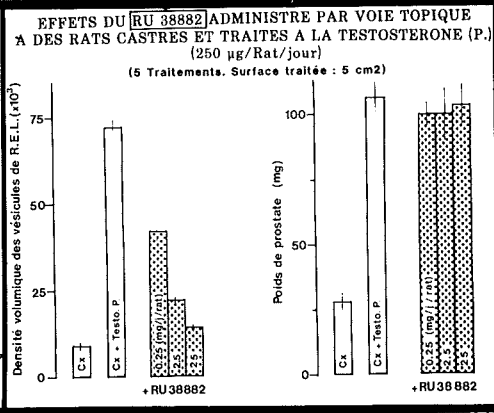
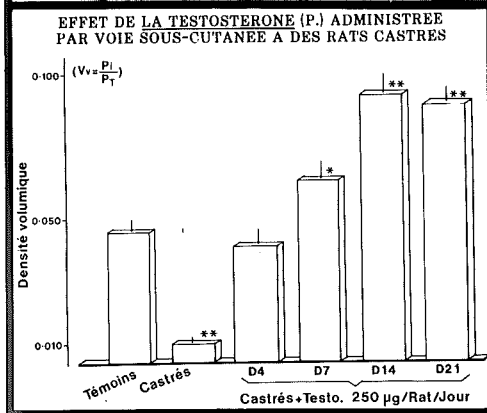
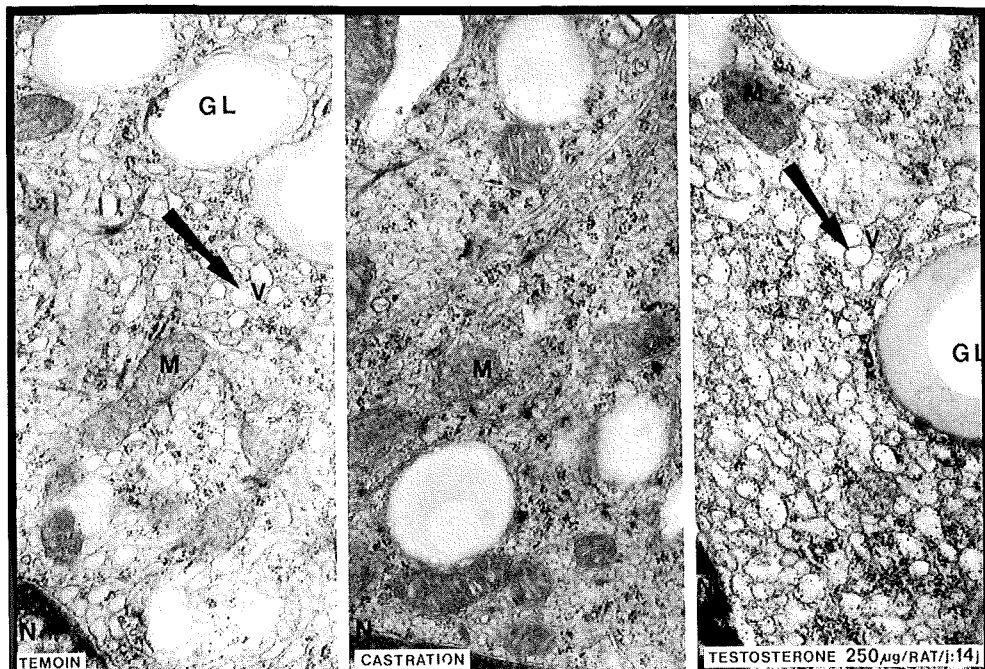


FIGURE III

En haut : portions de cellules intermédiaires de glandes sébacées de rat. Effets de la castration et de la suppléance en testostérone (T) sur les vésicules du R.E.L. MET x 25 000. En bas : histogrammes montrant les effets de T et du RU 38 882 administré par voie topique.

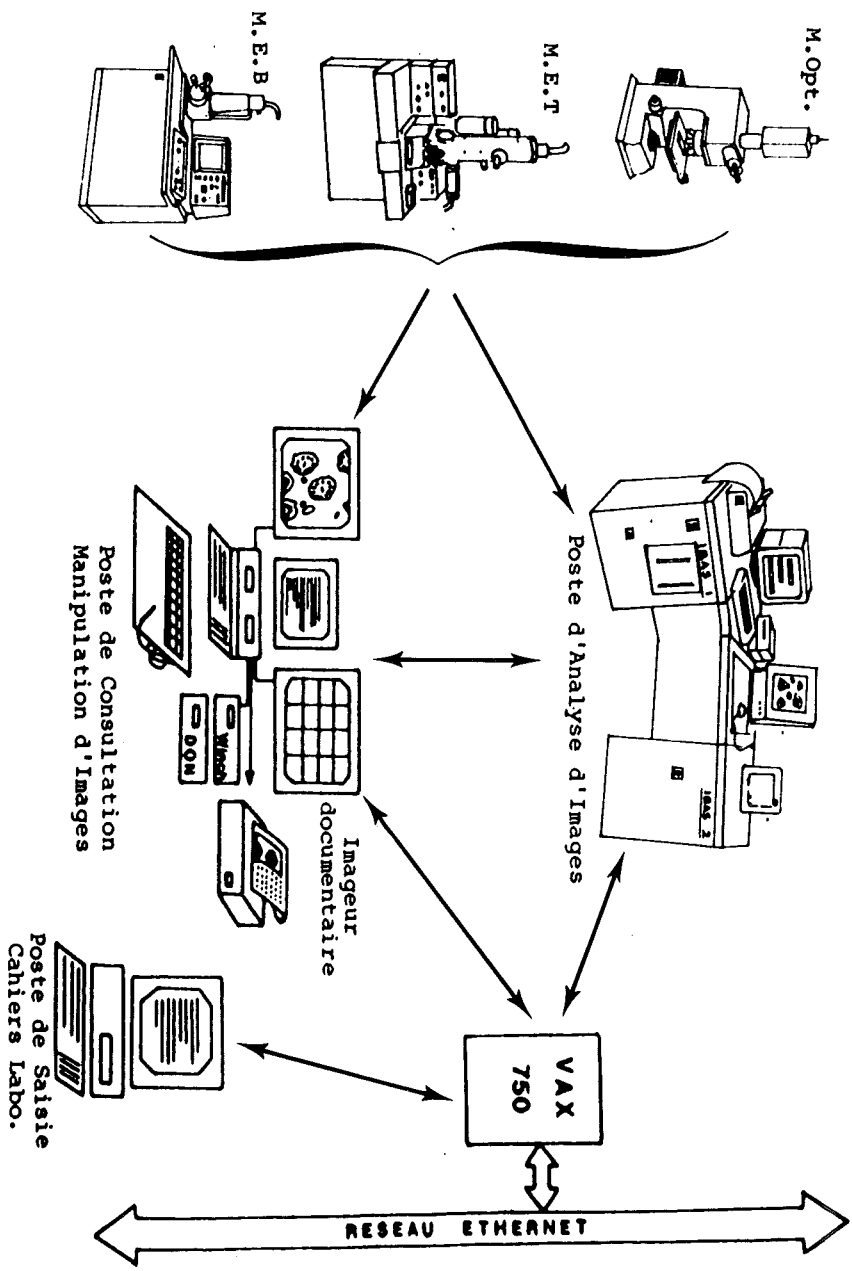


FIGURE IV

Configuration envisageable pour le traitement et l'analyse d'images provenant des microscopes optiques et électroniques.

COLORATION DES GRAISSES

Une méthode d'obtention d'un témoin positif

J.-L. BOIZIAU

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

En histologie, les réactions histochimiques doivent faire l'objet d'un contrôle. Celui-ci se pose en terme de sensibilité de la réaction, un des moyens les plus simple est l'utilisation d'un organe, témoin positif.

Nous avons été amené à utiliser dans nos laboratoires une technique simple et fiable d'obtention d'un foie riche en graisse qui, incorporé aux lames tests, permet d'assurer un suivi dans les temps, de la coloration à l'Oil Red O.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Chez un rat de 700 g, présentant un tissu adipeux sous-cutané important, il est provoqué une stéatose hépatique par une mise à jeûne de l'animal pendant 72 heures (1). Après sacrifice, le foie est prélevé puis coupé en fragments de 5 mm maximum d'épaisseur afin d'assurer une fixation rapide et homogène par une solution à Ph7 de formaldéhyde à 10 %.

Le prélèvement après fixation est rincé à l'eau courante puis congelé sur la platine d'un cryomat (type Jung). Une fois la pièce congelée et la température stabilisée aux environs de moins 10° C, des coupes de 10 µm sont effectuées. Après étalement sur eau distillée, les coupes sont récupérées sur des lames préalablement enduite d'albumine glycéinée (Merck), avant d'être séchées, à l'abri de la poussière pendant 48 h à température ambiante.

La mise en évidence des lipides se fait par une coloration d'Oil Red O : (2)

- Alcool isopropylique à 60 % 1 mn
- Oil Red O 20 mn
- Alcool isopropylique à 60 % 3 passages d'un total de 30 sec.

- Eau distillée
- Hémalun 1 mn
- Eau
- Eau distillée
- Montage au glycérogel

Préparation de la solution d'ORO :

- Solution mère :
 - ORO (Sigma) à 0,5 g
 - Alcool isopropylique à 99 % 100 ml
- Solution de travail :
 - 6 ml de sol. mère + 4 ml d'eau distillée, remuer, laisser reposer au moins 1 h puis filtrer sur Whatman 42.

RÉSULTATS

A l'examen macroscopique, le foie apparaît décoloré, friable et présentant des lobes à bords « mousses ».

Du point de vue histologique, on observe de fines vacuoles intracytoplasmiques :

- optiquement vide à l'hématoxyline éosine

sur coupes en paraffine (dissolution des graisses par des agents clarifiants lors de l'inclusion).

- colorées en rouge vif par l'ORO.

DISCUSSION

La teneur en lipides du foie est la résultante d'un équilibre dynamique. La cellule hépatique recueille, consomme, synthétise et rejette des lipides selon ses besoins. Il est des situations où elle est débordée et d'autres où elle est paralysée. Le foie ne constitue pas un organe de mise en réserve des graisses. Toutefois, il peut se surcharger en graisse par excès d'apport, par défaut d'évacuation ou bien par excès de mobilisation des graisses, à partir du tissu adipeux ou par troubles métaboliques de la cellule hépatique (3).

La priorité du métabolisme hépatique est de fournir suffisamment de glucose aux tissus qui dépendent de cette source d'énergie (cerveau, muscles...). Environ 60 % des graisses absorbées servent à la synthèse de nouvelles molécules de glucose. Le reste est transformé en phospholipides, puis en lipoprotéines solubles dans le plasma. L'énergie excédentaire, quant à elle, est mise en réserve dans la partie acide gras des triglycérides. Ces « graisses de réserve » se trouvent ainsi stockées dans le tissu adipeux.

Lors du jeûne, le processus métabolique dominant suite à un manque d'apport d'énergie exogène, entraîne :

- une mobilisation des triglycérides et acides gras adipocytaires après lipolyse.

- suivi d'une oxydation au niveau des hépatocytes avant de fournir des corps cétoniques. La partie glycérol est transformée en glucose.

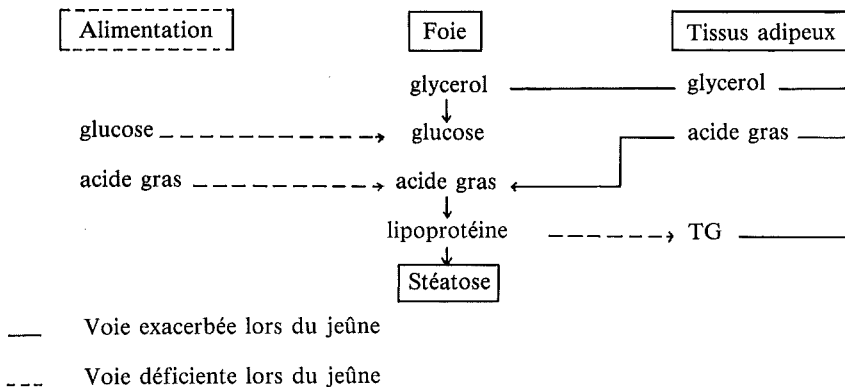
Parallèlement, la synthèse lipoprotéique diminue (conséquence d'une déficience en facteurs lipotropes exogènes : choline, bétaïne, méthionine...), entraînant une accumulation de graisses dans le foie (stéatose).

Mettant à profit ce phénomène métabolique, nous avons donc pu obtenir de façon reproductible des témoins positifs pour la recherche des lipides hépatiques.

RÉFÉRENCES

1. BENARD H. & GAJDOS A. - Les fonctions hépatiques. Études physio-pathologique. Masson & Cie, Paris, 1952.
2. ASHBURN L. - Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration. *Arch. Pathol.*, 1943, 3, 432-435.
3. JUBB K.V.F., KENNEDY P.-C & PALMER T.-M. - Pathology of domestic Animals. 3rd Edition, Vol. 2, Academic Press, New York, 1985.

MÉTABOLISME SCHÉMATIQUE DES TRIGLYCÉRIDES DANS LE FOIE



COMPARAISON ENTRE LES MÉTHODES AUTORADIOGRAPHIQUE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE DE DETECTION DE LA SYNTHÈSE D'ADN

J.-L. BOIZIAU & G. PAULUS

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

La méthode classique pour détecter la synthèse cellulaire est l'incorporation à l'ADN de thymidine tritiée. Cette dernière est ensuite détectée par autoradiographie.

Récemment, une technique non autoradiographique est apparue, utilisant un anticorps pour détecter cette incorporation (1).

Il a été intéressant de comparer :
1° *Le degré d'incorporation* de la Bromodeoxyuridine par rapport à la Thymidine.

La Bromodeoxyuridine, dérivé substitué (en 5 par un halogène) de la deoxyuridine, est un analogue pyrimidique de la thymidine pouvant s'incorporer spécifiquement à l'ADN lors de sa replication.

Abréviations :

ARG : Autoradiographie
ICC : Immunocytochimie
Brd-Urd : Bromodeoxyuridine
THY : Thymidine
AFA : Alcool - Formol - Acide acétique
DAB : Diaminobenzidine
NRS : Sérum normal de lapin

MA Brd-Urd : Sérum de souris anti-Brd-Urd
RAM/IgG : Sérum de lapin anti-IgG de souris
M/PAP : Complexe PAP de souris
PAP : Peroxydase anti-peroxydase

2° La faisabilité de la technique immunocytochimique par rapport à l'autoradiographie.

La détection des cellules qui incorporent la bromodeoxyuridine à leur ADN, est visualisée soit par autoradiographie soit par immunocytochimie (2). Pour mener à bien cette étude comparative, il a été décidé d'étudier le marquage in vivo des entérocytes de l'iléon de souris.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. PRÉPARATION DES TISSUS

Les souris ont été traitées par injection intrapéritonéale de 0,5 ml d'eau physiologique stérile contenant :

- 4 mg de Brd-Urd froide
- ou - 50 μ CI de ^3H -Brd-Urd
- ou - 50 μ CI de ^3H -THY

Une heure après injection, les animaux ont été sacrifiés. Les iléons ont été prélevés, rincés dans de l'eau physiologique puis immergés dans le fixateur.

2. FIXATION, INCLUSION ET COUPE

2.1 Fixation

Pour la technique ICC :

- formol 10 % neutre pendant 48 h à 72 h à température ambiante.

Pour la technique ARG :

- AFA pendant 24 h à 4°C.
- Recoupe des organes
- Lavage à l'eau distillée pendant 1 h.

2.2 Inclusion

En paraplast Plus à 57°C.

NB : lors de la déshydratation et clarification, pour diminuer le bruit de fond et les interférences de l'ARG, éviter l'emploi de réactifs stockés dans des bidons métalliques.

2.3 Coupe

- 3 coupes par bloc, espacées chacune de 20 μm .

Les coupes réalisées à 3 μm sur Histo-range LKB, ont été étalées à 45°C puis recueillies sur les lames préalablement enduites pour :

- L'ICC : de colle blanche.
- L'ARG de gélatine.

Elles ont ensuite été séchées une nuit à 37°C.

3. AUTORADIOGRAPHIE

Toutes les manipulations des lames jusqu'au stade final du développement se sont faites en chambre noire sous lumière inactinique (Filtre F904 Ilford).

3.1 Coulage de l'émulsion

Émulsion K2 de Ilford diluée au demi et maintenue dans un bain marie à 43°C. Les lames déparaffinées, déshydratées et amenées à l'eau distillée, sont plongées une par une dans l'émulsion liquide. Une fois le dos de la lame nettoyé, cette dernière est déposée à plat sur une plaque réfrigérante dépourvue d'humidité pendant 10 minutes.

La couche d'émulsion étant prise, les lames sont stockées en position verticale sur un portoir, en laissant une distance de 10 mm entre chaque, et mises une nuit à température ambiante dans un dessiccateur contenant un gel de silice.

3.2 Exposition

14 jours à +4°C dans des boîtes « Kartell » hermétiquement closes et étanches vis-à-vis de la lumière et contenant de l'actigel. Pour le rangement des lames, un intervalle d'un cran a été gardé entre chacune (environ 10 mm)

3.3 Développement

Par panier de verre en respectant une

distance d'environ 10 mm entre chaque lame.

Phenisol	10 mn
Bain d'arrêt	10 sec
Fixateur	2 mn
Eau distillée	2 mn
Eau courante	60 mn

NB : Ces différents bains sont changés à chaque panier.

3.4 Post-coloration

Alcool 50	20 sec
Hématoxyline de Erlich	3 mn
Eau	2 × 30 sec
HCl à, 2 %	20 sec
Eau courante	10 mn
Déshydratation et montage au DPX	

NB : Il est impératif de respecter une certaine distance entre les lames une fois l'émulsion coulée afin d'éviter l'ionisation de l'émulsion par les rayonnements et l'apparition de bruit de fond.

4. IMMUNOCYTOCHIMIE

On utilise un anticorps monoclonal anti-bromodeoxyuridine et une technique peroxydase anti-peroxydase.

La partie délicate de la technique est la dénaturation de l'ADN. Cette dénaturation doit être suffisamment poussée pour rendre accessible les sites antigéniques sans les détruire. Deux étapes sont nécessaires.

- une hydrolyse partielle de l'ADN.
- une digestion enzymatique par une protéase. Cette digestion permet une augmentation des sites antigéniques révélés et une amplification du marquage pour une même dilution d'anticorps et un même temps de révélation par le DAB (Fig. 3 & 4).

Coloration

Xylène	2 × 8 mn
Alcool 100°	2 × 8 mn
H ₂ O ₂ à 1 % dans le méthanol	30 mn
Eau distillée	5 mn
HCl 2N à 37°C	60 mn
PBS	2 × 4 mn
Digestion à 37°C	15 mn
PBS	2 × 4 mn
NRS 1/10	20 mn
M.A. Brd-Urd 1/50	60 mn
PBS	2 × 4 mn
R.A.M./IgG 1/40	30 mn
PBS	2 × 4 mn
M/PAP 1/50	30 mn
PBS	2 × 4 mn
DAB	8 mn
PBS	4 mn
Eau courante	4 mn
Hémalun de mayer	1 mn
Eau courante	1 mn
Eau acétifiée	20 sec
Eau courante	2 mn
Déshydratation et montage au DPX.	

LISTE DES RÉACTIFS

- Thymidine (Sigma)
- Brd-Urd (Sigma)
- [methyl-³H] thymidine (Amersham) activité spécifique 25 Ci/mmol ramenée par dilution isotopique à 5 Ci/mmol.
- 5-Bromo-2' Deoxy [1', 2-³H] Uridine (Amersham) activité spécifique 36 Ci/mmol ramenée par dilution isotopique à 5 Ci/mmol.
- Fixateur : alcool-formol-acide acétique (AFA).
 - éthanol absolu 1 000 ml
 - acide acétique glacial 65 ml
 - Formaldéhyde 65 ml
- Colle blanche :
 - colle rubafix extra forte 10 ml
 - eau distillée 100 ml

RÉSULTATS

Tableau 1 (Fig. 1 & 2)

ARG	3 H - THY			3 H - Brd-Urd		
	Cellules marquées	Cell. non marquées	Labelling Index %	Cellules marquées	Cell. non marquées	Labelling Index %
Animal						
1	616	384	61,6			
2	631	369	63,1			
3				630	370	63
4				620	380	62

Tableau 2 (Fig. 3 & 4)

ICC	Sans digestion			Avec digestion		
	Cellules marquées	Cell. non marquées	Labelling Index %	Cellules marquées	Cell. non marquées	Labelling Index %
Animal						
5	390	610	39	610	390	61
6	410	590	41	620	380	62

Planning comparatif des deux techniques

Tableau 3

Jours	ARG	ICC
	Injection, Prélèvement, Fixation	Injection, Prélèvement, Fixation
J 1	Recoupe, imprégnation	Recoupe, imprégnation
J 2	Inclusion, coupe	Inclusion, coupe
J 3	Coulage, émulsion, exposition	
J 4	Exposition	ICC, lecture
J17	Révélation, lecture	

- Développement ARG :
 - Produit Ilford
 - Phenisol
 - Bain d'arrêt : Ilford IN-1
 - Fixateur : Thiosulfate à 30 %
- Digestion : Trypsine (type II Sigma) à 0,2 % dans un tampon Tris (0,05 M, pH 7, 6, CaCl₂ à 0,1 %).
- PBS : 0,05 M – pH 7,4 – NaCl 29‰ – Triton x 100 5‰ – BSA 1‰
- M.A. Brd-Urd (Becton Dickinson)
- R.A.M./IgG (Jackson)
- M/PAP (Nordic)
- NRS (Nordic)
- DAB (Sigma D5637) : DAB : 90 mg – PSB : 200 ml – H₂O₂ : 110 vol. 5 gouttes.

DISCUSSION

Les résultats obtenus avec la méthode (immunocytochimique ou autoradiographique) ont montré que seules les cellules de la partie basse des cryptes de l'iléon présentent un noyau marqué.

Il y a une parfaite concordance entre la localisation nucléaire du précipité de DAB et les grains d'argent qui résultent de l'autoradiographie.

La comparaison par la méthode des « labelling index » a permis de voir que l'incorporation de thymidine ou de bromodeoxyuridine est équivalente et que les résultats de l'autoradiographie et de l'immunocytochimie sont comparables (Tableaux 1 & 2).

Pour arriver à ce résultat, il a été testé différents pré-traitements incorporant une hydrolyse, suivie ou non, d'une digestion avant la technique immunocytochimique. En effet, la détection immunocytochimique de la Bromodeoxyuri-

dine incorporée nécessite une dénaturation partielle de l'ADN afin de rendre les molécules incorporées accessibles à l'anticorps (3). Sur les coupes issues d'organes fixés au formol, il s'est avéré que l'hydrolyse par HCl (2 N, 60 mn, 37°C) était insuffisante, et peu reproductible, une hydrolyse par HCl (4 N, 60 mn, 37°C) endommageait les tissus. Pour démasquer les sites antigéniques sur du matériel fixé au formol, une digestion enzymatique est souvent utilisée (4). L'action de la trypsine seule (0,2 %, 60 mn, 37°C) s'est avérée trop drastique. On a essayé cette méthode en la couplant avec une hydrolyse. Ainsi une hydrolyse (HCl 2 N, 60 mn, 37°C) suivie d'une digestion par la trypsine (0,2 %, 15 mn, 37°C) semble être le meilleur compromis entre la dénaturation de l'ADN et la préservation des sites antigéniques puisqu'elle a donné des résultats comparables à ceux obtenus en autoradiographie.

La méthode immunocytochimique permet :

- une visualisation des cellules marquées avec un haut degré de résolution sans le bruit de fond qui est fréquent en autoradiographie,

- d'éviter la manipulation d'éléments radioactifs (toujours contraignante),

- un gain de temps appréciable pour obtenir des résultats (Tableau 3).

RÉFÉRENCES

1. MORSTYN G., HSU S.M., KINSELLA T., GRATZNER H., RUSSO A. & MITCHELL J.B. : Bromodeoxyuridine in tumors and chromosomes detected with monoclonal antibody, *J. Clin. Invest.*, 1983, 72, 1844-1850.

Autoradiographie d'iléon de souris ($\times 500$)

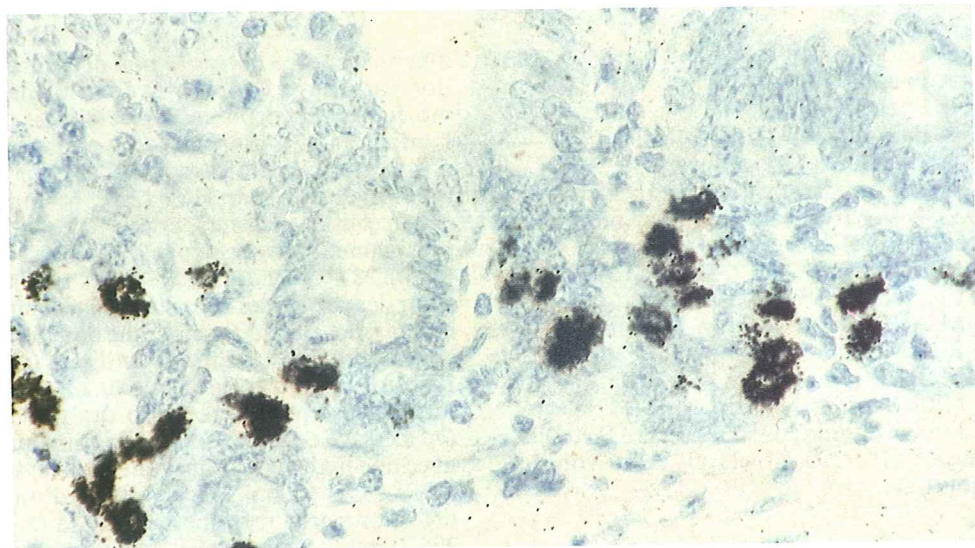


Fig. 1 : ^3H -THY

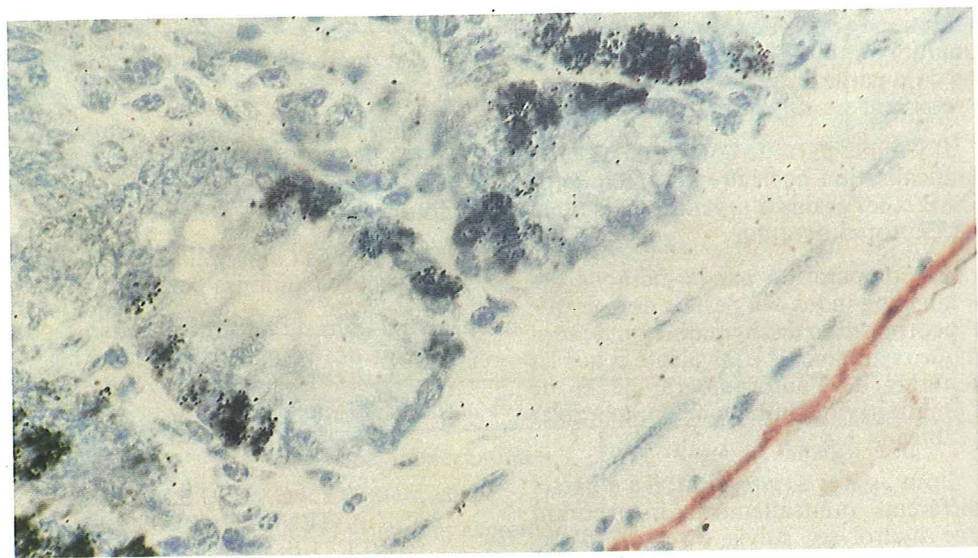


Fig. 2 : ^3H -Brd-Urd

Immunocytochimie d'iléon de souris ($\times 500$)

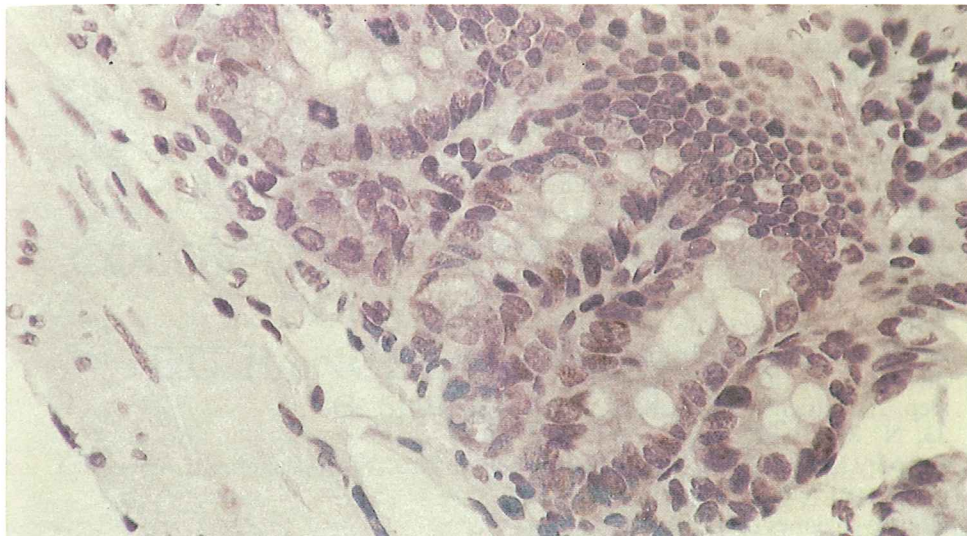


Fig. 3 : M.A. Brd-Urd 1/50 sans digestion

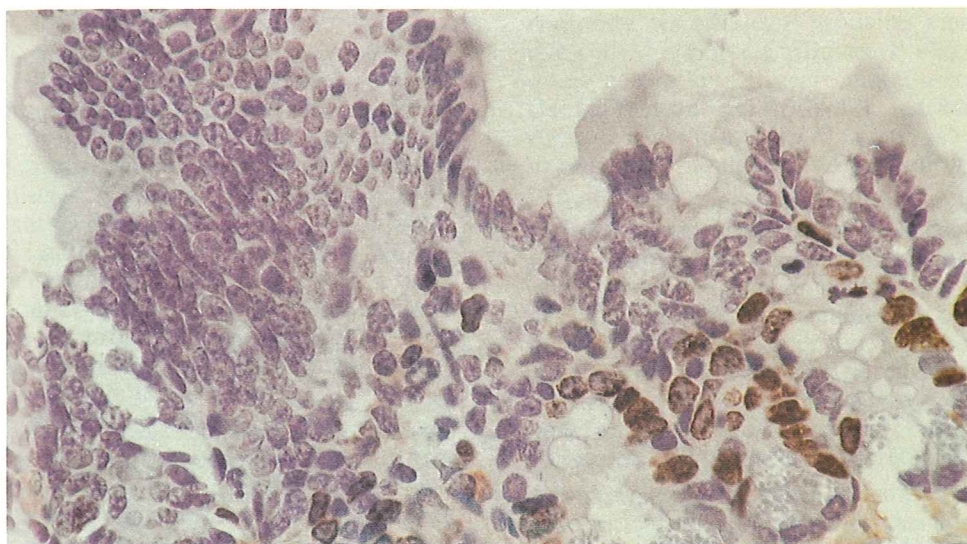


Fig. 4 : M.A. Brd-Urd 1/50 avec digestion

2. GRATZNER H.G., LEIF R.C., INGRAM, D.J. & CASTRO A. : The use of antibody specific for bromodeoxyuridine for the immunofluorescent determination of DNA replication in single cells and chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 1975, **95**, 88-94.
3. MORAN R., DARZYNKIEWICZ Z., STAIANO-COICO L. & MELAMED M.R. : Detection of 5-Bromodeoxyuridine (Brd-Urd) incorporation by monoclonal antibodies. Role of the DNA denaturation step. *J. Histochem. Cytochem.*, 1985, **33**, N° 8, 821-827.
4. MEPHAM B.L., FRATER W. & MITCHELL B.S. : The use of proteolytic enzymes to improve immunoglobulin staining by the PAP technique, *Histochem. J.*, 1979, **11**, 345-347.