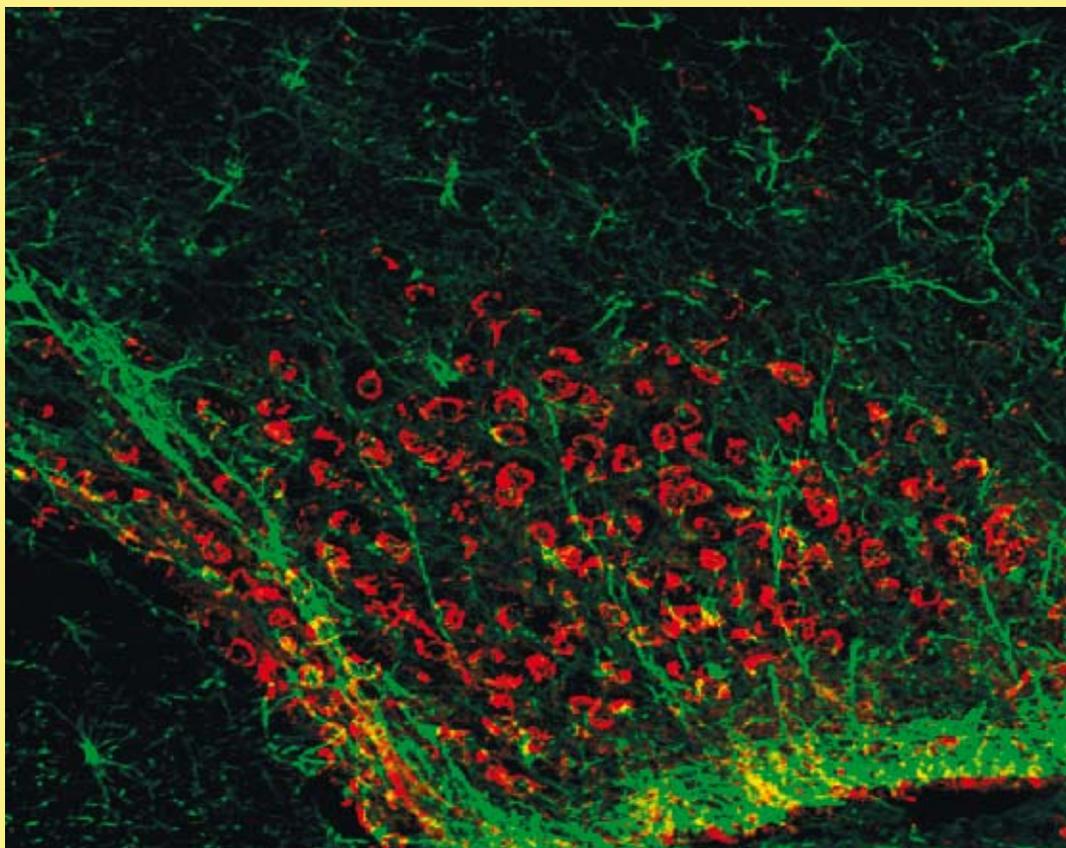


REVUE FRANÇAISE

D' HISTO

TECHNOLOGIE

2011, Vol. 24, n°1



REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

www.afhisto.com

2011, VOL **24**, N° 1

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

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

COMPOSITION DU BUREAU :

Nathalie Accart, Illkirch, *Présidente*

Christelle Sachot-Gérard, Bâle, *Trésorière*

Dominique Côme, La Rochelle, *Secrétaire*

Lydie Guigand, Nantes, *Relation avec les firmes*

Danièle Raison, Paris, *Rédactrice en chef de la Revue*

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

Nombre d'adhérents au 20 mars 2012 : 91

Siège social :

Association Française d'Histotechnologie

Mairie d'Amboise

BP 247

37402 AMBOISE CEDEX

REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

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

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

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

Courrier, manuscrits :

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

Présidente du comité de lecture :

Danièle RAISON, UPMC Jussieu, Paris

Membres du comité de lecture :

Pour chaque manuscrit, deux à trois lecteurs sont choisis pour leur compétence dans le domaine considéré.

Revue Française d'Histotechnologie

Editeur : Association Française d'Histotechnologie

Imprimeur : Imprim'lingo, 67540 OSTWALD

Directrice de publication : Nathalie ACCART

Publicité : Lydie GUIGAND

Rédactrice en chef : Danièle RAISON

Tirage : 300 exemplaires

ISSN 0997-6434

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

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

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

I. Soumission des manuscrits

par voie postale à :

Lydie VENTEO
Label Histologie
8 rue Belin - 51100 REIMS

Par messagerie électronique à :

lydie.venteo@orange.fr

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

II. Présentation générale des manuscrits.

Dactylographie

La première page du manuscrit indique le titre de l’article (éventuellement sous-titre), le nom et prénom de chaque auteur, son affiliation avec ses adresses postale complète et électronique.

Les manuscrits doivent être saisis dans un logiciel de traitement de texte, de préférence Microsoft Word et si possible en police de caractère «Times New Roman» de taille 12.

Les médicaments doivent être mentionnés selon leur dénomination commune ou leur nom chimique. Les références commerciales des réactifs (référence et fournisseur) et matériel (modèle et fabricant) utilisés sont citées clairement, ainsi que les conditions expérimentales des travaux décrits.

Acronymes

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

Les documents iconographiques (Figures et Tableaux)

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

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

L'iconographie et le texte, sous forme numérique, doivent être transmis

- soit en doc attaché par courriel et formuler ainsi :

*1 fichier (**Word** de préférence, caractères « **Times New Roman, taille 12** »), avec uniquement le texte et les légendes photos **et**

*1 fichier au format **TIFF** avec une résolution minimum de **300 dpi** pour l'iconographie seule, clairement identifiée et nommée dans le texte (*Figure 1a, Figure 2...*)

- soit sur CD portant le nom de l'auteur

Le support numérique sera restitué à l'auteur après édition de la revue.

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

Pour les articles:

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

Pour les livres:

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

HOMMAGE A NOTRE COLLEGUE SYLVIE TRASSARD



Dès la création de l'Association Française d'Histotechnologie (l'AFH), notre collègue Sylvie Trassard, technicienne en Biologie Cellulaire, a été membre du bureau pendant 6 ans, puis s'est investie dans son rôle de Rédactrice en chef de la Revue AFH, qu'elle a largement développée, diversifiée et fait vivre. Elle a participé aux activités de valorisation du métier de « morphologiste » en défendant son identité : intégrer au sein de structures complexes les données des technologies nouvelles développées en biochimie, biologie moléculaire ou biophysique. Toujours présente, elle devait participer à notre congrès de Strasbourg en mai dernier...

Le bureau et amis de l'AFH

Madame Brigitte Arbeille, son chef de Service depuis 30 ans, a tenu à lui rendre hommage.

A Sylvie,

Quelques mots de la part de tous ceux qui partagent ta vie depuis trente ans... malgré une détresse et une peine infinie, ils veulent témoigner de cette vie d'une équipe professionnelle à laquelle tu as consacré tant de cœur et de joie, tant d'enthousiasme et d'émerveillement, tant de volonté et de foi...

Notre communauté hospitalo-universitaire ne peut se battre pour le bien des patients qu'avec l'aide de personnes comme toi, sachant chaque jour se dépasser, faire avancer nos méthodologies de laboratoire dans une démarche volontaire autonome et responsable. Tu avais en toi une détermination, presque farouche parfois, contrastant avec cette fragilité que l'on devinait souvent derrière ton si merveilleux sourire et des ressources sans limites face aux attentes des cliniciens, mais aussi face aux projets des chercheurs de notre Université et bien souvent au-delà de Tours, avec des équipes de Roumanie, d'Estonie, du Togo et de la Côte d'Ivoire... avec lesquels tu as tant travaillé dans une relation de fidélité et de complicité dont tu avais le secret...

Toute cette si riche activité ne pouvait se réaliser pour toi qu'à travers des relations devenant très vite personnelles, faites d'amitié et d'estime réciproques, enrichissant de façon extraordinaire ton travail scientifique irréprochable.

Ta personnalité réservée, calme et douce, mais tout autant gaie, joyeuse et si communicative porte la marque d'une éducation exemplaire et fait de toi l'amie de tous et le pilier de notre laboratoire qui te doit tant d'initiatives de petites et grandes fêtes et de tous ces petits bonheurs qui font d'une équipe une vraie famille de cœur...

Tu ne nous laisses aujourd'hui pas d'autres choix que celui de continuer la route, mais en te sachant à chaque instant au bord du chemin...

Tes amis te font le serment qu'ils seront à la hauteur de l'exigence et de la conscience professionnelle qui étaient les tiennes, et qu'ils te feront honneur.

Brigitte ARBEILLE
et l'équipe de Microscopie Electronique du CHU de TOURS

HISTOPATHOLOGIE TESTICULAIRE CHEZ LA SOURIS

Marius TELETIN^{1,3}, Christine DENNEFELD¹, Muriel KLOPFENSTEIN¹, Betty FERET¹,
Norbert B. GHYSELINCK¹ et *Manuel MARK^{1,2,3}
*manuel.mark@igbmc.fr

*1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964,
CNRS UMR1704, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France.*

2 Institut Clinique de la Souris (ICS), Illkirch.

3 Faculté de Médecine et Centre Hospitalier Universitaire, Strasbourg, 67000 France

RESUME

L'infertilité masculine, dont la prise en charge médicale représente un coût financier conséquent, est en augmentation constante dans les pays industrialisés. Les souris mutées sont d'excellents modèles pour appréhender ces problèmes d'infertilité, car les voies de signalisation contrôlant la spermatogenèse semblent fortement conservées chez les mammifères. L'étude histopathologique du testicule murin représente le procédé le plus fiable pour explorer la spermatogenèse, en première approche.

INTRODUCTION

La spermatogenèse, mise en place à la puberté, est un phénomène de différenciation cellulaire cyclique. Ce cycle spermatogénétique aboutit à la production de spermatozoïdes à partir de spermatogonies souches. Sa durée, constante pour une espèce donnée, est une caractéristique intrinsèque des cellules germinales et semble in-

dépendante de toute action hormonale (1). La spermatogenèse comporte 4 phases : (i) une étape de prolifération au cours de laquelle les spermatogonies se multiplient tout en se différenciant ; (ii) la méiose, correspondant aux deux divisions des spermatocytes I, qui donnent naissance, successivement, aux spermatocytes II, puis aux spermatides ; (iii) la spermiogenèse, une « métamorphose » des spermatides ronds en spermatides matures et (iv) la spermiation qui correspond à la libération des spermatides matures dans la lumière des tubes séminifères (TS) du testicule où elles deviennent des spermatozoïdes.

Des motifs évidents, relevant de l'éthique médicale, rendent difficile les études moléculaires portant sur la fertilité humaine. Par ailleurs il n'est pas possible, techniquement parlant, d'analyser la gamétogenèse, *in vitro*. La mise en place de la spermatogenèse à la puberté ainsi que

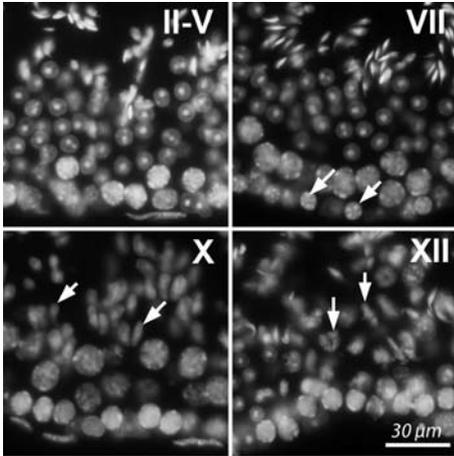
son déroulement chez l'adulte sont similaires chez la souris et chez l'Homme. La souris est aussi le seul modèle animal qui soit accessible à la mutagenèse ciblée (ou mutagenèse dirigée). Cette technique basée sur la recombinaison homologue permet de générer différents types de changements visant spécifiquement un site choisi dans un gène dont on connaît la séquence. L'approche utilisée a souvent pour objectif d'empêcher le gène de fonctionner : c'est ce que l'on appelle l'inactivation (ou invalidation) d'un gène, ou communément le KO (Knock-Out) d'un gène. Elle permet, d'après les conséquences observées sur le phénotype de la souris, de proposer un (des) rôle(s) pour le gène en question. Dans ce contexte, les modèles murins représentent d'excellents outils pour élucider les fonctions des gènes dits de fertilité, c'est-à-dire ceux dont la perte de fonction a pour seule manifestation évidente une diminution de la fertilité.

L'épithélium séminifère est l'objet de modifications cycliques

La spermatogenèse se déroule dans l'épithélium des TS, formé de cellules de soutien (les cellules de Sertoli) et des cellules de la lignée germinale. Chez le mâle adulte, l'épithélium séminifère (ES) présente une architecture complexe et changeante au cours du temps. L'ES comporte en effet une série de « stades épithéliaux », chacun défini par une association caractéristique de cellules germinales, répétée à intervalles réguliers le long du TS et consistant en 4 à 5 générations de cellules germinales disposées en strates. Les strates « jeunes », constituées de cellules pré-

méiotiques, se disposent à la périphérie des TS, tandis que les strates « anciennes », constituées de spermatozoïdes, se localisent à proximité de la lumière des TS. Chez la souris, il est possible de reconnaître 12 associations cellulaires distinctes (stades épithéliaux I à XII) (2). Les stades de l'ES reflètent le synchronisme entre les mitoses spermatogoniales, la méiose et la spermiogenèse. Le cycle de l'ES (qui est différent du cycle spermatogénétique) est la série complète des douze stades épithéliaux, se succédant au cours du temps, selon une chronologie immuable, dans un segment donné, le long du TS.

Une bonne connaissance du cycle de l'ES est donc indispensable pour distinguer ses aspects normaux de ses aspects pathologiques. Son apprentissage nécessite quelques jours de stages auprès d'un expert, puis une pratique régulière (2, 3). L'identification des cellules germinales composant les différents stades de l'ES repose sur plusieurs critères dont : (i) la répartition de l'hétérochromatine dans les noyaux des cellules pré-méiotiques; (ii) le degré de condensation des chromosomes présents dans les spermatozoïdes méiotiques; (iii) l'état d'avancement d'élongation du noyau et du développement de l'acroosome. Les 3 premiers critères peuvent être évalués sur des coupes histologiques colorées par l'hématoxyline et l'éosine et, dans une moindre mesure, après coloration par le 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Ces colorations ne permettent cependant pas d'identifier individuellement tous les stades de l'ES (Figures 1). L'identification de chacune des douze associations cellulaires nécessite la reconnaissance de l'étape



Figures 1 : Quelques exemples de stades de l'épithélium séminifère visibles après coloration par le DAPI sur des coupes déparaffinées d'un testicule fixé par le formol. Les stades II à V ne peuvent être distingués les uns des autres. Ainsi la présence de spermatocytes pré-méiotiques, de spermatides en voie d'élongation et de plaques métaphasiques sont respectivement caractéristiques des stades VII, X et XII, (flèches blanches). Les chiffres romains correspondent aux stades du cycle de l'épithélium séminifère.

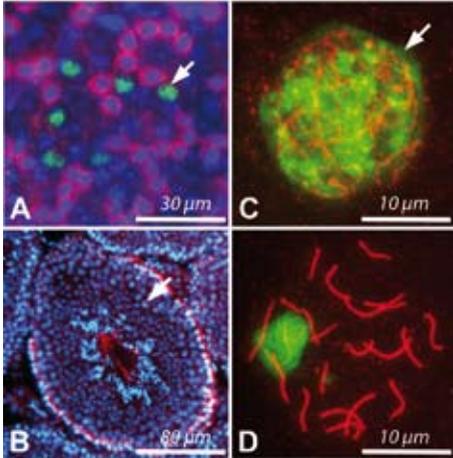
de maturation de l'acrosome dans les spermatides, grâce à une coloration par l'acide périodique de Schiff (APS)-hématoxyline, pour les tissus inclus en paraffine, ou à une coloration par le bleu de toluidine, pour les tissus inclus dans une résine epoxy (2). L'analyse du cycle de l'ES permet d'identifier précisément les populations de cellules germinales affectées par une mutation délétère, ou qui sont les cibles d'un agent reprotoxique. Cette analyse représente le commencement obligé pour comprendre les mécanismes d'action du gène ou de l'agent toxique étudié (4, 5).

Les spermatogonies forment une population cellulaire très hétérogène

Les spermatogonies ont en commun, de se diviser par mitoses, mais elles constituent une population cellulaire très hétérogène. Leur identification par le biais de l'histologie classique est fastidieuse, voire hasardeuse (6).

En schématisant un peu, les spermatogonies souches sont des cellules isolées (spermatogonies A isolées, A single ou As) et peu nombreuses (0,03% des cellules germinales d'un testicule adulte). Leur auto-renouvellement est assuré par le GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) d'origine sertolienne, dont elles expriment les récepteurs RET (Rearranged During Transfection) et GFRA1 (GDNF Family Receptor Alpha-1). Elles sont capables de restaurer la spermatogenèse après transplantation dans un testicule dont la lignée germinale a été préalablement détruite (par la chaleur ou par traitement au busulfan) et donnent lieu, au terme d'une division asymétrique, à un *alter ego* indifférencié et à une spermatogonie A appariée (A paired ou Ap) engagée dans la spermatogenèse. Les descendants des spermatogonies Ap, ou spermatogonies A alignées (A aligned ou Aal), forment des chaînettes de 4 à 32 unités, reliées par des ponts cytoplasmiques. Les spermatogonies Aal conservent, dans certaines conditions, des propriétés de cellules souches. Elles expriment le facteur de transcription ZBTB16 (Zinc finger and BTB domain containing 16, encore appelé PLZF), un répresseur direct du récepteur tyrosine kinase KIT. Les spermatogonies Aal appartiennent (avec les As et les Ap) à la catégorie des spermatogonies dites indifférenciées, dont les divisions ne sont pas synchrones avec le cycle de l'ES. Les spermatogonies différen-

ciées (A1, A2, A3, A4, Intermédiaires et B) forment, comme leurs précurseurs, des chaînettes résultant d'une cytokinèse incomplète. Elles expriment KIT et leur différenciation est régulée positivement par le ligand de KIT, d'origine sertolienne. Dépourvues des propriétés des cellules souches, elles prolifèrent et se différencient en phase avec les stades du cycle de l'ES et sont irréversiblement engagées vers la production de spermatozytes pré-méiotiques (appelés spermatozytes pré-leptotène) (1).



Figures 2 : histochimie des cellules germinales.

A : Co-détection, sur un tube séminifère fixé par un mélange de méthanol et de paraformaldéhyde et monté en entier, de KIT (en rouge) et de RARG (Retinoic Acid Receptor Gamma, en vert).

B : Détection sur une coupe histologique de testicule adulte fixé par le paraformaldéhyde de STRA8 dans les spermatozytes en préleptotène.

C et D : Co-détection sur des étalements de noyaux de spermatozytes fixés par le paraformaldéhyde de gamma H2AX ((histone H2AX phosphorylé, en vert) et de SYCP3 (en rouge) aux stades zygotène (C) et pachytène (D) de la méiose). Noyau d'un spermatozyte (flèche blanche). Les noyaux des cellules en A et B ont été contre-colorés par le DAPI.

L'immunohistochimie est la technique de choix pour identifier les liens de filiation entre les différents types de spermatozytes. Malheureusement, le nombre d'anticorps commercialisés à cette fin est restreint. Les anticorps dirigés contre : (i) GFRA1, exprimé par les spermatozytes As et Ap, (ii) ZBTB16, présent dans toutes les spermatozytes indifférenciées (As, Ap et Aal) et (iii) KIT, qui ne reconnaît que les spermatozytes différenciées figurent parmi les plus utiles. Entre nos mains, ces 3 anticorps ne produisent un signal que sur des tubes séminifères montés en entier (Figures 2 ; Tableau 1). Leur inefficacité sur des coupes histologiques de testicule est imputable au volume plus faible du cytoplasme disponible pour fixer des anticorps. L'expression de la protéine STRA8 (Stimulated by Retinoic Acid 8) peut être détectée, dans les spermatozytes A différenciées ainsi que dans des spermatozytes en préleptotène, sur des sections histologiques, grâce à un anticorps du commerce (Figures 2, Tableau 1). A défaut d'anticorps, on peut aussi identifier les populations de spermatozytes par hybridation *in situ*. Cette technique, dont l'objectif est ici de détecter les transcrits d'un gène exprimé dans une population donnée de spermatozytes, utilise une sonde complémentaire d'une séquence d'acides nucléiques présente dans le transcrit recherché. La fabrication de telles sondes est plus aisée et plus rapide, ainsi que moins aléatoire et moins coûteuse que celle d'anticorps spécifiques. L'hybridation *in situ* est cependant moins performante que l'immunohistochimie car : (i) elle endommage les tissus davantage que l'immunohistochimie et (ii) ne per-

met pas de réaliser des doubles-marquages satisfaisants (5).

Des anomalies méiotiques sont responsables d'arrêts de maturation des spermatocytes

Une apoptose massive des spermatocytes de premier ordre (ou spermatocytes I) en prophase, confirmée par la mise en œu-

vre de la technique de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), traduit souvent des anomalies méiotiques. La méthode la plus fiable pour identifier les stades de la prophase de première division méiotique (c'est-à-dire les stades leptotène, zygotène pachytène et diplotène) et pour en détecter les défauts, consiste à étaler des cellules sur une lame

	Anticorps dirigé contre:	Références du fournisseur	*Coupes paraffine	Coupes cryostat	Tubes séminifères entiers	Étalements de cellules
Spermatogonies indifférenciées	GFRA1	R&D syst af560	non	non	oui	nt
	PLZF	Calbiochem OP128	non	non	oui	nt
Spermatogonies différenciées	KIT	Millipore CBL1360	non	non	oui	nt
	STRA8	Abcam ab49602	oui	oui	oui	oui
Spermatocytes pré-méiotiques	STRA8	Abcam ab49602	oui	oui	oui	oui
Spermatocytes méiotiques	SCP1	Santa-Cruz SC-20837	non	non	nt	oui
	RAD51	Calbiochem ABE257	non	non	nt	oui
	SCP3	Abcam ab15093	oui	oui	nt	oui
	MLH1	Pharmigen Clone G168 728	nt	nt	nt	oui
	gammaH2AX	Upstate 05-636	oui	nt	nt	oui
Cellules de Sertoli	GATA1	Santa Cruz SC-265	oui	oui	nt	nt
	AR	Santa Cruz SC-816	oui	oui	nt	nt

TABLEAU I : Anticorps testés

*Après démasquage des antigènes par la chaleur, Nt : non testé

de verre, puis à réaliser une détection immunohistochimique à l'aide de deux ou plusieurs anticorps dirigés contre : (i) des protéines du complexe synaptonémal (CS) ; (ii) des protéines indiquant l'existence de cassures double brin de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (qui se produisent préalablement à toute recombinaison méiotique) et/ou (iii) des protéines contribuant aux nodules de recombinaison (Tableau 1). Les éléments latéraux du futur CS, dont les constituants majoritaires sont les protéines SYCP2 et SYCP3 (SYnaptonémal Complex Proteins 2 and 3), se forment le long des chromosomes au stade leptotène. Au stade zygotène, l'élément central du CS solidarise progressivement les 2 éléments latéraux des chromosomes homologues, grâce notamment à la protéine SYCP1. Par ailleurs, l'histone H2AX est phosphorylé et recrute des recombinases au niveau des points de cassure de l'ADN. En pachytène, l'appariement est complet : le CS connecte les chromosomes homologues sur toute leur longueur. (Figures 2; Tableau 1). La composition moléculaire des nodules de recombinaison varie au cours de la prophase. Les nodules précoces (ceux du stade zygotène) contiennent des recombinases RAD51 (RADiation 51), DMC1 (Dosage suppressor of MCK1 homolog) qui catalysent l'invasion de l'ADN double brin homologue intact, alors que nodules maintenus tardivement (en pachytène) contiennent les protéines qui participent à la correction des mésappariements, dont MLH1 (MutL Homolog 1) (7, Tableau 1).

Les spermatides : de la spermiogénèse à la spermiation

La transformation des spermatides rondes en spermatides matures, ou spermiogénèse, est assimilable à une métamorphose cellulaire. Au cours de cette période, les spermatides rondes, des petites cellules sphériques dépourvues de caractères morphologiques remarquables, deviennent des cellules très asymétriques possédant tous les attributs spécifiques des gamètes fécondants : noyaux allongés à chromatine fortement condensée, acrosome, mitochondries disposées en spirale, axonème doublé de structures protéiques de renforcement. Considérés individuellement, chacun des éléments constitutifs du spermatozoïde est nécessaire à la fécondation. Les remaniements morphologiques très complexes de la spermiogénèse sont difficilement visibles en microscopie optique, et font de cette période un objet de choix pour les analyses en microscopie électronique à transmission d'autant plus utiles, que toute anomalie structurale détectée au cours de la spermiogénèse, compromet nécessairement le pouvoir fécondant des spermatozoïdes (8).

La spermiation désigne la libération des spermatides matures dans la lumière des tubes séminifères, ces dernières devenant alors des spermatozoïdes. Les défauts de spermiation peuvent être responsables de stérilité. Ils sont classiquement attribués soit à un dysfonctionnement intrinsèque des cellules de Sertoli, soit à des mécanismes physiologiques qui tendent à empêcher ces cellules de « libérer » des spermatozoïdes contrefaits. La spermiation se déroule invariablement à la fin du stade VII de l'ES et ses défauts se manifestent par la persistance

de spermatozoïdes matures dans l'ES aux stades IX et X. Un défaut sévère entraîne, par ailleurs, une diminution de la densité des spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme où ils sont habituellement stockés (9).

Les cellules somatiques du testicule

Les cellules de Sertoli occupent environ 20% du volume de l'épithélium séminifère. Cette grande cellule (70 microns de hauteur), de forme pyramidale, s'allonge sur toute la hauteur de l'ES. Elle a été comparée à un arbre dont le tronc, figurant le corps cellulaire, repose sur la membrane basale ; ses branches, figurant les prolongements cellulaires, entourent les 50 cellules germinales dont elle assure la nutrition. Une cellule de Sertoli est, en moyenne, connectée à 5 de ses voisines par des jonctions serrées continues. Celles-ci forment l'essentiel de la barrière hémato-testiculaire, qui a pour fonction de protéger les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques contre des agents nocifs (médicaments, toxiques environnementaux, anticorps) présents dans le sang ou la lymphe en empêchant leur passage vers l'intérieur des tubes séminifères.

La cellule de Sertoli est le pivot autour duquel s'organise l'activité fonctionnelle du testicule : interface incontournable entre une majorité de cellules germinales et les cellules somatiques de l'organisme, elle intègre aussi les messages hormonaux nécessaires à la spermatogenèse dont la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la testostérone. Elle répond à ces signaux hormonaux par une activité de sécrétion trop diversifiée pour pouvoir être explorée de manière systématique par des méthodes histologiques. Par contre, l'intégrité de la barrière hémato-

testiculaire peut être évaluée par perfusion d'un traceur opaque aux électrons, le nitrate de lanthane (voir par exemple 9). Par ailleurs, une cellule de Sertoli normale exprime certaines protéines dont le récepteur des androgènes, AR (Androgen Receptor), et le facteur de transcription GATA1 (GATA binding protein1) de manière cyclique, c'est-à-dire uniquement à des stades précis du cycle de l'ES. Il est possible d'analyser la cyclicité de ses synthèses grâce à l'immunohistochimie utilisant des anticorps du commerce (9, Tableau 1).

La morphologie des cellules de Leydig est peu informative. Leur fonction première est la sécrétion de testostérone. A défaut d'une méthode de dosage fiable et peu onéreuse de l'hormone, cette fonction peut être explorée par la pesée des organes androgéno-dépendants, que sont la prostate et la vésicule séminale.

CONCLUSION

Chez le rongeur de laboratoire, l'efficacité de la spermatogenèse ne peut être correctement évaluée, ni sur la base des données d'élevage, c'est-à-dire sur la fréquence et la taille des portées, ni sur le comptage des spermatozoïdes épididymaires. En effet, il est établi que le nombre et la taille des portées ne sont perturbés que si la quantité de spermatozoïdes produite par le testicule est diminuée d'au moins 90% (2). Dans ce contexte, l'analyse de la spermatogenèse fait appel, en première approche, à un ensemble de techniques morphologiques. L'observation des coupes histologiques issues de testicules fixés dans du liquide de Bouin figure au premier rang de ces techniques.

BIBLIOGRAPHIE

1. DE ROOIJ D.G., RUSSELL L.D.: All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 2000, 21,776-798
2. RUSSELL L.D., ETTLIN A.P.S., CLEGG R.A.: Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 1990
3. AHMED E.A., DE ROOIJ D.G.: Staging of mouse seminiferous tubule cross-sections. *Methods Mol. Biol.*, 2009, 558, 263-277.
4. GHYSELINCK N.B., VERNET N., DENNEFELD C., GIESE N., NAU H., CHAMBON P., VIVILLE S., MARK M.: Retinoids and spermatogenesis: lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein. *Dev. Dyn.*, 2006, 235, 1608-1622.
5. GELY-PERNOT A., RAVERDEAU M., CÉLÉBI C., DENNEFELD C., FERET B., KLOPFENSTEIN M., YOSHIDA S., GHYSELINCK N.B., MARK M.: Spermatogonia Differentiation Requires Retinoic Acid Receptor γ . *Endocrinology*, 2011, **153**, 438-449
6. CHIARINI-GARCIA H., RUSSELL L.D.: High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol. Reprod.*, 2001, 65, 1170-1178.
7. MARK M., JACOBS H., OULAD-ABDELGHANI M., DENNEFELD C., FÉRET B., VERNET N., CODREANU C.A., CHAMBON P., GHYSELINCK N.B. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J. Cell Sci.*, 2008, 121, 3233-3242
8. MARK M., YOSHIDA-KOMIYA H., GEHIN M., LIAO L., TSAI M.J., O'MALLEY B.W., CHAMBON P, XU J.: Partially redundant functions of SRC-1 and TIF2 in *postnatal* survival and male reproduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, 101, 4453-4458
9. VERNET N., DENNEFELD C., GUILLOU F., CHAMBON P., GHYSELINCK N.B., MARK M.: Prepubertal testis development relies on retinoic acid but not retinoid receptors in Sertoli cells. *EMBO J.*, 2006, 25, 5816-5825.

VISUALISATION DES COUPES HISTOLOGIQUES DES FOLLICULES OVARIENS DE *BARBUS CALLENSIS* VARIATION DE FIXATEURS ET DE COLORANTS

*Hafsa DJOUDAD-KADJI(1,2), Sihem BENSLIMANE(1), Christine CHEVALIER(2), Belaid KADJI(1), Jean-Marie EXBRAYAT(2) et Mokrane IGUER-OUADA(1)

*kadji_hafsa@yahoo.fr

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

RESUME

La fixation et la coloration des tissus restent les deux principales étapes qui conditionnent la qualité de l'imagerie histologique. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à l'optimisation de la visualisation histologique d'ovaire de *Barbus callensis*.

Le formol et le liquide de Bouin sont utilisés comme fixateurs pour ces deux colorations, l'hématoxyline-éosine (l'H&E) et l'azan modifié. Les résultats obtenus montrent que l'association optimale, pour donner le détail des structures histologique des ovaires, est le liquide de Bouin pour la fixation et l'azan modifié pour la coloration. L'association formol/ H&E quant à elle, met en évidence l'architecture générale des tissus, sans coloration spécifique

pour chaque constituant, et s'appliquera plutôt aux études biométriques de la dynamique ovocytaire.

INTRODUCTION

L'histologie combine à la fois l'observation et l'expérimentation. Elle a comme but, l'obtention de coupes fines colorées d'un tissu biologique imputrescible enrobé de paraffine, qui reste solide à température ambiante (1,2,3), observables au microscope photonique (1). Dans toute opération histologique, la fixation est la première étape indispensable à la bonne conservation des constituants tissulaires et/ou cellulaires, qui doivent rester dans un état aussi proche que possible de celui de l'organisme vivant (4). Vient ensuite la coloration pour différencier les diverses structures.

Actuellement, cette science dispose de différentes méthodes de fixation et de coloration, qui visent à fournir de meilleures images et augmenter l'efficacité de la visualisation microscopique. Selon Cannet (2), le procédé de fixation des organes/tissus comprend de bons et de mauvais fixateurs topographiques. C'est ainsi que dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à optimiser la visualisation de l'histologie ovarienne de *Barbus callensis*. Nous avons agi aussi bien sur le fixateur que sur la coloration. Nous avons étudié deux fixateurs de routine : le formol à 10% et le liquide de Bouin qui est un mélange acide picrique, acide acétique et de formol. Ces deux fixateurs sont différents surtout en termes de vitesse de pénétration et de fixation. Deux méthodes de coloration : hématoxyline-éosine (H & E) et azan modifié, ont été utilisées pour les deux fixateurs.

MATERIEL ET METHODES

Echantillons

Les échantillons de poisson *Barbus callensis* observés, ont été pêchés dans l'oued Soummam, qui se trouve dans la région de Béjaia dans le Nord-Est de l'Algérie, cet oued représente l'un des principaux cours d'eau algériens et il parcourt toute la vallée de la Soummam sur 90 km. La période d'échantillonnage s'est étalée de mars 2010 à mars 2011.

Technique histologique

Fixation

Elle a pour but d'immobiliser les structures des échantillons en respectant dans la mesure du possible la morphologie des structures.

Après dissection, 60 ovaires à différents stades de développement macroscopique, ont été sélectionnés et fixés dans deux solutions différentes :

30 ovaires ont été fixés dans le formol à 10% pendant 24 heures. Ce fixateur est composé de :

10 ml de formol de commerce à 35% tamponné

90 ml de l'eau distillée.

30 ovaires ont été fixés dans le liquide de Bouin pendant 6 heures, cette solution est composée de :

75 ml d'acide picrique

25 ml de formol commercial à 36-40 %

5 ml d'acide acétique

(ajouté extemporanément).

Après fixation les gonades ont subi une déshydratation dans des bains d'alcool de concentration croissante (70-95-100 %), une clarification dans le xylène, une imprégnation et une inclusion dans la paraffine (point de fusion: 55-57 °C). Les blocs ont été débités au moyen d'un microtome de type Leica RM2025, l'épaisseur des coupes était de 3 µm. Les coupes réalisées ont été déposées sur des lames puis collées avec de l'eau albumineuse sur une platine chauffante. L'hydratation a été effectuée dans trois bains d'alcool de degrés décroissants (100%, 90% et 70%) suivis d'un lavage à l'eau distillée.

Coloration des coupes

Deux techniques de coloration topographiques polychromes ont été utilisées :

• Coloration à l'azan modifié

Coloration par le rouge nucléaire pen-

15 minutes

Rinçage à l'eau distillée

Coloration par l'orange-G phosphomolybdique pendant 5 minutes

Les coupes sont séchées entre deux papiers filtre et colorées par le bleu d'aniline pendant 7 minutes.

• **Coloration à l'hématoxyline/éosine**

Coloration par l'hématoxyline pendant 5 minutes

Rinçage à l'eau courante

Coloration en Eosine à 1% pendant 7 minutes

Rinçage à l'eau courante.

Déshydrations et montage

Juste après coloration les lames sont trempées dans trois bains d'alcool absolu puis dans deux bains de xylène. Le montage a été réalisé entre lame et lamelle avec de l'Eukit.

RESULTATS

Observation macroscopique des pièces fixées

Le suivi de la cinétique de fixation, a permis de constater que pour les ovaires fixés au formol, l'aspect reste moelleux pendant neuf heures, le raffermissement de la pièce n'est atteint qu'après 12 heures, alors que ceux fixés dans le liquide de Bouin, ont commencé à se durcir dans les deux premières heures avec une fixation totale après 6 heures.

Observation macroscopique des lames

Fixation dans le Bouin

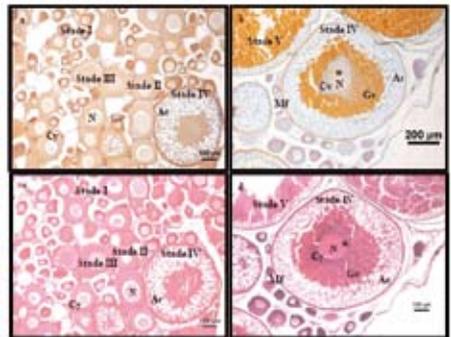
L'analyse macroscopique des lames histologiques des follicules ovariens de *Barbus callensis*, a révélé une diversité ap-

parente dans les teintures données à l'imagerie en relation avec les deux fixateurs et les deux colorations.

En passant de la coloration par l'azan modifié (Figures 1a et b) à celle de l'H & E (Figures 1c et d), les coupes fixées dans le liquide de Bouin ont montré une nette différence dans la coloration du noyau, de la membrane folliculaire et des différentes inclusions cytoplasmiques des ovocytes.

Les différents stades de développement ovocytaire (Figures 1a et c), nous indiquent une prédominance jaune orangé des coupes obtenues par l'azan modifié (Figure 1a), et une prédominance rosâtre pour celles obtenues par l'H & E (Figure 1c).

Pour chacune de ces colorations, deux tons sont observés, l'un foncé et l'autre plus clair. La couleur foncée est retrouvée



Figures 1 : Follicules ovariens de *Barbus callensis* fixés dans le liquide de Bouin. (a et c) ovocytes à différents stades de développement. (b et d) ovocyte aux stades IV et V. N : noyau, n : nucléole, Cy : cytoplasme, Gv : gouttelette vitelline, Ac : alvéole corticale Mf : membrane folliculaire. (a et b) colorés à l'azan modifié. (c et d) colorés à l'H & E.

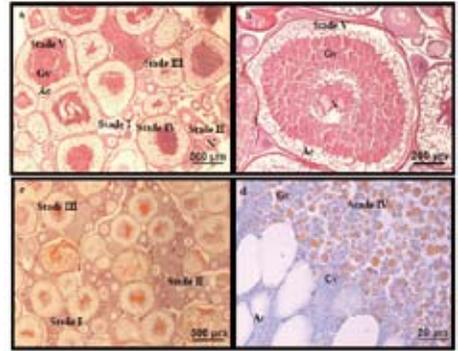
dans le premier stade de développement ce qui renseigne sur un cytoplasme fortement basophile, la couleur plus claire est indicatrice d'un cytoplasme peu basophile, ce qui est reconnue comme caractéristique du deuxième stade de développement.

Dans la coloration à l'azan modifié, le passage des ovocytes au troisième stade, est marqué par une apparition d'alvéoles corticales colorées en bleu (Figure 1a), ce qui les distingue des autres inclusions, ceci n'étant pas observé dans la coloration à l'H&E où une seule teinte apparaît (Figure 1c).

Dans le stade IV (Figures 1b et d), la différenciation spécifique dans la teinture, des inclusions cytoplasmiques et du noyau, est mise en évidence par les deux types de colorations. Néanmoins, la visualisation donnée par l'azan modifié (Figure 1b) se distingue de celle à l'H&E (Figure 1d) par l'apparition de plusieurs couleurs caractérisant les diverses structures de l'ovocyte, alors que l'H&E révèle une couleur uniforme.

Fixation dans le formol

Concernant la visualisation des coupes fixées dans le formol et colorées à l'H&E (Figures 2a et b), nous constatons une prédominance de la coloration rose avec différents contrastes, variant en fonction du stade de développement de chaque ovocyte. Pour le premier stade l'aspect de la teinte reste toujours sombre, ce qui caractérise la basophilie du cytoplasme, alors qu'il devient plus clair avec la diminution de cette basophilie au deuxième stade (Figure 2a).



Figures 2 : Follicules ovariens de *Barbus callensis* fixés dans le formol. (a et c) ovocytes à différents stades de développement. (b et d) ovocyte au stade IV et V. N : noyau, Cy : cytoplasme, Gv : gouttelette vitelline, Ac : alvéole corticale. (a et b) colorés à l'azan modifié. (c et d) colorés à l'H & E.

Cette constatation est également retrouvée avec la coloration à l'azan modifié pour les stades I et II (Figure 2c). Pour les stades plus avancés, la coloration à l'H&E (Figures 2a et b) a montré une seule couleur mais avec diminution du contraste en allant vers la périphérie de l'ovocyte, alors que la coloration à l'azan (Figures 2c, d) permet de distinguer les différentes structures par des couleurs différentes avec cependant moins de netteté qu'avec la fixation par le Bouin (Figures 1a et b).

L'observation à une grande échelle (x 100) d'ovocytes matures colorés par l'azan modifié, a mis en évidence la forme sphérique et la teinture orangée des gouttelettes vitellines (Figure 3a). Pour l'imagerie donnée par l'H&E, on retrouve aussi une seule couleur rosâtre pour les gouttelettes vitellines avec cette fois-ci un contour moins net que pour la coloration à l'azan modifié (Figure 3b). De même, cette dernière co-

loration nous permet de distinguer sans difficulté, l'existence de plusieurs parties de la membrane folliculaire en partant des cellules thécales jusqu'à la zona radiata (Figure 3c), alors que pour l'H&E cette netteté n'est pas retrouvée (Figure 3d).

DISCUSSION

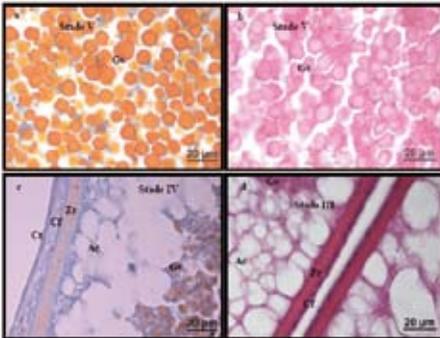
L'aspect mou des pièces fixées dans le formol, durant les neuf premières heures, pourrait s'expliquer par le fait que le formol contient des agents non coagulants rendant la fixation des pièces progressive et nécessitant des durées de fixation plus longues (2), le durcissement total n'est atteint qu'au bout de 12 heures. Il est admis que le formol induit de nouvelles combinaisons chimiques aboutissant à une solidification de la trame protéique de la cellule évitant ainsi des modifications structurales (1). Selon Fox *et al.* (5), sur une période d'immersion d'une pièce de 24 heures, le formol peut pénétrer 20 millimètres ou

plus dans l'organe/tissus, dans le présent travail l'épaisseur moyenne des pièces était de 10 mm, ce qui représente la moitié de l'épaisseur, ce qui nous a permis de réduire le temps de fixation à 12 heures.

Les ovaires fixés dans le formol n'ont pas présenté de problèmes d'effritement pendant la microtomie, même dans le cas d'une surfixation (plus de neuf mois). Ce paramètre est retenu comme critère de qualité de la fixation (6). Il est classiquement admis (4) qu'un fixateur est considéré comme tolérant, lorsque le durcissement d'un tissu est raisonnable et permet l'obtention de coupes histologiques. On considère alors que le formol possède une capacité de conservation longue mais avec une possibilité de modification des qualités tinctoriales. A ce sujet, le formol conduit souvent à la diminution de l'intensité de certaines colorations.

La qualité de fixation avec le formol est souvent jugée médiocre pour certains tissus, comme le muscle, l'os et le testicule dont l'architecture apparaît souvent altérée après la coupe (6). Ce désavantage n'a pas été constaté dans le cas de l'ovaire de *Barbus callensis*.

A la différence du formol, le liquide de Bouin est un fixateur qui contient des agents coagulants permettant ainsi une fixation rapide des pièces (1,2), ce qui d'ailleurs explique la rapidité de l'obtention d'une bonne consistance de nos échantillons. La couleur jaune du Bouin ne semble avoir aucun effet sur la coloration des coupes utilisées, ce qui a déjà été rap-



Figures 3 : Follicules ovariens de *Barbus callensis*. (a et b) ovocytes stade V. (c) ovocyte au stade IV. (d) ovocyte au stade III. Gv : gouttelette vitelline. Ac : alvéole corticale, Zr : zona radiata, Cf : cellules folliculaires, Ct : cellules thécales. (a et c) fixés dans le liquide de Bouin et colorés à l'azan modifié. (b et d) fixés dans le formol et colorés à l'H&E.

porté dans la littérature (4). Cette vitesse de pénétration agit sur la cellule en provoquant des artefacts tels un gonflement, une rétraction ou un durcissement des éléments tissulaires (1). Dans notre cas, après une fixation prolongée (plus de deux mois) des ovaires de *Barbus callensis* il a été constaté un durcissement important, ce qui a été à l'origine d'effritements pendant la microtomie. Il est en effet classiquement admis que, lorsqu'un tissu tombe en poussière sur le rasoir du microtome, le fixateur est dit intolérant (4).

Le Bouin est un fixateur qui est considéré également comme dénaturant ou précipitant. L'acide picrique, qui rentre dans sa préparation, peut provoquer une dénaturation irréversible des protéines avec apparition de groupements thiols sulfhydryle (R-SH) (1).

La visualisation des coupes obtenues par variation du fixateur et des colorants a mis en évidence la possibilité d'obtenir des teintures différentes à chaque élément, soit par variation dans le spectre de la couleur, comme c'est le cas dans la coloration à l'azan modifié, soit par une variation dans le contraste d'une même couleur dans le cas de la coloration à l'H&E. Cette mise en évidence des différents éléments tissulaires et la différenciation entre eux constituent l'objectif principal d'un procédé de coloration (7).

Dans le présent travail, la coloration par l'H&E avait montré, pour les deux fixations, l'ensemble de la structure des ovocytes, distinguant ainsi les stades primaires

par rapport aux stades de développement les plus avancés avec une seule couleur dominante (rosâtre) mais avec des contrastes différents en fonction des structures et des stades. Selon Cannet (7), cette coloration est conçue pour la mise en évidence de l'architecture générale de la cellule, à savoir : les noyaux, le cytoplasme et les fibres de collagènes. C'est une coloration de routine la plus couramment pratiquée, vu sa simplicité dans la mise en œuvre et la rapidité de sa réalisation. Selon Exbrayat (4), les teintes bien contrastées facilitent l'identification immédiate des différents tissus. L'H&E est souvent considérée comme méthode d'usage pour l'étude de l'accroissement des contrastes, ce qui est assuré par la combinaison de deux colorants dont l'un est nucléaire (l'hémalum ou l'hématoxyline de Groat) et l'autre cytoplasmique (l'éosine).

L'image obtenue dans le cas de la coloration par l'azan modifié, était plus différenciée et plus nette dans la mise en évidence des structures. Les différents constituants sont identifiés en captant différentes teintures spécifiques. Exbrayat (4) considère l'azan modifié comme substituant des colorations azoïques à base d'azocarmin et d'aniline, qui permettent une mise en évidence fine de nombreuses structures histologiques.

CONCLUSION

La fixation et la coloration des pièces tissulaires/cellulaires sont les deux facteurs majeurs qui peuvent conditionner la réussite ou l'échec de la lecture des résultats de la technique histologique. Dans le

cadre du présent travail nous pouvons retenir que l'association optimale, pour donner le détail des structures histologiques, est le liquide de Bouin pour la fixation et l'azan modifié pour la coloration. Cette association est à recommander dans tout objectif visant à une étude détaillée de la dynamique des constituants ovariens de *Barbus*

callensis. L'association formol/hématoxyline-éosine, ne donnant pas autant de détails, reste néanmoins tout à fait valable pour la mise en évidence de l'architecture générale des tissus, et son application notamment dans les études de biométries cellulaires et particulièrement celle concernant la dynamique de reproduction.

BIBLIOGRAPHIE

1. VENTEO L., VELOT E. : L'importance de la fixation en histochimie. *Rev. fr. histotechnol.*, 2010, 23(1), 25-32.
2. CANNET C. : Artéfacts -les difficultés de la technique histologique- les gageures de la fixation. *Rev. fr. histotechnol.*, 2004, 17(1), 11-20.
3. CANNET C. : Artéfacts -les difficultés de la technique histologique- de la circulation à la coupe. *Rev. fr. histotechnol.*, 2006a, 19(1), 71-83.
4. EXBRAYAT J-M.-Méthodes classiques de visualisation du génome en microscopie photonique. Ed. Médicales Internationales, Londres-Paris-New York, 2000.
5. FOX H.C., JOHNSON F.B., WHITING J., ROLLER P.P.: Formaldehyde Fixation. *J. of Histochem. and Cytochem.*, 1985, 33(8), 845-853.
6. LARCHER T. : Evaluation de trois substances du formol sur la fixation des tissus biologiques d'animaux. *Rev. fr. histotechnol.*, 2010, 23(1), 11-24.
7. CANNET C. : Artéfacts -les colorations topographiques. *Rev. fr. histotechnol.*, 2006b, 19(1), 85-96.

PREMIERES OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES DE L'OVIDUCTE DE *BOULENGERULA TAITANUS*, LOVERIDGE 1935, AMPHIBIEN GYMNOPHIONE

*Michel RAQUET 1, John MEASEY 2, Jean-Marie EXBRAYAT 1

*mraquet@univ-catholyon.fr

(1) *Université de Lyon, UMRS 449, Laboratoire de Biologie Générale, Université Catholique de Lyon et Laboratoire de Reproduction et de Développement comparé, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 25, rue du Plat, F-69288 Lyon cedex 02 (France).*

(2) *Molecular Ecology and Evolution Program, Kirstenbosch Research Centre, South African National Biodiversity Institute, Private Bag X7, Claremont 7735, South Africa; Department of Biodiversity and Conservation Biology, University of the Western Cape, Private Bag X17, Bellville 7535, South Africa; Department of Herpetology, National Museums of Kenya, P.O. Box 40658-00100, GPO Nairobi, Kenya.*

RESUME

Boulengerula taitanus est une espèce ovipare de Gymnophione, habitant les terrains humides des monts Taïta du Kenya. L'histologie de l'oviducte des femelles, prélevé en saison de reproduction, révèle une structure tripartite, typique des Amphibiens ovipares, composée d'une *pars recta*, d'une *pars convoluta* et avant le cloaque, d'une *pars utera*. Les techniques classiques d'histologie et d'histochimie permettent de distinguer le contenu cytoplasmique des cellules glandulaires de l'épithélium oviductal. Elles permettent aussi d'analyser la structure et la composition de la gangue des œufs retrouvés dans l'oviducte. Il apparaît alors que la première

couche de cette enveloppe, étant de nature plutôt glycoprotéique, a été produite par les cellules glandulaires de la *pars convoluta*. Quant à la seconde, plus externe, elle est composée de protéoglycannes sulfatés et acides et provient donc de la *pars utera*. Ces résultats révèlent les spécificités de *B. taitanus* en la rapprochant toutefois, d'une autre espèce de Gymnophione étudiée, *Ichthyophis glutinosus*.

INTRODUCTION

Boulengerula taitanus est un Amphibien Gymnophione, vivant dans les terrains d'altitude des monts Taita, au Kenya (Figure 1A). Cette petite espèce serpentine, d'une vingtaine de centimètres de

longueur, possède un mode de vie fouisseur (1). En période de reproduction, la femelle creuse une chambre sphérique à une profondeur d'environ 20 cm, où elle pond entre 6 et 10 œufs de 8 mm de diamètre environ. Après éclosion, les jeunes se nourrissent des sécrétions épidermiques de leur mère pendant quelques semaines (2).

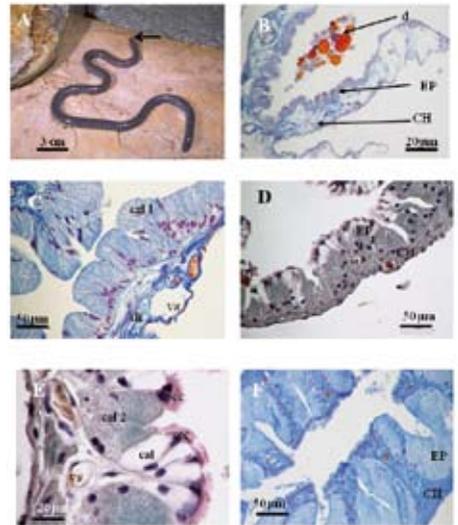
La biologie de la reproduction de cette espèce commence à être connue. L'ovaire a déjà été étudié, ainsi que des éléments de son cycle (3,4). Notre étude s'est intéressée à l'histologie de l'oviducte, dont la principale fonction est de capter le produit de l'ovulation et de l'acheminer vers l'extérieur, ainsi qu'aux analyses histochimiques de la gangue des œufs oviductaux. Les membranes ovulaires ont pour rôle de protéger l'embryon des chocs et de la dessiccation. Elles permettent à l'œuf proprement dit de tourner sur lui-même et de s'orienter par rapport à la pesanteur. Elles facilitent aussi la ponte (sortie du cloaque) et la fécondation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les femelles de *B. taitanus* ont été collectées mensuellement et fixées *in situ* avec du formaldéhyde à 10 % neutralisé par du carbonate de calcium à saturation, lavées et placées dans une solution d'éthanol à 70% (1). Les oviductes d'environ 88 mm ± 5,8 ont été prélevés pendant la période d'ovulation, c'est-à-dire de janvier à février. Puis ils ont été déshydratés dans des solutions d'éthanol de concentration croissante, inclus dans la paraffine, coupés à l'aide d'un microtome de Minot en sections transversales de 5 à 7 µm, et collées sur lame de verre avec de l'eau albumineuse. Les dif-

férentes coupes ont été déparaffinées, puis hydratées progressivement dans des bains successifs de cyclohexane et d'éthanol de degrés décroissants.

Dans le but de décrire l'organisation tissulaire de l'oviducte, diverses colorations topographiques (5) ont été mises en œuvre : - L'azan de Roméis a permis de caractériser les différentes structures de l'oviducte. Cette coloration distingue bien le tissu conjonctif en colorant les fibres de collagène en bleu turquoise et les noyaux des fibroblastes en violet, les érythrocytes en jaune vif, le cytoplasme des globules blancs en bleu soutenu, leur noyau en violet-rouge;



Figures 1 : A : femelle *Boulengerula taitanus* *in vivo*, la flèche désigne la tête. B : pavillon février : azan. C : *pars recta*, février : azan. D : *pars convoluta*, février : trichrome de Masson-Goldner. E : détail. F : *pars utera*, décembre : azan, cal = cellule caliciforme, cc = cellule ciliée, CH = chorion, cgl 1 = cellule glandulaire de type 1, d = débris, EP = épithélium, vs = vaisseau sanguin.

- Le trichrome de Masson Goldner, complète l'azan, en révélant plus spécialement les fibres de collagènes et la membrane pellucide;
- l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS) colore les fibres collagènes en jaune, les noyaux en bleu, les fibres musculaires et les hématies en rouge.

La coloration à l'azan donne déjà quelques caractéristiques biochimiques : la coloration bleu indigo correspond aux cytoplasmes basophiles contenant des protéines, l'orange pour les acidophiles et en brun-orange les corps lipidiques acidophiles.

Des colorations histochimiques complémentaires ont été mises en œuvre :

- La méthode à l'acide périodique et au réactif de Schiff (APS) et le bleu alcian-APS pour mettre en évidence les protéoglycannes neutres et acides;
- La coloration de Ravetto pour préciser la nature chimique des mucopolysaccharides (protéoglycannes) : en jaune les protéoglycannes carboxylés, en bleu les protéoglycannes sulfatés, en vert la présence conjointe des protéoglycannes sulfatés et carboxylés;
- Le rouge Sirius pour le collagène I et II.

RÉSULTATS

Colorations topographiques

Structure de base de l'oviducte :

La coloration à l'azan permet de distinguer clairement la structure histologique commune à tout l'oviducte. De l'extérieur vers la lumière du tube on distingue :

- une séreuse composée d'un chorion comprenant une séreuse conjonctive, un tissu conjonctif lâche avec des fibres mus-

culaires lisses et des vaisseaux sanguins, un épithélium pseudo-stratifié plus ou moins ondulé ou digité, des cellules ciliées plus ou moins nombreuses à la surface et essentiellement, des cellules hautes reposant sur une lame basale. Selon la morphologie de l'épithélium et les cellules qui le constituent, on peut définir plusieurs grandes sections dans l'oviducte.

Le pavillon :

Du côté rostral, le pavillon se présente, en coupe transversale, sous la forme d'une mâchoire en V, ouvert vers l'extérieur, et relié par un filament de conjonctif au corps de l'oviducte. Sa longueur oscille entre 10 et 15 % de celle de l'oviducte (pavillon compris). Son épithélium pavimenteux, légèrement ondulé est uniquement constitué de cellules ciliées cubiques, de 15 à 20 µm de côté (Figure 1B). Après le pavillon, l'oviducte se ferme en un tube continu débouchant dans le cloaque. Le chorion s'enrichit de fibres musculaires lisses, responsables des mouvements péristaltiques, permettant la progression des œufs.

La morphologie des plis de l'épithélium permet l'observation de trois parties distinctes dans l'oviducte.

La pars recta :

La première partie possède un épithélium épais, sans villosité, ou légèrement plissé. Sa longueur est estimée entre 10 et 15 % de la longueur totale. L'épithélium est prismatique. Il ondule légèrement et il ne contient presque plus de cellules ciliées, mais des cellules glandulaires, imposantes, de 70 µm de hauteur. Leurs noyaux sont basaux et mesurent 5 µm de diamètre. Leurs cytoplasmes possèdent un aspect «effiloché» caractérisant une fine granulation.

Les différentes colorations se concentrent un peu plus du côté apical. Leur limite extérieure apparaît floue. Cette caractéristique laisse entendre que leur sécrétion est du type holocrine, avec détachement de toute la cellule, ou de type apocrine ou holomérocine, avec amputation de la partie apicale du cytoplasme. L'absence de débris cellulaires dans la lumière de l'oviducte, fait pencher pour la deuxième définition (Figure 1C).

La pars convoluta :

La partie médiane représente 35 à 40 % de la longueur totale de l'oviducte avec des villosités nettement dessinées ou des digitations arrondies. Elle correspond à la *pars convoluta* (Figures 1D, E). Le chorion est épais, les vaisseaux sanguins particulièrement larges arrivent juste sous les crêtes. L'épithélium comprend outre des cellules ciliées situées sur les crêtes, deux types de cellules sécrétrices. D'abord des cellules hautes, de 24 à 32 µm de hauteur, ayant un noyau basal (4-6µm de diamètre) et un cytoplasme souvent granuleux et abondant, ayant des affinités tinctoriales avec l'azan qui les colore en bleu. Ce sont des cellules glandulaires. Ensuite, des cellules plus petites situées près des cellules ciliées, et dont la majeure partie du cytoplasme est tournée vers la lumière de l'oviducte et s'évasant avec un aspect souvent vacuolaire. Leurs noyaux sont situés à mi hauteur de l'épithélium: ce sont des cellules caliciformes. La coloration au trichrome de Masson-Goldner est particulièrement adaptée pour décrire leur remarquable morphologie.

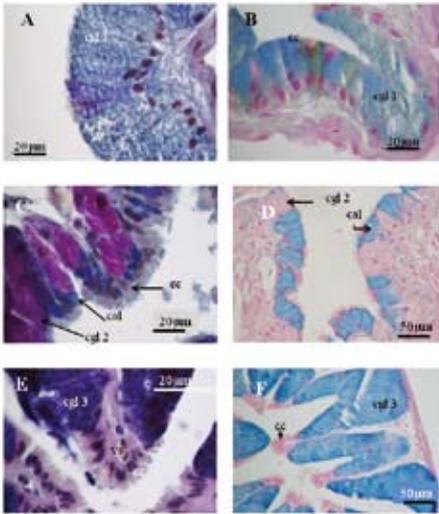
La pars utera :

La dernière partie avant le cloaque est

très digitée et ne contient plus qu'un seul type de cellules glandulaires. En janvier et février (période d'ovulation de *Boulengerula taitanus*), elles représentent entre 35 à 40 % de la longueur totale de l'oviducte. Cette partie se distingue de la précédente par ses crêtes hautes, aplaties et couvertes de cellules ciliées. Un large vaisseau sanguin est visible sous le plateau des crêtes. Le chorion est écrasé par la partie glandulaire. L'épithélium est organisé de façon très particulière. La partie glandulaire se manifeste sous forme de capuchons serrés et très développés, avec un seul type de grosses cellules glandulaires (80 µm de haut, 18 µm de large, noyau basal de 9 µm) qui tapissent les creux des villosités. A certains endroits, elles semblent se regrouper sous forme de rosaces (mais sans canal sécréteur central visible), à cause de la taille et de la complexité du dessin des villosités (Figure 1F).

Colorations histochimiques des cellules sécrétrices de l'oviducte

Les cellules glandulaires de la *pars recta* possèdent un cytoplasme coloré en violet par le bleu alcian-APS révélant la présence de protéoglycannes acides (cellules glandulaires de type 1 dans la Figure 2A). Dans les zones qui s'invaginent légèrement dans le chorion, la coloration de Ravetto montre parfois des cellules semblables, mais dont le cytoplasme contient une large vacuole, d'aspect un peu réfringent et de contour bleu plus vif (protéoglycannes sulfatés). Parfois, le cytoplasme se colore en jaune-vert, correspondant à divers protéoglycannes (Figure 2B). Les cellules caliciformes de la *pars convoluta*



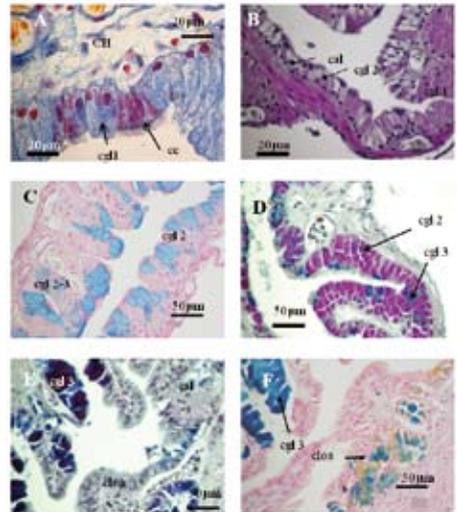
Figures 2 : A : *pars recta*, février, bleu-alcian APS. B : *pars recta*, février : coloration de Ravetto. C : *pars convoluta*, septembre : bleu-alcian APS. D : *pars utera*, décembre : coloration de Ravetto. E : *pars utera*, décembre : bleu-alcian APS. F : *pars utera*, septembre : coloration de Ravetto.

ont un cytoplasme bleu foncé coloré par le bleu alcian (Figure 2C) et bleu vif par la coloration de Ravetto (Figure 2D). Leur cytoplasme contient des protéoglycannes sulfatés et acides. Les cellules glandulaires granuleuses (type 2), sont fortement APS positif, et bien colorées en bleu par l'azan : signes de la présence de glucides et de protéines. Le bleu alcian et la coloration de Ravetto ne colorent pas leur cytoplasme : les protéoglycannes sont neutres. Les cellules glandulaires (type 3) de la *pars utera* sont très colorées par l'azan, par le bleu alcian, par l'APS et par la coloration de Ravetto, ce qui révèle la forte concentration en protéoglycannes acides et sulfatés en protéines, et en glucides (Figures 2 E, F).

En plus de ces trois grandes parties,

il existe des zones intermédiaires plus ou moins différenciées au cours de l'année. La transition du pavillon avec la *pars recta* se manifeste par la diminution du nombre de cellules ciliées et l'épaississement de l'épithélium, de façon très rapide (Figure 3A). Le passage de la *pars recta* avec la *pars convoluta* est plus progressif (Figure 3B). On soulignera le fait que les quelques cellules caliciformes de la *pars recta* contiennent des protéoglycannes carboxylés et acides, ainsi que des glucides, tandis que celles, plus nombreuses, de la *pars convoluta* possèdent un cytoplasme riche en protéoglycannes acides et sulfatés.

Entre la *pars convoluta* et la *pars utera*, on observe une zone où les cellules glandu-



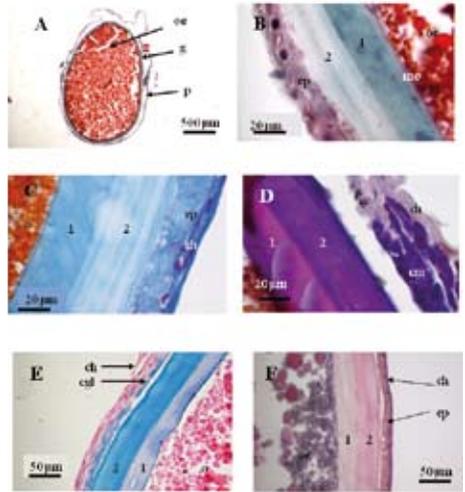
Figures 3 : Parties intermédiaires de l'oviducte. A : pavillon-*pars recta*, février : azan. B : *pars recta*-*pars convoluta*, février : HPS. C : *pars convoluta*-*pars utera*, février : Ravetto. D : *pars convoluta*-*pars utera*, février : Bleu-alcian APS. E : *pars utera*-cloaque, janvier : Bleu-alcian APS. F : *pars utera*-cloaque, janvier : Ravetto. cloa = cellules de l'épithélium cloacal.

lares possèdent les caractéristiques mixtes (Figures 3C, D). Dans le prolongement de la *pars utera*, avant le cloaque, une autre zone intermédiaire se distingue par un dessin interne complexe. Cette zone est caractérisée par la prolifération des cellules ciliées, avec une ciliature très haute. Les cellules glandulaires sont moins nombreuses, semblent se regrouper sous la couche de cellules ciliées. Leur cytoplasme contient des protéoglycannes très divers : sulfatés et carboxylés (respectivement bleu et jaune à la coloration de Ravetto), (Figures 3E, F).

L'histologie et l'histochimie de la gangue des œufs

Les œufs, dans la *pars utera*, écrasent et distendent considérablement la paroi. Les cellules de l'épithélium «écrasé» se disposent en quinconce. L'œuf est entouré d'une couche acellulaire épaisse et grasse, la membrane ovulaire (Figure 4A). On repère une zone plus large que la membrane vitelline autour de l'œuf, c'est la membrane de fécondation ou membrane périvitelline.

Le trichrome de Masson-Goldner colore en verdâtre la gangue ovulaire. On y distingue deux sous-couches qui se différencient par leur densité. La sous-couche proche de l'œuf mesure entre 23 et 32 µm d'épaisseur, fortement colorée en vert, donc de nature semblable à celle du collagène. L'autre sous-couche est plus large mesurant entre 26 et 42 µm environ, faiblement colorée en vert, et de densité moins importante. Le contenu cytoplasmique des cellules glandulaires de la paroi de l'oviducte apparaît sous forme de granulations



Figures 4 : Gangue de l'œuf, février. A: section transversale de l'oviducte au niveau d'un œuf, trichrome de Masson-Goldner. B: détail de la vue précédente. C: Azan. D: bleu alcian APS. E: coloration de Ravetto. F: coloration rouge Sirius. g=gangue, mo=membrane ovulaire, p=paroi de l'oviducte, oe= œuf, 1 ou 2=sous-parties de la gangue de l'œuf.

rose foncé (Figure 4B). Les deux mêmes couches sont aussi mises en évidence par la coloration à l'azan. La première est bien colorée en bleu (donc de nature protéique) avec des sortes d'inclusions un peu plus pâles. La seconde est à peine teintée de bleu, avec une densité nettement plus faible. Les cellules glandulaires de l'épithélium de l'oviducte ont un cytoplasme d'aspect et de couleur très semblables à la première couche (Figure 4C). Le bleu alcian-APS colore moins la première couche de la gangue que la seconde, mais dans la même gamme chromatique. Le contenu cytoplasmique des cellules de l'épithélium de l'oviducte est coloré en violet vif comme la deuxième couche. Le bleu alcian-APS marque très bien la membrane de féconda-

tion, en limitant une zone plus large, moins colorée, située entre les deux zones (Figure 4D). La coloration de Ravetto distingue, elle aussi, les deux couches de la membrane ovulaire. La première couche apparaît cette fois-ci faiblement colorée, plutôt rosâtre avec des zones bleutées, situées près de la membrane péritelline. La deuxième couche est fortement bleu roi. Ces deux teintes se retrouvent exactement dans les granules roses et bleutés du cytoplasme des cellules glandulaires de l'épithélium (Figure 4E). La coloration au rouge Sirius semble montrer que la couche externe de la gangue possède une nature plus fibreuse que la précédente (Figure 4F).

CONCLUSION

Structure de l'oviducte :

La structure tripartite de l'oviducte de *Boulengerula taitanus* est tout à fait semblable à celle rencontrée chez d'autres espèces d'Amphibiens (6, 7), et particulièrement chez les Gymnophiones ovipares étudiés, (8) notamment *Ichthyophis beddomei* (9), avec cependant, quelques particularités. La *pars recta* de l'oviducte de *B. taitanus* ne possède que peu de cellules ciliées, qui sont majoritairement des cellules hautes, au cytoplasme contenant des protéoglycannes acides, et quelques cellules séreuses à sécrétions plutôt acides. La *pars convoluta* des Gymnophiones présente la même constitution globale (10). Chez *B. taitanus*, la partie située près du tube digestif est plus aplatie et un peu plus ciliée, mais sans qu'il y ait une répartition globalement différente des cellules de l'épithélium. De même, les cellules glandulaires sont situées au fond des cryptes, sans être

organisées en glandes. Cependant, les crêtes ciliées étant de plus en plus développées en direction du cloaque, elles peuvent apparaître comme de «fausses glandes» en coupes transversales, ainsi que l'a décrit Wake (11).

Caractères histochimiques :

Les caractères histochimiques de l'oviducte de *B. taitanus* confirment les observations faites chez les autres Gymnophiones ovipares, spécialement chez *I. beddomei*. Dans la partie antérieure (*pars recta* et la partie intermédiaire avec la *pars convoluta*), le contenu cytoplasmique des cellules de type glandulaire est constitué, en plus des protéines, de protéoglycannes plutôt acides et sulfatés. L'épithélium glandulaire de la *pars convoluta* produit aussi des glucides, c'est-à-dire des sécrétions plutôt neutres. La partie postérieure (partie intermédiaire avec la *pars utera* et la *pars utera* elle-même) contient des glucides avec un peu de protéoglycannes sulfatés et acides.

Gangue de l'œuf

La concordance de la composition histochimique des gangues avec le contenu cytoplasmique des cellules glandulaires confirme bien que, comme chez les autres 1

La membrane ovulaire possède les mêmes caractéristiques histochimiques que les sécrétions des cellules glandulaires de l'épithélium. On en déduit que ces dernières sont responsables de l'élaboration de la gangue autour de l'œuf. Dans le détail, la première sous-couche apparaît composée surtout de glycoprotéines (APS+, très bleu à l'azan), la deuxième, plus externe,

de protéoglycannes sulfatés et acides. A l'appui des études précédentes, nous déduisons que les cellules glandulaires de la *pars convoluta* sont responsables du dépôt de la première sous couche, celles de la *pars utera* de la deuxième. Les cellules caliciformes ne semblent pas intervenir, puisque leur contenu ne se retrouve pas dans la gangue. Leur sécrétion muqueuse, située au niveau de la ciliature, pourrait faciliter le mouvement des cils et donc, la propulsion de l'œuf vers la zone postérieure de l'oviducte. L'aspect concentrique et homogène des couches ovulaires implique que, pendant son transit, l'œuf tourne sur lui-même et accroche les différentes sécrétions produites dans les cryptes de l'épithélium.

L'espèce *Boulengerula taitanus* produit des œufs revêtus d'une enveloppe peu épaisse, qui se subdivise en deux sous-couches. Mais alors que chez les autres Amphibiens, la formation de la gangue est imputable, dans sa plus grande partie à la *pars convoluta*, chez *B. taitanus*, la *pars utera* est responsable de la sous-couche externe de l'œuf. Cette gangue ressemble à celle rencontrée chez *Ichthyophis glutinosus* (12, 13), qui possède également deux couches. Toutefois, la couche externe de la gangue des œufs chez *B. taitanus*, est aussi épaisse que la couche interne, alors que chez *I. glutinosus*, elle est de 500µm contre 100 pour la couche interne. La cou-

che interne chez *I. glutinosus* est orange à l'azan et non bleu foncé, pourpre foncé au trichrome de Masson Goldner et magenta plus soutenu par l'APS. Cela laisse entendre que la gangue des œufs de *B. taitanus* est moins riche en fonctions acides que celle d'*I. glutinosus*. Il est intéressant de noter que la gangue de l'œuf s'apparente à la gangue fine observée chez l'espèce vivipare *Typhlonectes compressicauda*, gangue constituée de protéoglycannes plutôt acides et de glucides APS+ (14).

Chez *B. taitanus*, contrairement à beaucoup d'espèces d'Amphibiens, c'est la couche interne qui est glycoprotéique et donc plus hydrophile *a priori* que la couche externe faite de protéoglycannes sulfatés. Ce fait est certainement à interpréter comme une adaptation à la vie fouisseuse de l'espèce. Les œufs éclos étant protégés par la mère dans une chambre creusée sous terre, très humide, ne nécessitent pas une gangue complexe et encore moins une gangue gonflant avec l'eau.

Ces premiers résultats histologiques chez une espèce rare, montrent l'intérêt évident d'une analyse préliminaire des structures anatomo-morphologiques, par des colorations classiques. Une étude de l'évolution tissulaire de l'oviducte au cours du cycle de reproduction, par exemple, devra s'appuyer sur elle.

BIBLIOGRAPHIE

1. MALONZA P.K., MEASEY J.: Life history of an African caecilian: *Boulengerula taitanus* Loveridge 1935 (Amphibia Gymnophiona Caecilidae). *Trop. Zool.*, 2005, 18, 49-66.
2. KUPFER, A., KRAMER, A., HIMSTEDT, W., GREVEN, H.: Copulation and egg retention in an oviparous Caecilian (Amphibia : Gymnophiona). *Zool. Anz.*, 2006, 244, 223-228.
3. RAQUET M., MEASEY G.J. et EXBRAYAT J.-M. : Premières Observations histologiques de l'ovaire de *Boulengerula taitanus*, Loveridge, 1935, Amphibien Gymnophione. *Rev. Fr. Histotech.*, 2007, 19 (1), 9-15.
4. RAQUET M., MEASEY G.J. et EXBRAYAT J.-M. : Structure of ovaries and the ovarian cycle in *Boulengerula taitanus* (Loveridge, 1935) (Amphibia, Gymnophiona). *14th Ord. Gen. Meet. Soc. Eur. Herp., Porto* (Portugal), 2007, 285.
5. EXBRAYAT J.-M. -Méthodes classiques de visualisation du génome en microscopie photonique, Tec&Doc, Editions Médicales internationales Londres Paris New York, 182p., 2000.
6. WAKE, M.H., DICKIE, R. : Oviduct structure and function and reproductive modes in Amphibians. *The Journal of Experimental Zoology*, 1998, 282, 477-506.
7. VAN GANSEN P. : Ovogenèse des amphibiens Pp. 21-55, in GRASSE, P.P. et DELSOL, M. (ed.). *Traité de Zoologie, Amphibiens*, tome XIV fascicule IB, Masson, Paris, 1995.
8. EXBRAYAT J.-M. : Modes of parity and oviposition p. 303-323. In J.M. EXBRAYAT (Ed). *Reproductive Biology and Phylogeny of Gymnophiona (Caecilians)*. Vol.5 of series edited by B.G.M. JAMIESON, Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, 2006.
9. WAKE, M.H. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part II: the kidneys and urogenital ducts. *Acta Anat.*, 1970, 75 : 321-358.
10. MASOOD PARVEEZ, U., NADKARNI, V.B. : Morphological, histological and Histochemical and annual cycle of the oviduct in *Ichthyophis beddomei* (Amphibia Gymnophiona). *J. Herp.*, 1991, 25 : 234-237.

11. SALTHER, N.S., MECCHAM, J.S. Reproductive and courtship patterns. Pp. 309-521. In *Physiology of Amphibia*, B. Lofts, Ed Academic Press New York, vol. 2, 1974.
12. WAKE, M.H. The reproductive biology of Caecilians. An evolutionary perspective. Pp. 73-100. In D.H. Taylor and S.I. Guttman (eds), *The Reproductive Biology of Amphibians*, Miami Univ., Oxford, Ohio; S.A.A., 1977.
13. BRECKENRIDGE, W.R., DE SILVA, G.I.S. : Observations on the eggs and larvae of *Ichthyophis glutinosus*. *Ceylon Journal of Sciences (Biological sciences)* 1973, 13 : 187-202.
14. BRECKENRIDGE, W.R., JAYASINGHE, S.: Observations on the Eggs and Larvae of *Ichthyophis glutinosus*. *Ceylon Journal of Sciences (Biology Sciences)* 1979, 13 : 187-204.

ETUDE HISTOLOGIQUE DES OVAIRES D'UN AMPHIBIEN GYMNOPHIONE *BOULENGERULA BOULENGERI* PENDANT LA PERIODE DE REPRODUCTION

*SERCLERAT Hanen¹, MEASEY John², EXBRAYAT J.-Marie¹, CHEVALIER Christine¹
*hserclerat@univ-catholyon.fr

*1*Université de Lyon, UMRS 449, Laboratoire de Biologie Générale, Université Catholique de Lyon et Laboratoire de Reproduction et Développement des Vertébrés, Ecole Pratique des Hautes Etudes, 25 rue du Plat, F-69288 LYON Cedex 2,
*2*Biological Department, University of Western Cape, Private Bag X17 Bellville 7535, South Africa

RESUME

Durant le cycle sexuel de la femelle de *Boulengerula boulengeri*, les études histologiques ont permis de décrire l'évolution ovarienne et les différenciations folliculaires, ainsi que l'identification des cinq stades de la folliculogénèse (nids germinatifs, follicules prévitellogéniques, follicules vitellogéniques, follicules atrétiques et corps jaunes). La croissance ovocytaire est caractérisée par l'évolution de la thèque, de la granulosa et des zones pellucides.

INTRODUCTION

Les Gymnophiones, amphibiens également connus sous le nom d'Apodes, vivent dans des milieux équatoriaux ou tropicaux d'une manière fousseuse. D'après les descriptions de (1, 2, 3, 4), les Gymnophiones sont caractérisés par la présence d'une

paire de tentacules sensoriels, placée entre l'œil et la narine et de deux yeux réduits, recouverte par une peau ou une membrane osseuse. Leur corps est allongé, annelé et, chez certains groupes, couvert d'écailles. Ce sont des animaux serpentiformes. Ils sont dépourvus de membres et de ceintures. Leurs formes sont diverses, leur taille varie d'une espèce à l'autre (5, 6).

Boulengerula boulengeri est une espèce de Gymnophione qui vit essentiellement dans les zones montagneuses, pré-montagneuses et les vallées de Tanzanie, Kenya, Rwanda et Malawi (7, 8, 9 et 10).

Cette espèce est caractérisée par l'allongement de tous ses organes. Les reins situés entre le foie et le cloaque, sont étroits, le tube digestif est rectiligne et à peine plus long que le corps de l'animal, le foie est plurilobé. L'appareil génital femelle comporte

deux ovaires et deux oviductes, parallèles aux reins, dont les extrémités antérieures se trouvent au niveau du cœur et s'ouvrent par un ostium, alors que leur extrémité postérieure pénètre dans le cloaque (1, 11).

Cette espèce est difficile à capturer du fait de sa vie fousseuse et probablement en raison de ses habitudes souterraines, ce qui explique que son mode de reproduction ne soit pas encore connu (12).

Pour décrire l'évolution ovarienne et les différenciations folliculaires de la femelle de cette espèce, des études histologiques ont été réalisées en utilisant, en particulier, la coloration à l'azan modifié, particulièrement adaptée à l'étude des gonades femelles (13, 14).

MATERIELS ET METHODES

Matériel biologique

Vingt six femelles de *Boulengerula boulengeri* ont été capturées par le Dr. John Measey, chaque mois, de décembre 2002 à novembre 2003, dans les forêts de la réserve Kwomkoro à l'est de la Tanzanie. Les prélèvements biologiques, sur des animaux anesthésiés par le Tricaine Méthanesulfonate (MS 222), ont été effectués dans les 4 heures suivant la capture, puis fixés dans le formol à 10 % et conservés dans l'alcool à 70°. Les ovaires des femelles ont été inclus dans une gélose à 1,3 % puis dans la paraffine. Ils ont été coupés longitudinalement au microtome de Minot (coupes de 5 µm). Les coupes ont ensuite été collées sur des lames «Super Frost plus».

Analyses histologiques

Les coupes d'ovaires déparaffinées et hydratées sont plongées dans des bacs conte-

nant 10 lames afin d'être successivement colorés au rouge nucléaire (0,1 %) pendant 15 min, puis à l'orange G molybdique (2 %) pendant 5 min et au bleu d'aniline (0,5 %) pendant 3 min.

Ensuite, les lames colorées sont déshydratées dans l'éthanol à 96° pendant 5 min, dans l'éthanol à 100° pendant 7 min, dans le butanol pendant 5 min et dans le cyclohexane pendant 10 min.

Pour protéger les coupes colorées et permettre une meilleure observation, un montage est réalisé en fixant une lamelle (Menzel Glaser) sur la coupe par une goutte de résine (EUKITT «O. Kindler GmbH») en évitant les bulles d'air. Une fois montées, les lames peuvent être conservées indéfiniment.

Les coupes ont été observées au microscope photonique aux objectifs 40, 100, 400 et 1000.

RESULTATS

La coloration à L'azan de Romeis modifié a permis de distinguer le tissu conjonctif, les cellules de granulosa et les nucléoles acidophiles et de caractériser les différents compartiments de l'ovaire.

Les différents stades folliculaires

L'observation des ovaires de *Boulengerula boulengeri*, pendant la période de reproduction a permis de décrire les différents compartiments de l'ovaire ainsi que l'évolution des follicules ovariens.

Follicules ovariens :

L'étude histologique a permis d'observer la présence de deux couches folliculaires entourant l'ovocyte. Une couche externe, de nature conjonctive, colorée en bleu tur-

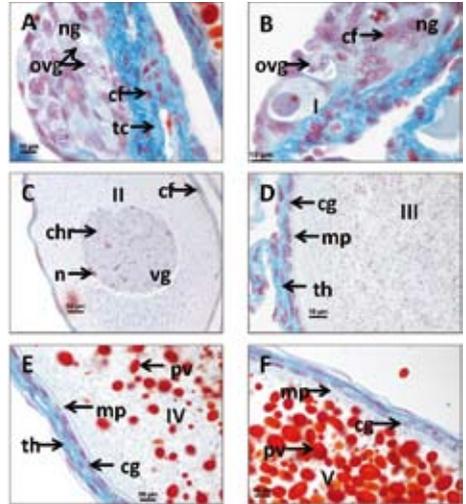
quoise à l'azan modifié, constitue la thèque externe. Elle contient des cellules aplaties, allongées avec des noyaux colorés en rouges, constituant la thèque.

Une couche interne correspondant à la granulosa, renferme des cellules épithéliales de forme variée, aplatie ou cubique selon les stades de maturations. Ces cellules contiennent des noyaux colorés en rouge à l'azan modifié. Ces couches folliculaires sont parfois traversées de vaisseaux sanguins.

L'ovocyte est caractérisé par un cytoplasme à structure et à composition variables, avec un noyau de taille et d'aspect différents en fonction des stades de maturation. L'évolution des follicules a été divisée en stade I correspondant aux nids germinatifs, stades II et III correspondant aux follicules prévitellogéniques, stades IV et V, ou follicules vitellogéniques, follicules atrétiques et corps jaunes. Pour chaque stade spécifique de cette espèce, une correspondance a été donnée avec la classification des stades de développement des follicules ovariens chez les Gymnophiones (stades A à F) proposée par Exbrayat (15).

Stade I (stade A): Nids germinatifs

Ils sont composés du tissu conjonctif coloré en turquoise à l'azan modifié contenant des cellules folliculaires de taille variable au cytoplasme acidophile et des vaisseaux sanguins. Ils comportent des ovogonies. Les nids germinatifs sont situés en périphérie des follicules à différents stades d'évolution (Figures 1a A et B).



Figures 1a : Observations histologiques des différents stades folliculaires dans un ovaire de *Boulengerula boulengeri*. Coloration azan de Romés modifié.

A : Nid germinatif. **B :** Nid germinatif contenant un follicule primaire. **C :** follicule au stade II (prévitellogénique). **D :** Follicule au stade III (prévitellogénique). **E :** follicule au stade IV (vitellogénique). **F :** follicule au stade V (vitellogénique).

cf = cellules folliculaires ; chr = chromatine ; cg = cellule de la granulosa ; mp = membrane pellucide ; n = nucléole ; ng = nid germinatif ; ovg = ovogonies ; pv = plaquettes vitellines ; tc = tissu conjonctif ; th = thèque ; vg = vésicule germinative. **Echelle :** 10 µm

Stade II et III : Follicules prévitellogéniques

Stade II (stade B) : Ce sont des follicules en cours de croissance issus des ovogonies. Ce sont des follicules primaires de forme irrégulière. Les ovocytes primaires peuvent être nus ou entourés d'une petite couche de cellules folliculaires aplaties. Ils possèdent un gros noyau central ou une vésicule germinative ayant plusieurs nucléoles acidophiles et des chromatines.

Stade III (stade C) : Ce troisième stade est caractérisé par l'épaississement de couches folliculaires, l'apparition des plaquettes vitellines, de la zone pellucide et des granules corticaux et par la différenciation des cellules de la granulosa en cellules plus jointives (Figures 1a C et D).

Stade IV et V : Follicules vitellogéniques (stade D)

Stade IV: Pendant ce stade, l'ovocyte est volumineux, son cytoplasme est rempli de nombreuses plaquettes vitellines de différentes tailles colorées en orange à l'azan modifié.

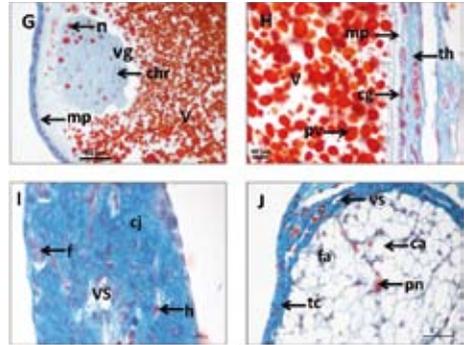
Trois couches sont observées dans la zone pellucide.

Stade V : Il est difficile de différencier les follicules aux stades V de IV. Les follicules au stade V sont des gros follicules mûrs et sphériques, caractérisés par un noyau excentré, des plaquettes vitellines envahissant l'ovocyte et l'apparition des plaquettes vitellines.

(Figures 1a E, F et 1b G, H).

Follicules atrétiques et corps jaunes Corps jaunes (stade F)

Ce sont des follicules dont l'ovocyte a été pondu. Ils sont caractérisés par la réduction progressive de la taille du follicule, la prolifération des cellules de la granulosa et l'apparition de cellules lutéales (Figure 1b I).



Figures 1b : Observations histologiques des différents stades folliculaires dans un ovaire de *Boulengerula boulengeri*. Coloration azan de Roméis modifié

A : follicule au stade V (vitellogénique) avec une vésicule germinative excentrée. **B :** follicule au stade V (vitellogénique). **C :** corps jaune. **D :** follicule atrétique.

Ca = cellules adipocytées ; chr = chromatine ; cg = cellule de la granulosa ; cj = corps jaune ; f = fibroblaste ; fa = follicule atrétique ; h = hématie ; mp = membrane pellucide ; n = nucléole ; pn = polynucléaire ; vg = vésicule germinative ; vs = vaisseau sanguin.

Echelle : 10 µm et 50 µm.

Follicules atrétiques (stade E)

Ce sont des follicules issus de la dégénérescence des ovocytes non ovulés. Ils sont caractérisés par la prolifération des cellules folliculaires vers le centre et la présence de cellules d'aspect phagocytaire ou adipocytaire (Figure 1b J).

CONCLUSION

Pour la première fois, la structure ovarienne a été décrite chez le Gymnophione *Boulengerula boulengeri*. L'étude histologique a ainsi permis de caractériser les différentes structures des follicules ovariens depuis le nid germinatif jusqu'au corps jaune ou l'atrésie folliculaire, en notant les changements cytologiques au cours des différents stades de la folliculogénèse. Chez les Gymnophiones, la présence de corps jaunes consécutive à l'évolution des follicules après ovulation, est observée chez les espèces ovipares (*Boulengerula boulengeri*, le présent travail, et *Boulengerula taitanus* (4) et vivipares (*Typhlonectes compressicauda*) (5). Ce travail entre dans le cadre d'une étude approfondie

des appareils reproducteurs de *Boulengerula boulengeri* et de la connaissance des cycles de reproduction de cette espèce en lien avec les facteurs environnementaux. L'étude des variations histologiques des organes reproducteurs mises en rapport avec les variations des facteurs climatiques (température, pluie) représente une méthode de choix pour apprécier les facteurs déclenchant la reproduction (6, 11). C'est ainsi que dans de précédents travaux, il a été montré que chez l'espèce vivipare sud-américaine *Typhlonectes compressicauda*, la reproduction était soumise à la pluviosité et que chez l'espèce ovipare africaine *Boulengerula taitanus*, les cycles de reproduction semblaient liés aux variations de température (4).

BIBLIOGRAPHIE

1. TAYLOR, EH. The caecilian of the world: a Taxonomic Review. University of Kansas Press, Lawrence. 1968, 334-343.
2. HRAOUI-BLOQUET, S. Nutrition embryonnaire et relations materno-fœtales chez *Typhonectes compressicaudus* (Dumeril et Bibron, 1841) Amphibien Gymnophione vivipare. Thèse de doctorat EPHE. 1995, 216 pp.
3. EXBRAYAT, J.M. et ESTABEL, J. Anatomy with particular reference to the reproductive system. In EXBRAYAT, J.-M. (Ed). Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth. 2006, 79- 155.
4. RAQUET, M. Modalités de la reproduction chez les femelles de *Boulengerula taitanus*, Amphibien Gymnophione. Dipl. EPHE, Lyon. 2008. 129 pp.
5. EXBRAYAT, J.M. Quelques aspects de la biologie de la reproduction chez *Typhonectes compressicaudus* (Dumeril et Bibron, 1841), Amphibien Gymnophione. *Cahiers Univ. Cath. Lyon, sér. Sci.* 1993, 7. 263 pp.
6. EXBRAYAT, J.M. Les Gymnophiones, ces curieux Amphibiens. Boubée Ed, Paris. 2000a, 443 pp.
7. NUSSBAUM, R. A et HINKEL, H. Revision of East African Caecilians of Genera *Afrocaecilia* Taylor and *Boulengerula* Tornier (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae). *Copeia*. 1994, 3: 750-760.
8. GOWER, D. J; LOADER, S. P; MONCRIEFF, C. B et WILKINSON, M. Niche separation and comparative abundance of *Boulengerula boulengeri* and *Scolecormorphus vittatus* (Amphibia: Gymnophiona) in an East Usambara forest, Tanzania. *African Journal of Herpetology*. 2004, **53** (2):183-190.
9. MEASEY, GJ. Are Caecilians Rare? An East African Perspective. *Journal of East African Natural History*. 2004, **93**: 1-21.
10. HARPER, E. B.; MEASEY, G. J.; PATRICK, D. A.; MENEGON, M. et VONESH, J. R. Caeciliidae *Boulengerula boulengeri* (Tornier, 1896) Usambara bluish-gray caecilian. Field Guide to Amphibians of the Eastern Arc Mountains and Coastal Forests of Tanzania and Kenya. 2010, 320 pp.
11. EXBRAYAT, J. M. Appareils génitaux et reproduction chez les amphibiens Gymnophiones. *Bull. Soc. Zool. Fr* 1992, **117** (3) : 291- 296.

12. DELETRE M. et. MEASEY G.J. Sexual selection vs ecological causation in a sexually dimorphic caecilian, *Schistometopum thomense* (Amphibia Gymnophiona Caeciliidae). *Ethology Ecology & Evolution*. 2004, **16** : 243-253.
13. EXBRAYAT, JM. Méthodes classiques de visualisation du génome en microscopie photonique, Tec & Doc Ed. Paris, 2000b. 182 pp.
14. CHEVALIER, C. Etude histologique du développement sexuel de l'apron du Rhône *Zingel asper*. L., percidé endémique menacé d'extinction. Thèse de Doctorat EPHE, 2007. Lyon. 210 pp.
15. EXBRAYAT, J.M. Oogenesis and folliculogenesis. *In* EXBRAYAT, J.-M. (Ed). Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (Caecilians), Science Publishers, Enfield (NH), Jersey, Plymouth. 2006, 275-290.

UNE PROCEDURE DEDIEE AU PHENOTYPAGE DE SOURIS PORTEUSES DE MUTATIONS CIBLEES, LETALES *IN UTERO* OU A LA NAISSANCE

*Olivia WENDLING^{1,2}, Marius TELETIN^{1,3},
Norbert B. GHYSELINCK¹, Manuel MARK^{1,2,3}
*olivia.wendling@igbmc.fr

1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964,
CNRS UMR1704, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France.

2 Institut Clinique de la Souris (ICS), Illkirch

3 Faculté de Médecine et Centre Hospitalier Universitaire, Strasbourg, 67000 France

RESUME

L'invalidation ciblée d'un gène murin entraîne souvent la mort *in utero* ou durant la période périnatale. Il convient alors de déterminer la fenêtre de temps durant laquelle la mort survient, d'en identifier la cause et de recenser l'ensemble des anomalies du développement relevant de la mutation. Cette analyse est fondamentale pour identifier les fonctions du gène d'intérêt. Nous proposons ici une procédure dédiée au phénotypage de souris porteuses d'une mutation létale *in utero* ou au moment de la naissance et dont la fonction du gène muté est à priori inconnue.

INTRODUCTION

La souris est le modèle animal le plus

proche de l'Homme, dont elle partage plus de 95% des gènes. Le modèle murin est aussi le seul qui soit accessible à la mutagenèse ciblée (ou mutagenèse dirigée). Cette technique, basée sur la recombinaison homologue, permet de générer différents types de modifications génétiques visant spécifiquement un allèle dont on connaît la séquence. L'objectif est souvent d'empêcher le gène de fonctionner : il s'agit de l'inactivation (ou invalidation) génétique, plus communément appelée Knock-Out (KO) d'un gène. Chez les individus hétérozygotes pour ce type de mutation, le développement n'est, en général, pas affecté car l'expression de l'allèle non modifié du gène s'effectue normalement. En revanche, chez les individus homozygotes pour la modifi-

cation génétique (mutants « nuls » pour le gène d'intérêt), il est théoriquement possible de proposer un (ou plusieurs) rôle(s) pour le gène en question en déterminant les conséquences de son absence sur le phénotype de la souris.

L'intérêt suscité par le modèle murin pour appréhender la physiopathologie des maladies humaines s'est concrétisé par le lancement de projets internationaux visant, dans un premier temps, à comprendre le rôle de chaque gène *in vivo*, dans son contexte physiologique. Pour atteindre cet objectif, des consortiums ont été créés, dont le travail consiste à invalider systématiquement la totalité des gènes de la souris : c'est par exemple l'objectif de l'International Knockout Mouse Consortium, IKMC (<http://www.knockoutmouse.org/>), dont le travail devrait être finalisé dès 2012. D'autres consortiums se sont donnés pour but d'analyser les phénotypes résultant de ces invalidations génétiques chez les animaux adultes afin de générer, à terme, une véritable encyclopédie de la fonction des gènes mammaliens. On trouve parmi eux, l'European Mouse Disease Clinic, EUMODIC (<http://www.eumodic.org/>) et l'International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC (<http://www.mousephenotype.org/>), qui regroupe plusieurs centres de phénotypage, américains, canadiens et européens, dont l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à Strasbourg. Ces entreprises ambitieuses révèlent qu'environ 30 à 40% des invalidations de gènes sont, à l'état homozygote, létales *in utero* ou peu de temps après la naissance. Cette constatation a mis en exergue la nécessité de développer de nouvel-

les stratégies de phénotypage, appropriées à l'étude du développement murin avant la naissance.

La survie de l'embryon et du fœtus in utero est jalonnée d'étapes critiques parce qu'indispensables à la poursuite du développement. Elles incluent, dans l'ordre chronologique : (i) la division des blastomères, première étape vers la construction d'un embryon pluricellulaire ; (ii) l'adhésion du blastocyste à l'endomètre suivie de son implantation; (iii) la mise en place, au cours de la gastrulation, des 3 feuilletts cellulaires fondamentaux qui sont à l'origine de l'ensemble des tissus et des organes; (iv) la formation du sac vitellin qui, chez les rongeurs, assure la nutrition de l'embryon précoce; (v) la différenciation et la croissance du placenta chorio-allantoïdien; (vi) l'établissement du lignage hématopoïétique, d'abord dans le sac vitellin, puis dans le foie; (vii) le développement du cœur et des vaisseaux embryonnaires et le remodelage du système vasculaire embryonnaire en système vasculaire fœtal (1). A l'opposé, un grand nombre de malformations touchant le système nerveux central, les systèmes digestif, respiratoire, musculo-squelettique et urinaire sont généralement sans incidence sur le déroulement de la gestation, car la nutrition, la respiration et l'épuration des déchets métaboliques du fœtus sont assurés par le placenta. Ces malformations peuvent cependant s'avérer fatales à la naissance.

En conséquence, lorsque la mutation d'un gène est létale pour les souriceaux avant leur sevrage, la connaissance de la

période de développement durant laquelle la mort survient est essentielle pour comprendre, grâce à l'analyse morphologique, les fonctions du gène d'intérêt. La procédure décrite ci-dessous est une proposition de logigramme destiné à l'analyse phénotypique de souris mutantes qui ne sont pas viables *in utero* ou durant la période périnatale.

METHODES

Toute étude de létalité prénatale nécessite un suivi quotidien de l'accouplement des souris hétérozygotes pour la mutation, fondé sur la mise en évidence des bouchons vaginaux qui correspondent au stade 0,5 jours post-coïtum (jpc) aussi appelé E0.5 (pour Embryonic day 0.5) (2).

La souris gestante est euthanasiée par dislocation cervicale. Elle est posée sur le dos, ses pattes sont épinglées sur une plaque en liège et son pelage est humidifié par de l'éthanol à 70%. La cavité abdominale est incisée et les cornes utérines sont prélevées et déposées (i) dans une boîte de Pétri contenant du tampon phosphate salin (PBS) pour les stades E7.5, E10.5 et E14.5 (Figure 1a), ou (ii) sur un papier filtre pour le stade E18.5. Les étapes de dissection sont ici décrites sommairement. On se référera à des ouvrages spécialisés pour les détails (3, 4).

Au stade E7.5, l'utérus est ouvert le long de son bord antimésométrial et les décidues (caduques) entourant chaque embryon sont séparées de la paroi utérine. Les embryons sont localisés dans la partie la plus étroite et la plus pâle de chaque dé-

cidue. Aux stades E10.5 et E14.5, le muscle utérin (myomètre) est sectionné entre chaque décidue à l'aide d'une paire de ciseaux. Les tissus maternels (décidue et myomètre) sont enlevés au moyen de pinces fines (Dumont n°5). Les embryons ou les fœtus ainsi isolés sont placés dans une

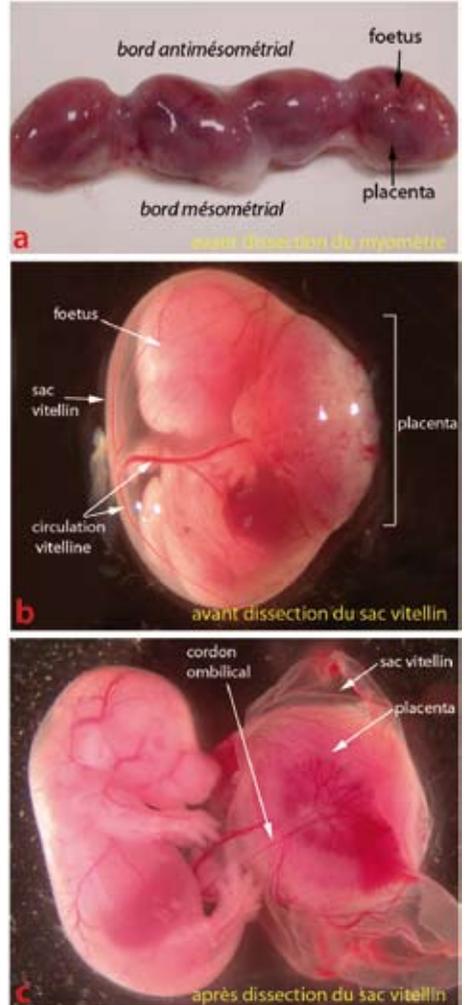


Figure 1 : Exemple de dissection et observation du fœtus au stade E14.5.

nouvelle boîte de Pétri contenant du PBS propre afin de disséquer les sacs vitellins (Figures 1b, c) qui serviront au génotypage puisqu'ils sont originaires du même œuf fécondé que l'embryon. Au stade E18.5, il est impératif de dépecer les fœtus afin de permettre la pénétration des fixateurs dans les tissus. Un fragment de peau servira au génotypage. Entre chaque dissection d'embryon ou de fœtus, les pinces sont soigneusement nettoyées avec du papier absorbant, afin d'éviter les contaminations interindividuelles qui fausseraient les résultats du génotypage. Chaque sac vitellin ou fragment de peau est déposé dans un tube 1.5 ml à fond conique, en prenant soin de bien respecter la correspondance entre le numéro de l'embryon (ou du fœtus) et le numéro du tube contenant le sac vitellin ou le fragment de peau. Ces tubes sont placés à -20°C en attente de génotypage.

Sur un plan statistique, on considère que l'absence de mutant est avérée, à un stade donné du développement, lorsque aucun homozygote pour la mutation n'est identifié parmi au moins 25 individus issus de croisements entre parents hétérozygotes. Ceci représente en général 3 à 4 portées à analyser dans leur globalité. D'autre part, une anomalie donnée du développement liée à la mutation est avérée lorsqu'au moins 3 individus mutants sont atteints et que cette anomalie est absente chez les fœtus sauvages issus des mêmes portées.

RESULTATS

Si, à 15 jours post-partum, l'établissement du génotype ne révèle la présence

d'aucun mutant, il est probable qu'ils meurent tous *in utero* et/ou au moment de la naissance. Il devient alors important de déterminer une fenêtre de létalité, car celle-ci constitue un indicateur du type d'anomalie du développement, et donne donc des informations importantes sur le rôle du gène muté.

Des données du laboratoire Jackson (Phenotype Ontology Database resource; www.informatics.jax.org) montrent qu'environ 30% des mutants porteurs de mutations létales meurent aux alentours de la naissance. Ceci s'explique par le grand nombre de processus physiologiques mis en œuvre pour la première fois durant cette période. Malheureusement, la collecte des souriceaux après une mise-bas naturelle (qui se déroule entre E19.0 et E21.0) n'est pas envisageable pour analyser le phénotype des mutants à la naissance, car les mères se désintéressent de leur progéniture malade, allant jusqu'à dévorer les souriceaux peu réactifs ou malformés. Le stade E18.5 représente donc le point de départ de la procédure que nous proposons (Figure 2). Ce stade marque l'achèvement des phénomènes d'histogenèse qui conditionnent l'adaptation à la vie extra-utérine. En conséquence, la cytoarchitecture de nombreux tissus à E18.5 ressemble beaucoup à celle de tissus fonctionnels à l'âge l'adulte. De plus au stade E18.5, les fœtus normaux sont déjà viables ce qui permet de réaliser un test simple d'adaptation à la vie extra-utérine. En pratique, les fœtus sont isolés et placés sur un papier filtre recouvrant une plaque chauffante réglée à 37°C, sous une lampe de bureau de 60W distante

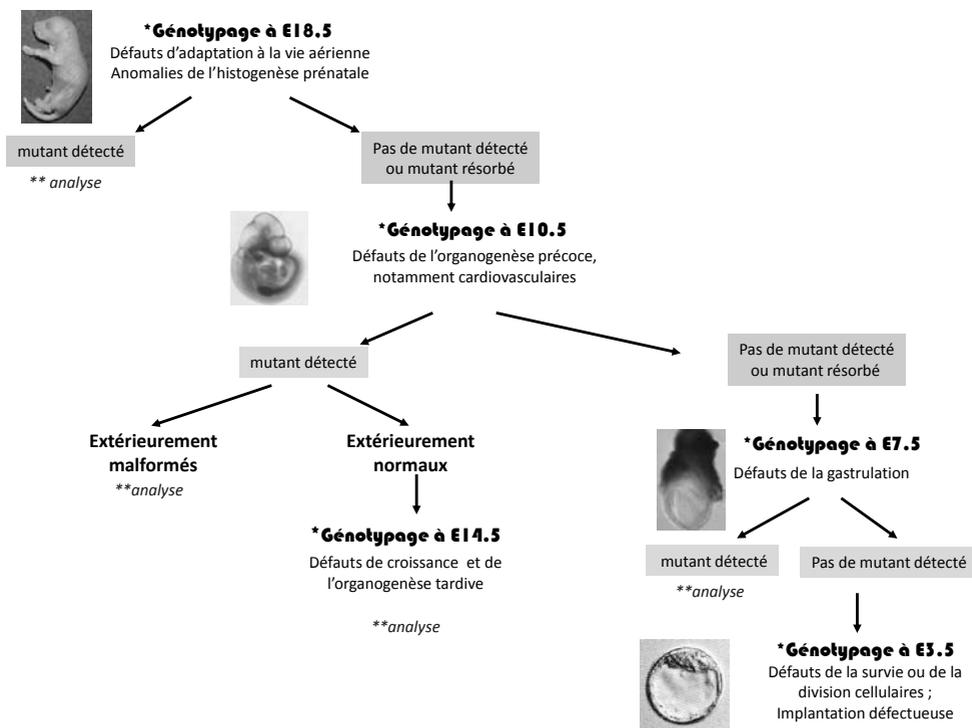


Figure 2 : Logigramme

* Génotypage d'au moins 25 embryons ou fœtus par stade de développement

** Analyse morphologique : aspect externe, sections histologiques sériées et préparations squelettiques d'au moins trois mutants

de 20 cm. Ils sont manipulés délicatement durant 30 minutes, dans le but de déclencher des mouvements respiratoires. On note (i) s'ils luttent pour respirer ou restent léthargiques ; (ii) si leur peau vire au rose ou reste mauve ; (iii) s'ils s'étirent ou restent en position fœtale ; (iv) s'ils réagissent au pincement. Par ailleurs, les fœtus et leurs placentas sont systématiquement pesés et les anomalies externes sont précisément notées: aspect de la peau (matte ou brillante), état d'ouverture des paupières, taille des oreilles, présence d'hématomes ou de saignements, forme du crâne, des

membres et de la queue. Les fœtus sont ensuite euthanasiés par inhalation de vapeurs de chloroforme. Les fœtus sont dépecés et fixés, soit dans la solution de Klotz (qui permet de préserver la couleur des tissus sans les rendre durs et /ou friables (5) en vue d'une éventuelle nécropsie, soit dans du liquide de Bouin (Carlo Erba) en vue de réaliser des sections histologiques sériées. Les placentas, collectés dans le même temps, sont fixés dans le liquide de Bouin et analysés en histologie. Les nécropsies sont complémentaires des analyses histologiques, car elles permettent de mieux

évaluer le volume des organes. Des analyses du squelette après double coloration par le bleu alcian et par le rouge d'alizarine peuvent compléter le phénotypage (6). Si les fœtus sont viables à E18.5, cela signifie que la mutation provoque la mort des souriceaux entre la naissance et le sevrage. Il convient alors de suivre quotidiennement le devenir de nouvelles portées de souriceaux durant cette période. L'absence de mutant à E18.5 signifie que la mutation est incompatible avec le développement *in utero*. Il convient alors d'analyser un stade du développement plus précoce.

Le stade E10.5, qui correspond à la fin du premier mois de développement chez l'Homme (<http://embryology.med.unsw.edu.au/OtherEmb/CStages.htm>), est choisi comme deuxième point de l'étude. Il coïncide avec l'achèvement du système cardiovasculaire embryonnaire qui est déjà pleinement fonctionnel et nécessaire au développement et à la survie dès E9.5. De plus, au stade E10.5 la zone labyrinthique du placenta chorio-allantoïdien, qui constitue le lieu des échanges embryo-maternels, est également bien développée (contrairement au stade E9.5). Par ailleurs, le système cardiovasculaire, encore symétrique par rapport à la ligne médiane, ne présente pas de variabilité interindividuelle contrairement au stade E11.5. C'est donc un stade important à analyser car des malformations cardio-circulatoires, incluant les anomalies placentaires, constituent une cause fréquente de mortalité embryonnaire chez les souris mutantes (7). Il est aussi intéressant de noter que seuls les embryons qui meurent avant ou au cours de la gastrula-

tion (c'est-à-dire avant E7.0) ne sont pas retrouvés dans les portées du stade E10.5. Tous les autres, même morts et en voie de résorption, ou présentant des arrêts de développement, sont encore identifiables. Après avoir noté l'état de la vascularisation du sac vitellin, celui-ci est disséqué et réservé pour le génotypage (voir Méthodes). Les embryons de la portée sont observés sous une loupe binoculaire pour noter si leur cœur bat et répertorier les anomalies externes qui sont photographiées à des fins d'archivage. Les embryons, ainsi que leurs placentas, sont ensuite fixés. Trois cas de figures sont à envisager. Premièrement, si les embryons mutants sont extérieurement normaux et sont vivants (leur cœur bat) à E10.5, le point d'étude suivant est le stade E14.5, qui correspond au quasi-achèvement de l'organogenèse. A ce stade de l'ontogenèse, les portées sont traitées comme à E10.5 : après examen sous la loupe binoculaire, les sacs vitellins sont conservés pour le génotypage, alors que les fœtus et leurs placentas sont fixés dans du liquide de Bouin en vue de leur analyse histologique sur des coupes sériées. Par contre, si les embryons mutants sont malformés et/ou morts à E10.5, le point d'étude suivant est le stade E9.5 ou E8.5, à choisir en fonction de la sévérité du retard de croissance et des anomalies observées à E10.5. Là encore, la procédure expérimentale est semblable à celle du stade E10.5. Enfin, si aucun embryon mutant n'est identifié par génotypage à E10.5, alors les défauts létaux apparaissent à des stades encore plus précoces du développement embryonnaire, comme E7.5 ou E3.5.

L'étude du stade E7.5 permet d'identifier les mutants qui meurent au cours de la gastrulation. Après ouverture de la décidue, le sac vitellin contenant l'embryon est gardé intact. Les embryons sont observés sous une loupe binoculaire, à travers le sac vitellin, pour identifier une éventuelle hypotrophie ou une anomalie de la forme, puis photographiés. On utilise ensuite l'embryon et son sac vitellin pour réaliser le génotypage. Si celui-ci révèle la présence d'embryons mutants dans la portée, on prélève des nouvelles portées à E7.5 pour réaliser des sections histologiques. Pour ce faire, les embryons sont laissés dans leurs décidues et fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 4% en tampon phosphate. Cette fixation permet à la fois de génotyper les embryons [par exemple par immunohistochimie ou par amplification de l'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)] et de réaliser des coupes histologiques pour étudier leur morphologie. Dans le cas où aucun embryon mutant n'est identifié, on analyse un stade de développement préimplantatoire, comme par exemple le stade E3.5.

Au stade E3.5, les blastocystes n'adhèrent pas encore à l'endomètre et sont expulsés de la cavité utérine (8). Si des blastocystes mutants sont identifiés après génotypage par PCR, la létalité résulte d'un défaut de survie ou d'implantation. Pour avancer dans l'étude du rôle du gène muté, les portées suivantes sont disséquées et analysées par histologie à E5.5. Il est important de noter qu'à ce stade il n'existe pas de possibilité de génotyper autre que l'immunohistochimie.

Le Tableau I répertorie les anomalies majeures provoquant la mort des embryons ou des fœtus entre E3.5 et la naissance, qui peuvent être facilement identifiables par la démarche logique et les méthodes d'analyses proposées dans cet article (7, 9-13).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Malgré un coût élevé généré par la nécessité d'une main d'œuvre technique nombreuse et qualifiée, l'analyse histologique traditionnelle telle qu'elle est proposée dans cette procédure ne peut pas être remplacée par la micro-tomodensitométrie, une technique de phénotypage embryonnaire populaire et réputée capable d'analyser rapidement un grand nombre d'échantillons (14, 15). Bien que la tomodynamométrie autorise l'obtention d'images tridimensionnelles d'embryons pour ensuite en réaliser des coupes virtuelles, la pauvreté du contraste de ces coupes ne permet pas toujours d'approcher une résolution spatiale satisfaisante et notamment de certifier l'absence d'une structure ne comportant que quelques dizaines de cellules (16).

L'organogenèse est presque achevée au stade E14.5. Dans ce contexte il est intéressant de souligner que notre logigramme n'utilise pas ce stade comme point de départ. L'analyse du stade E14.5 est beaucoup moins informative que celle du stade E18.5 car : (i) des malformations potentiellement létales à la naissance ne peuvent pas être diagnostiquées à E14.5, notamment les fentes palatines qui sont encore présentes chez plus du tiers des fœtus normaux à E14.5; (ii) l'histologie de la majorité or-

processus ou système affecté	anomalies observées	fenêtre de létalité	références
implantation	blastocyste non viable	autour de E3.5	9
	anomalie du trophoblaste	autour de E3.5	9
gastrulation	absence de formation du mésoderme	autour de E8.5	10
	développement incomplet du mésoderme	autour de E8.5	10
	défauts embryonnaires ou extraembryonnaires	autour de E8.5	10
	anomalies de la prolifération et/ou de l'apoptose	autour de E8.5	10
neurulation	défaut de fermeture du tube neural	naissance	11
système cardiovasculaire	circulation vitelline défectueuse	E8.5 - E10.5	7
	anomalies de la plicature cardiaque	E9 - E11	7
	anomalies du cloisonnement cardiaque	E11- naissance	7
	défauts de conduction de l'influx myocardique	E12-naissance	7
	absence de fermeture du canal artériel	naissance	7
	anomalie de position des arcs aortiques	naissance	7,11
	hypoplasie du myocarde	E10.5 - naissance	7,11
	formation défectueuse des valves auriculo-ventriculaires ou sigmoïdes	naissance	7,11
	hémorragies	E10.5 -naissance	11
système placentaire	absence de fusion chorio-allantoïdienne	E9.5 - E10.5	12, 13
	absence de formation de la zone labyrinthique	E10.5	12, 13
	réduction de la zone labyrinthique	E11.5 - naissance	12, 13
réalisation de la forme du corps	Défaut de fermeture de la paroi abdominale (externalisation d'organe)	naissance	11
système hématopoïétique	anémie	naissance	11
système pulmonaire	hypoplasie et / ou agénésie d'un ou plusieurs lobes	naissance	11
	anomalies de différenciation avec insuffisance de production du surfactant	naissance	11
	défaut d'évacuation du liquide présent dans le poumon foetal	naissance	11
système neuromusculaire	anomalies du système nerveux central	naissance	11
	atteinte des jonctions neuromusculaires	naissance	11
	atteinte des muscles respiratoires	naissance	11
système squelettique	anomalies de la cage thoracique	naissance	11
	anomalies des vertèbres	naissance	11
	obstruction des fosses nasales	naissance	11
	fentes palatines	naissance	11

Tableau I : Liste des anomalies recensées provoquant la mort in utero et autour de la naissance

ganes à E14.5 est très éloignée de son état définitif et ces organes ne sont pas encore fonctionnels. Il n'est donc pas raisonnable (pour des raisons de rapport coût financier/bénéfice scientifique) de l'étudier systématiquement.

Le phénotypage d'embryons et de fœtus mutants de souris peut fournir des informations précieuses sur (i) la fonction normale des gènes et (ii) les mécanismes pathogéniques des anomalies congénitales qui représentent la première cause de mortalité infantile dans les pays industrialisés. L'analyse embryonnaire contribue aussi à une meilleure connaissance de la diffé-

renciation de cellules souches d'intérêt thérapeutique. A ce propos, il a été récemment démontré qu'à la suite d'un infarctus induit expérimentalement chez des souris gestantes, des cellules souches provenant des embryons gagnent, via la circulation, le myocarde endommagé et se différencient, *in situ*, en cardiomyocytes (17). Par ailleurs, l'identification de la cause de la létalité chez les mutants homozygotes peut conduire à la découverte de pathologies viables, parce que moins sévères, chez les animaux hétérozygotes pour la même mutation. Ainsi les malformations cardiaques létales des embryons de souris porteurs d'une mutation « nulle » pour le gène

Nkx2.5 (NK2 transcription factor related, locus 5a) a conduit des chercheurs à réévaluer le phénotype des souris hétérozygotes pour cette mutation et a permis de découvrir, chez les individus porteurs d'une seule copie de l'allèle muté, des communications inter auriculaires viables et semblables à celles induites par les mutations du gène NKX2.5 chez l'Homme (18).

Enfin ces analyses phénotypiques permettent d'identifier des voies de signalisation qui sont perturbées dans des maladies humaines et d'envisager de corriger leurs défauts par des approches pharmacologiques. S'il est établi, depuis près de 30 ans, que l'acide folique (vitamine B9) administré à la femme enceinte diminuait statistiquement la récurrence des anomalies de fermeture du tube neural, les bases moléculaires de son action restent inconnues. Des études actuellement menées sur des modèles de souris mutantes permettront de combler ces lacunes et d'améliorer la prévention de ces anomalies qui concernent une grossesse sur 1000 (19). La persistance du canal artériel, une cardiopathie congénitale fréquente chez l'Homme, est

habituellement traitée par des inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines. Le phénotypage de souris mutantes nulles pour les enzymes Cox1 (cyclo-oxygénase 1) et Cox2 (cyclo-oxygénase 2), qui permettent la formation de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, indique que les inhibiteurs spécifiques de Cox2 sont très efficaces pour induire la fermeture du canal artériel, au contraire des inhibiteurs spécifiques de Cox1 qui n'ont pas ou ont peu d'effets (20). Plus récemment, nous (NG, MM) avons démontré que l'administration à la souris gestante d'acide rétinoïque (le métabolite actif de la vitamine A), permettait de corriger une malformation faciale létale et d'amener les embryons mutants à l'âge adulte (21). La même molécule corrige les anomalies sévères de l'oreille interne observées chez les souris mutantes nulles pour le gène Hoxa1 (Homeobox A1) (22).

En conclusion, l'analyse des embryons et fœtus générés par mutagenèse ciblée chez la souris est une approche expérimentale irremplaçable pour modéliser les bases génétiques des maladies humaines.

BIBLIOGRAPHIE

1. COPP, A.J. Death before birth : clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genetics*, 1995, 11 : 87-93.
2. KAUFMAN, M.H. The Atlas of Mouse Development, Academic Press. 1992
3. COPP A.J. and COCKROFT D.L. Postimplantation mammalian embryos: a practical approach. Oxford University Press. 1990
4. NAGY, A.; Gertsenstein, M.; Vinters-ten, K.; Behringer, R. Manipulating the Mouse Embryo, a Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003
5. BAPTISTA, C.A.C.; CONRAN, P.B. Plastination of the heart: preparation for the study of the cardiac valves. *Int Soc Plastination*, 1989, 3 : 3-7.
6. OVCHINNIKOV, D. Alcian Blue/Alizarin Red Staining of Cartilage and Bone in Mouse. Cold Spring Harb Protoc, 2009 (3)
7. CONWAY, S.J.; Kruzynska-Frejtag, A.; Kneer, P.J.; Machniki, M.; Koushik, S.V. What cardiovascular defect does my prenatal mouse mutant have, and why? *Genesis*, 2003, 35 : 1-21.
8. VOSS, Z.K.; Thomas, T.; Petrou, P.; Anastassiadis, K.; Schöler, H.; Gruss, P. Taube nuss is a novel gene essential for the survival of pluripotent cells of early mouse embryos. *Development*, 2000, 127 : 5449-5461.
9. RINKENBERGER, J.L.; Cross, J.C.; Werb, Z. Molecular Genetics of Implantation in the Mouse. *Developmental Genetics*, 1997, 21 : 6-20.
10. TAM, P.L.; Behringer, R. Mouse gastrulation : the formation of a mammalian body plan. *Mechanisms of Development*, 1997, 68 : 3-25.
11. TURGEON, B.; Meloche, S. Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiol Rev.*, 2009, 89 (1) :1-26.
12. CROSS, J.C.; Werb, Z.; Fisher, S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*, 1994, 266 : 1508- 1518.
13. HAN, V.K.M.; Carter, A.M. Control of growth and development of the fe-to-placental unit. *Current Opinion in Pharmacology*, 2001, 1 : 632- 640.
14. JOHNSON, J.T.; HANSEN, M.S.; WU, I.; HEALY, L.J.; JOHNSON, C.R.; JONES, G.M.; CAPECCHI, M.R.; KELLER, C. Virtual histology of transgenic mouse embryos for high-throughput phenotyping. *PLoS Genet.*, 2006, 2(4) : e61.

15. CLEARY, J.O.; MODAT, M.; NORRIS, F.C.; PRICE, A.N.; JAYAKODY, S.A.; MARTINEZ-BARBERA, J.P.; GREENE, N.D.E.; HAWKES, D.J.; ORDIDGE, R.J.; SCAMBLER, P.J.; OURSELIN S.; LYTHGOE, M.F. Magnetic resonance virtual histology for embryos: 3D atlases for automated high-throughput phenotyping. *NeuroImage*, 2011, 54 : 769–778.
16. MARK, M.; LUFKIN, T.; VONESCH, J.L.; RUBERTE, E.; OLIVO, J.C.; DOLLÉ, P.; GORRY, P.; LUMSDEN, A.; CHAMBON, P. Two rhombomeres are altered in *Hoxa-1* mutant mice. *Development*, 1993, 119:319-338.
17. KARA, R.J.; BOLLI, P.; KARAKIKES, I.; MATSUNAGA, I.; TRIPODI, J.; TANWEER, O.; ALTMAN, P.; SHACHTER, N.S.; NAKANO, A.; NAJFELD, V.; CHAUDHRY, H.W. Fetal cells traffic to injured maternal myocardium and undergo cardiac differentiation. *Circ Res.*, 2012, 110 : 82-93.
18. BIBEN, C.; WEBER, R.; KESTEVEN, S.; STANLEY, E.; MCDONALD, L.; ELLIOTT, D.A.; BARNETT, L.; KÖENTGEN, F.; ROBB, L.; FENELEY, M.; HARVEY, R.P. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene *Nkx2-5*. *Circ Res.*, 2000, 87 : 888-895.
19. JURILOFF, D.M.; HARRIS, M.J. Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet*, 2000, 9 : 993-1000.
20. LOFTIN, C.D.; TRIVEDI, D.B.; TIANO, H.F.; CLARK, J.A.; LEE, C.A.; EPSTEIN, J.A.; MORHAM, S.G.; BREYER, M.D.; NGUYEN, M.; HAWKINS, B.M.; GOULET, J.L.; SMITHIES, O.; KOLLER, B.H.; LANGENBACH, R. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98 : 1059-1064.
21. DUPÉ, V.; MATT, N.; GARNIER, J.M.; CHAMBON, P.; MARK, M.; GHYSELINCK, N.B. A. Newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2003, 100 : 14036-14041.
22. PASQUALETTI, M.; NEUN, R.; DAVENNE, M.; RIJLI, F.M. Retinoic acid rescues inner ear defects in *Hoxa1* deficient mice. *Nature Genetics*, 2001, 29 : 34-39.

EFFETS DE LA METFORMINE SUR LES ASPECTS ULTRASTRUCTURAUX DE LA GLANDE SURRENALE CHEZ LE RAT DES SABLES (*PSAMMOMYS OBESUS*) SOUMIS A UN STRESS NUTRITIONNEL

*N. OMARI (1), F. HADJ BEKKOUCHE (3), F. LABROUSSE (2), A. MESSILI (4),
Y. DAHMANI-AÏT AKLI (1).
*omarinaima13@yahoo.fr

- (1) *Laboratoire de Nutrition et Métabolisme -Physiologie, F.S.B. – USTHB. BP. 32, Alger.*
(2) *Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Dupuytren, Limoges – France.*
(3) *Laboratoire d'Endocrinologie, F.S.B. - USTHB. BP. 32, Alger.*
(4) *Laboratoire d'Écologie et Environnement, F.S.B. - USTHB. BP. 32, Alger.*

RESUME

Ce travail consiste à instaurer précocement une thérapeutique antidiabétique à base d'un biguanide « la metformine » (Met) et d'analyser les effets de cette molécule sur les aspects ultrastructuraux de la glande surrénale chez un rongeur diurne déserticole, le rat des sables (*Psammomys obesus*) prédisposé génétiquement à développer un diabète de type 2 lorsqu'il est soumis à un stress nutritionnel.

L'expérimentation a duré 12 semaines et a porté sur 33 rats des sables adultes de sexe mâle, répartis en 3 lots : le lot témoins (T1) de 6 animaux reçoit le régime naturel (plantes halophiles), le lot de 18 animaux (T2) et le lot de 9 animaux, soumis au régime standard, reçoit la Met par intubation

à raison de 50 mg/kg de poids corporel (lot Met).

Les rats des sables (T2) développent une obésité, une hyperglycémie et une hyperinsulinémie par rapport à l'animal témoin (T1). Les animaux du lot Met montrent une élévation pondérale non significative, une normoglycémie tout au long de l'expérimentation et une chute de leur lipémie de l'ordre de 25 % au bout de 6 semaines de traitement. Le cortex surrénalien du lot (T2) manifeste des changements ultrastructuraux très importants au niveau des trois zones (glomérulée, fasciculée et réticulée) comparativement à celles de l'animal témoin (T1). Ces changements sont caractérisés par l'estompement de la membrane plasmique, l'élargissement de

l'espace intercellulaire, la dilatation du réticulum endoplasmique lisse (REL), la désintégration des mitochondries, des dépôts de lipofuschines, la présence de nombreux lysosomes, une importante vacuolisation des cellules et l'infiltration de tissu conjonctif, tout particulièrement de la zone réticulée. Quant à leur médullosurrénale les cellules sont complètement dégranulées, à noyau pycnotique avec un réticulum endoplasmique granulaire (REG) fortement dilaté, des mitochondries désintégrées, de nombreux lysosomes et une importante vacuolisation. L'institution précoce de Met chez *Psammomys obesus* soumis au régime standard de laboratoire, semble corriger de façon significative les désordres métaboliques ainsi que les altérations cellulaires des zones corticale et médullaire, notamment la vacuolisation des zones fasciculée et réticulée. Au niveau de cette dernière les dépôts de lipofuschines régressent.

INTRODUCTION

Les biguanides ainsi que leur pouvoir hypoglycémiant, lié au chlorhydrate de guanidine, ont été décrits dès 1918 (1). Un nouveau biguanide, présentant le maximum d'action pour une toxicité minimale : il s'agit du NN-diméthyl-biguanide ou metformine (Met) ou LA6023 (2). Cette molécule, non toxique, est parfaitement tolérée par voie digestive même après une absorption prolongée (3). La Met est la molécule la plus prescrite pour traiter les patients atteints de diabète de type 2 et en particulier, les patients en surpoids ou obèses, en raison de sa faible capacité à provoquer des hypoglycémies des prises de poids (4).

Contrairement aux sulfamides, la Met ne stimule pas l'insulino-sécrétion ni la sécrétion du glucagon (5), alors qu'elle réduit l'hyperinsulinémie post-stimulative ou postprandiale chez les diabétiques non insulino-dépendants ou chez l'obèse (6). Elle paraît également stimuler le transport transmembranaire du glucose médié par l'insuline, sans qu'il ne soit associé à une variation du nombre de récepteurs (7), ni à une augmentation de l'effet maximal de l'insuline (6).

L'intérêt principal de notre investigation est de mettre en évidence et d'analyser les effets de cette drogue, la Met, sur les désordres métaboliques et sur l'architecture cellulaire de la glande surrénale hyperglycémiant, par ses hormones (glucocorticoïdes, adrénaline) chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) susceptible de développer une insulino-résistance et par conséquent un syndrome diabétique de type 2 lorsqu'il est soumis à un régime standard de laboratoire qui s'avère hypercalorique pour cette espèce (8).

MATERIEL ET METHODE

Animaux

Le rat des sables, rongeur diurne déserticole, appartient à la famille des gerbillidés, se nourrit exclusivement de plantes halophiles de la famille des chénopodiacées : *Traganum nudanum*, *salsola foetida*, *sueda mollis*, *Salicornia fruticosa* et *Artriplex halimus*. Il est largement réparti dans le nord de l'Afrique, en particulier dans les régions désertiques d'Algérie, notamment dans la région de Béni - Abbes (Béchar).

Le rat des sables (*Psammomys obesus*) est capturé dans son biotope naturel par les

chasseurs du Centre National de Recherche sur les Zones Arides, station de Béni-Abbés.

Psammomys obesus, sort de son terrier aux heures les plus fraîches de l'été et les plus chaudes l'hiver. Sa reproduction est soumise à des variations saisonnières, avec un net ralentissement d'avril à juin (9-10). Le nombre de fœtus varie entre 3 et 7 avec un poids moyen de 8 g.

A ces facteurs écologiques s'ajoute une adaptation des principales fonctions physiologiques en vue de réduire les pertes d'eau. *Psammomys obesus* produit des urines très concentrées en urée et en électrolyte, ne contenant que très peu d'eau. Le système endocrinien, notamment les hormones corticosurréaliennes, doit jouer un rôle essentiel dans cette adaptation physiologique des métabolismes énergétiques et hydrominéaux à l'environnement extérieur (11).

Conditions d'élevage

Afin d'éviter le stress, les conditions d'élevage doivent être aussi proches que possible de leur biotope naturel. Chaque animal est gardé individuellement dans des cages en plastique. Un petit abri en bois, muni d'une ouverture permettant à l'animal de recréer les conditions naturelles de son terrier, est placé au fond de la cage. L'animalerie est maintenue à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ avec une humidité comprise entre 60 et 80%; la luminosité est fournie par un éclairage intermittent (12 h/jour).

Besoins nutritionnels

Régime naturel

A leur arrivée au laboratoire, un régime alimentaire à base de plantes halophiles du biotope d'origine est maintenu pendant une quinzaine de jours, durée qui correspond à la période d'adaptation à la vie en captivité (12).

Cette nourriture est ensuite progressivement remplacée par une plante halophile de la même famille que celle du désert (*Suaeda mollis*), mais poussant en bordure de mer (Anse de Kouali à Tipaza – Algérie). Une prise journalière de 50 g, correspond approximativement 20 à 22 cal/ jour.

Régime standard

Il s'agit d'un régime équilibré, sous forme de biscuits M25 d'Extralabo, adapté aux besoins des rats et des souris de laboratoire (approximativement 32,5 cal/jour, pour une prise de 10 g/jour de ce régime). Ce régime est hypercalorique pour *Psammomys obesus*, et le passage du régime standard alimentaire à base de plantes halophiles au régime standard se fait également de façon progressive.

Protocole expérimental

Nos expériences ont été effectuées sur des rats des sables (*Psammomys obesus*) adultes, âgés de 3 à 6 mois, de sexe mâle, pesant 70 à 100 g en début d'expérience. Nos investigations ont porté sur 33 rats répartis en trois lots, pendant 3 mois.

- Un lot témoin (T1), de six animaux, reçoit le régime naturel (plante halophile),
- Un lot (T2) de 18 animaux est soumis au régime standard de laboratoire et à l'eau salée à 0,09% « *ad libitum* »,

- Un troisième (lot Met), de 9 animaux, reçoit le régime standard de laboratoire et de la Met par intubation à raison de 5mg/100g de poids corporel tous les trois jours.

La metformine a été fournie gracieusement par le Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (LBFA), du Professeur Xavier Leverve de l'Université Joseph Fourier - Grenoble.

Techniques opératoires

Les animaux (témoins et expérimentaux) sont mis à jeun la veille du sacrifice. Afin de limiter les variations dues au rythme nyctéméral les prélèvements sont effectués entre 9 h et 11 h du matin.

Après pesée de l'animal, du sang est prélevé par ponction au niveau du sinus rétro-orbital, tous les quinze jours sur l'animal conscient. Le plasma obtenu après centrifugation du sang (3000 tours/min. pendant 15 minutes) est stocké à - 25°C jusqu'au moment des dosages.

Pour l'étude ultrastructurale, l'animal est anesthésié par injection intrapéritonéale d'uréthane à 25% soit 0,4 ml/100g de poids corporel, les organes sont fixés par perfusion intracardiaque pendant 15 à 20 min. (13) de glutaraldehyde à 2,5% dilué dans le tampon de Sorensen à PH 7,1 et à 4°C. Les glandes surrénales prélevées sont conservées dans le même fixateur pendant

1 à 2 heures à 4°C, puis post-fixées au tétraoxyde d'osmium 1% dans le tampon Sorensen 0,1M à pH 7,4 pendant 1h à 4°C. Les surrénales sont découpées en morceaux de 1à 2 mm, rincés avec du tampon Sorensen à 0,2 M pendant 3 fois 15 min à 4°C. Les pièces sont ensuite passées dans trois bains d'oxyde de propylène, à raison de 20 min. par bain. L'imprégnation se réalise dans un bain de résine pure d'époxy 812, pendant 12h à 4°C. L'inclusion est une étape indispensable vers la réalisation des coupes semi-fines. Elle se fait dans un mélange de résine fraîchement préparée et dans des gélules très sèches (étuve à 37°C. pendant 30 min.) et étiquetées. La polymérisation s'effectue dans l'étuve à 60°C. Des coupes semi-fines, préalablement colorées par le bleu de toluidine phéniqué, permettent d'identifier les zones glomérulées, fasciculées, réticulées et médullaires.

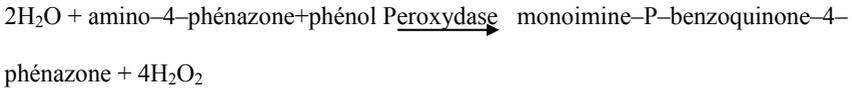
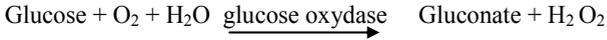
Des coupes ultrafines réalisées à l'aide d'un ultramicrotome OmU3 Reichert, sont alors effectuées, montées sur des grilles (HR24, Cu/Rh-200 mesh) et contrastées par l'acétate d'uranyle (14) et le citrate de plomb (15).

Les observations sont effectuées avec un Microscope Electronique à Transmission (Philips M10) du service d'Anatomie Pathologique du Centre de Recherche Hospitalo-universitaire Dupuytren de Limoges.

Techniques analytiques

Le **glucose** est dosé par la méthode Glucose oxydase – 4-amino-antipyrine (GOD-PAP) (16),

➤ Principe :



➤ Méthode de calcul.

Calcul de la concentration (C) du glucose plasmatique avec la formule suivante.

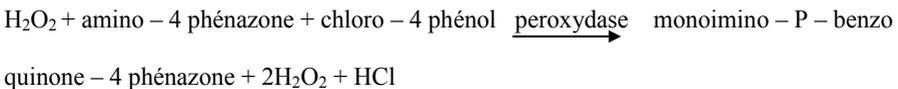
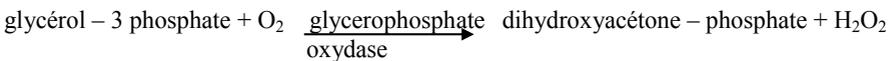
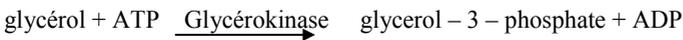
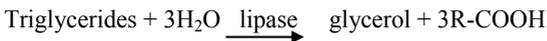
$$C = \frac{D.O \text{ essai}}{D.O \text{ s tan dard}} \times 100(\text{mg}/100\text{ml})$$

C : concentration des glucoses plasmatique

DO : densité optique

Les **triglycérides** sont dosés par la méthode G.P.O-P.A.P qui se base sur l'hydrolyse des triglycérides suivie du dosage enzymatique colorimétrique du glycérol libéré (17).

➤ Principe :



➤ **Méthode de calcul :**

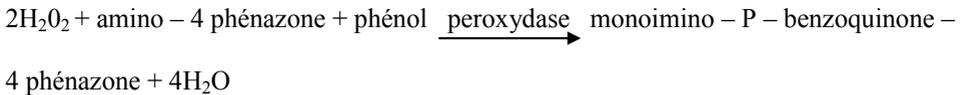
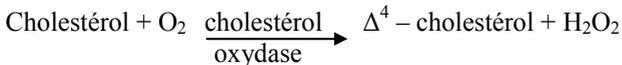
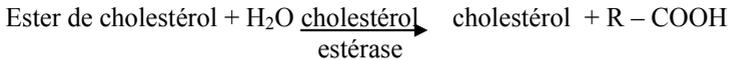
$$C = 200 X \frac{D.O \text{ essai}}{D.O \text{ standard}} = mg / 100ml$$

C : concentration des triglycérides plasmatiques

DO : densité optique

Le dosage du **cholestérol total** est réalisé par la méthode de Siedel (18).

➤ **Principe :**



➤ **Méthode de calcul :**

$$C = \frac{D.O \text{ essai}}{D.O \text{ standard}} X 200 (mg / 100ml)$$

C : concentration du cholestérol total

D.O : densité optique

Techniques des mesures morphométriques

L'étude morphométrique des zones corticale et médullaire de la glande surrénale a été réalisée sur 20 animaux dont : 5 animaux soumis au régime naturel (T1) ; 5 animaux soumis au régime standard de laboratoire (T2) et 10 animaux soumis au régime standard de laboratoire et traité à la Met. Les mesures ont été évaluées par un micromètre oculaire gradué au centième de millimètre.

[Objectif 100 : une division correspond à 12,5 μm]

$$\bar{X} = \sum \frac{X}{N} \quad N : \text{nombre d'animaux ; } X : \text{chaque donnée}$$

$$ESM = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{N(N-1)}}$$

La validité statistique des différences entre les moyennes est évaluée d'après le test «

Traitement statistique

L'ensemble des résultats est analysé statistiquement par le test de STUDENT « t ». La moyenne arithmétique X des valeurs individuelles est calculée pour chaque série et pour chaque paramètre, elle est suivie par la valeur de l'erreur standard à la moyenne « ESM » qui constitue l'intervalle de confiance de celle-ci.

t » de Fischer Student et la valeur de probabilité « p ».

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad \bar{X}_1 \text{ et } \bar{X}_2 : \text{moyennes à comparer; } N_1 \text{ et } N_2 : \text{nombre de valeurs pour chaque moyenne.}$$

La valeur de « t » calculée pour un nombre de degré de liberté $(N_1+N_2) - 2$ fixe le degré de signification « p », lu dans la table de Student.

Les valeurs moyennes sont affectées de l'erreur standard à la moyenne.

T2 Vs T1 ; Met Vs T2

* P<0.05 : peu significatif ; ** P <0.02 : significatif ; *** P <0.01 : très significatif.

RESULTATS

Poids corporel et paramètres biochimiques.

Tableau I : Evolution pondérale chez le rat des sables (*Psammomys Obesus*) soumis au régime standard de laboratoire et traité à la Met pendant 3 mois.

Périodes Animaux	Périodes					
	1	2	3	4	5	6
Lot T1 n=6 (plantes halophiles)	90,0 ±5,65	82,78 ±4,85	95,06 ±3,64	100,22 ±2,92	101,11 ±3,02	98,78 ±2,30
Lot T2 n=18 (régime standard)	105,50 ±9,13	103,40 ±9,38	110,67* ±7,47	105,60 ±5,40	103,22 ±2,92	108,17 ±8,53
Lot Met n=9 (régime standard + Met)	102,00 ±6,43	94,00 ±6,73	92,11 ±7,15	90,78 ±6,73	92,43 ±9,13	93,14 ±9,81

Une période = 15 jours

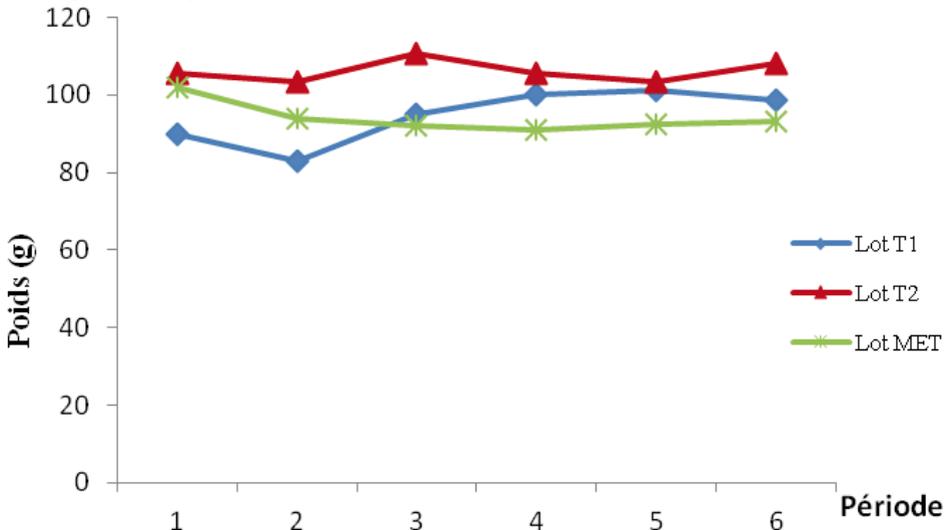


Figure 1 : Effet de la metformine sur l'évolution pondérale chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) soumis au régime standard de laboratoire.

Après 3 mois de régime standard de laboratoire et traitement par la Met, le poids corporel des animaux ne subit pas de variations importantes (Tableau I ; Figure1) par rapport à celui des animaux des lots T1

et T2. La variation est de 0% pour les animaux nourris aux plantes halophiles (T1) et de 12 % pour les animaux soumis au régime standard de laboratoire (T2).

Tableau II : Evolution moyenne de la glycémie chez le rat des sables (*Psammomys Obesus*) soumis au régime standard de laboratoire et traité à la Met pendant 3 mois.

Périodes	1	2	3	4	5	6
Animaux						
Lot T1 n=6 (plantes halophiles)	0,47 ±0,03	0,40 ±0,05	0,39 ±0,04	0,41 ±0,03	0,43 ± 0,04	0,45 ±0,05
Lot T2 n=18 (régime standard)	0,54 ±0,03	0,68 ±0,08	0,70 ±0,18	0,60 ±0,06	0,72 ±0,03	0,58 ±0,05
Lot Met n=9 (régime standard + Met)	0,70 ±0,08	0,58 ±0,05	0,35*** ±0,03	0,49 ±0,12	0,50 ±0,07	0,42 ±0,07

Une période =15 jours

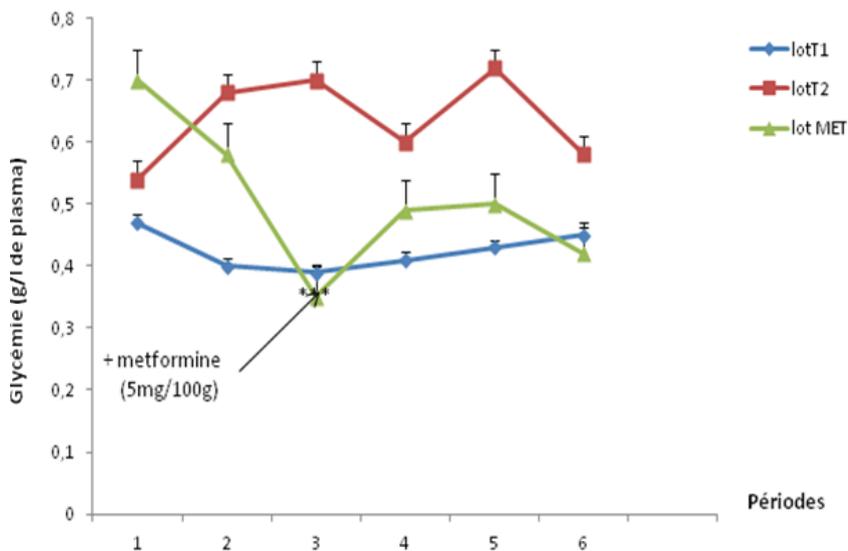


Figure 2: Effet de la metformine sur la variation de la glycémie chez le rat des sables (*Psammomys Obesus*) soumis au régime standard de laboratoire.

Chez les rats des sables traités à la Met, la glycémie est plus ou moins normale jusqu'à la fin de l'expérimentation et rappelle celle de l'animal soumis au régime naturel (T1); la valeur moyenne est de l'ordre de $0,50 \pm 0,07$ g/l (Tableau II ; Figure 2). Par rapport

à l'animal soumis au régime standard de laboratoire (T2), la variation est très significative ($P < 0,01$), et passe de $0,70 \pm 0,08$ à $0,35 \pm 0,03$ g/l au bout de 6 semaines de traitement.

Tableau III : Evolution moyenne des triglycérides chez le rat des sables (*Psammomys Obesus*) soumis au régime standard de laboratoire et traité à la Met pendant 3 mois.

Périodes	1	2	3	4	5	6
Animaux						
Lot T1 n=6 (plantes halophiles)	0,27 ±0,08	0,67 ±0,18	0,62 ±0,09	0,58 ±0,05	0,60 ±0,19	0,58 ±0,18
Lot T2 n=18 (régime standard)	0,19 ±0,03	4,18 ±0,12	1,75 ±0,33	1,98 ±0,46	1,98 ±0,48	1,53*** ±0,41
Lot Met n=9 (régime standard +Met)	0,65 ±0,33	3,35 ±0,44	1,62 ±0,57	1,30 ±0,32	1,62 ±0,47	1,24** ±0,32

Une période =15 jours

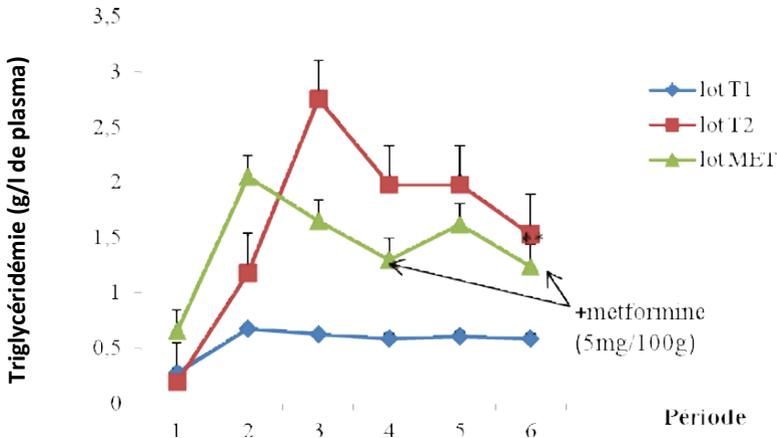


Figure 3: Effet de la metformine sur la variation de la triglycémie chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) soumis au régime standard de laboratoire.

La triglycémie chez les animaux nourris aux plantes montre une légère augmentation puisqu'elle est de $0,58 \pm 0,08$ g/l en fin d'expérimentation contre $0,27 \pm 0,08$ g/l (Tableau III ; Figure 3) ; alors qu'elle augmente considérablement chez les rats des sables soumis au régime standard de labo-

ratoire. Les valeurs des triglycérides passent de $0,19 \pm 0,03$ à $1,53 \pm 0,41$, soit une augmentation de 705% par rapport à l'état basal. Les animaux du lot Met, montrent une régression significative ($P < 0,02$), leurs triglycérides chutent de 39%.

Tableau IV : Evolution moyenne du cholestérol total chez le rat des sables (*Psammomys Obesus*) soumis au régime standard de laboratoire et traité à la Met pendant 3mois.

Périodes	1	2	3	4	5	6
Animaux						
Lot T1 n=6 (plantes halophiles)	0,39 ±0,03	0,35 ±0,08	0,55 ±0,06	0,56 ±0,05	0,67 ± 0,08	0,48 ±0,08
Lot T2 n=18 (régime standard)	0,22 ±0,03	0,37 ±0,03	0,80 ±0,08	0,67 ±0,04	0,81 ±0,04	0,65** ±0,04
Lot Met n=9 (régime standard + Met)	0,36 ±0,04	0,47 ±0,06	0,76 ±0,13	0,59 ±0,08	0,65 ±0,08	0,58* ±0,08

Une période =15 jours

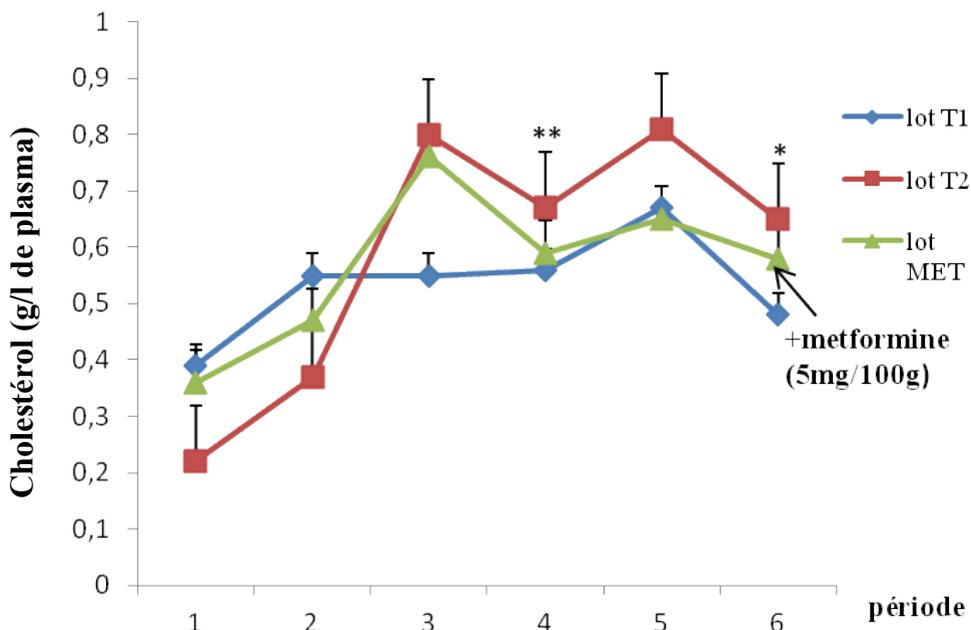


Figure 4 : Effet de la metformine sur la variation de la cholestérolémie chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) soumis au régime standard de laboratoire.

Après 3 mois d'expérimentation, la hauteur moyenne du cortex surrénalien des rats des sables soumis au régime naturel (T1) est de l'ordre de $99,84 \pm 5,91$. Chez l'animal soumis au régime standard de laboratoire (T2), la hauteur corticale augmente de 30%, les valeurs passent de $99,84 \pm 5,91$ à $130,20 \pm 6,3$ à μm

Chez l'animal traité aux biguanides, le cortex surrénalien affiche une diminution de 7% par rapport à celui des rats (T2), la diminution n'est pas significative

La zone médullaire des animaux (T2) varie de 33% par rapport à celle des animaux (T1). La régression de cette zone est peu significative ($P < 0,05$).

Chez les rats des sables traités à la Met, la hauteur de la médulla ne subit pas de variation significative, aussi bien par rapport aux animaux normaux (T1) qu'aux animaux (T2). La variation est de l'ordre de 5% pour le lot T1 et de 26% pour le lot T2 (Tableau V).

Ultrastructure de la glande surrénale chez les rats des sables soumis au régime standard de laboratoire et traités à la metformine durant 3 mois. a/ le cortex

- La zone **glomérulée**, chez les animaux nourris aux plantes halophiles, présente des contours membranaires cellulaires réguliers avec un espace intercellulaire étroit. Dans le cytoplasme, leur réticulum endoplasmique lisse (REL) est peu développé, les ribosomes libres, de nombreuses mitochondries à crêtes atypiques, peu d'inclusions lipidiques et peu de vacuoles autophagiques (Figure 5a).

Chez le rat des sables soumis au régime standard de laboratoire (T2) durant 3 mois, la zone glomérulée présente des cellules avec des espaces intercellulaires dilatés, certaines membranes estompées, des mitochondries volumineuses parfois désintégrées, un REL dilaté, de nombreuses gouttelettes lipidiques et une vacuolisation importante (Figure 5b).

Alors que chez les animaux soumis au régime hypercalorique et à la Met la zone glomérulée montre une moindre dilatation des espaces intercellulaires et des membranes cellulaires moins lésées. Le cytoplasme de ces cellules laisse voir certaines mitochondries saines et d'autres partiellement désintégrées, des vacuoles lipidiques moins nombreuses et de taille réduite. Le REL vésiculaire est très dilaté (Figure 5c).

- La zone fasciculée des animaux normaux, montre des cellules riches en REL, en mitochondries sphériques ou en bâtonnets, en lysosomes et en gouttelettes lipidiques (Figure 5d).

Chez *Psammomys obesus* nourri au régime standard, les cellules glandulaires de cette zone deviennent très volumineuses et présentent une importante dilatation des espaces intermembranaires. Le REL de forme vésiculaire est très dilaté, les mitochondries sont souvent désintégrées. A ce stade les cellules de cette zone se caractérisent par une intense vacuolisation (Figure 5e). Chez les animaux du lot Met, l'action du biguanide au niveau de cette zone se traduit surtout par la régression de la vacuolisation et les altérations membranaires cellulaires. L'espace intercellulaire de cette zone est également réduit (Figure 5f).

La cholestérolémie des animaux normaux (T1) ne subit pas de changement significatif

(Tableau IV; Figure 4), et est de $0,39 \pm 0,03$ g/l et de $0,48 \pm 0,08$ g/l en fin d'expérimentation.

Chez l'animal soumis au régime standard

de laboratoire, elle passe de $0,22 \pm 0,03$ g/l à $0,65 \pm 0,04$ g/l en fin d'expérimentation, d'où une augmentation de 195%.

Chez *Psammomys obesus* traité à la Met, la cholestérolémie diminue de 23%, soit $0,76 \pm 0,13$ g/l à $0,58 \pm 0,08$ g/l en fin de traitement.

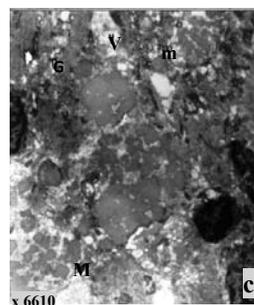
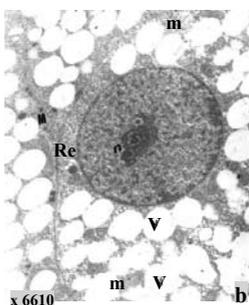
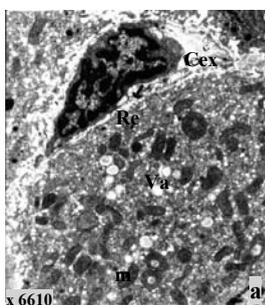
Analyses morphométriques des zones corticale et médullaire.

Tableau V : Variation moyenne des zones corticale et médullaire de la glande surrénale du rat des sables (*Psammomys Obesus*) soumis au régime standard de laboratoire et traité à la Met pendant 3 mois.

Zones Animaux	T1 (plante halophile) n=5	T2 (régime standard) n=5	Met (régime standard + metformine) n=10
Cortex (µm)	99,84 ± 5,91	130,20 ± 6,30**	119,88 ± 3,90
Médulla (µm)	54,84 ± 2,80	41,01 ± 6,49*	51,96 ± 1,63

Figures 5 : Aspects ultrastructuraux de la zone corticale de la glande surrénale chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) soumis au régime standard de laboratoire et traité par un biguanide antidiabétique la metformine durant 3 mois. Portion de la zone corticale fixée au glutaraldéhyde à 2.5% et post-fixée à l'OsO4 à 0.2 M.

- La zone **glomérulée**, chez les animaux nourris aux plantes halophiles, présente des contours membranaires cellulaires réguliers avec un espace intercellulaire étroit. Dans le cytoplasme, leur réticulum endoplasmique lisse (REL) est peu développé, les ribosomes libres, de nombreuses mitochondries à crêtes atypiques, peu d'inclusions lipidiques et peu de vacuoles autophagiques (Figure 5a).



Zone glomérulée

Témoin (lot T1) : (a : x 6610)

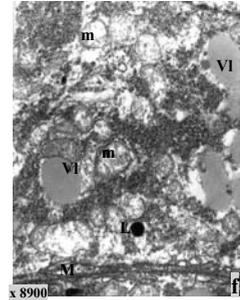
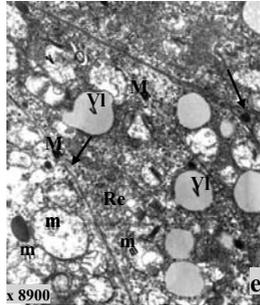
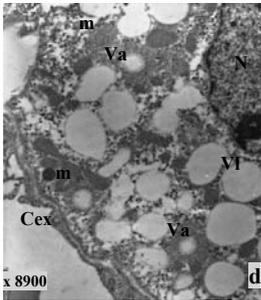
Capillaire sanguin (Cex), endothélium sinusoïde (flèche), mitochondries (m) à crêtes atypiques, vacuoles autophagiques (Va), REL (Re).

Diabétique (lot T2) : (b : x 6610)

Membrane plasmique estompée (M), REL (Re) abondant, vacuolisations (V), mitochondries (m).

Traité à la metformine (lot Met) : (c : x 6610).

Cellules sous capsulaire (G), vacuolisations (V), mitochondries (m).



Zone fasciculée.

Témoin : (d : x 8900).

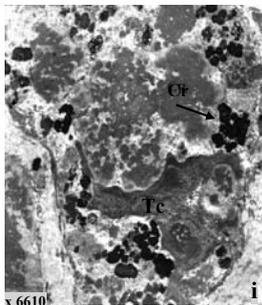
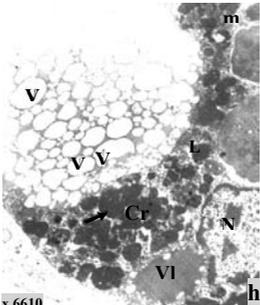
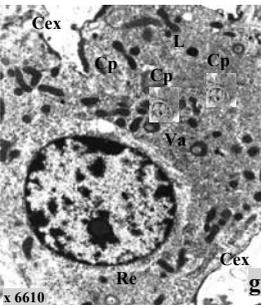
Capillaire sanguin (Cex), mitochondries (m) sphériques ou en bâtonnets, noyau (N), vacuoles lipidiques (VI).

Diabétique : (e : x 8900)

Membranes plasmiques (M), REL (Re), mitochondries (m), vacuoles lipidiques (VI), dilatation de l'espace intercellulaire (flèche).

Traité à la metformine. (f : x 8900)

Mitochondries (m) partiellement désintégrées, vacuoles lipidiques (VI), lysosomes (L).



Zone réticulée.

Témoin : (g : x 6610)

Capillaire sanguin (Cex), REL (Re) vésiculaire ou lamellaire, corps polylamellaire (Cp), vacuoles autophagiques (Va), lysosomes (L).

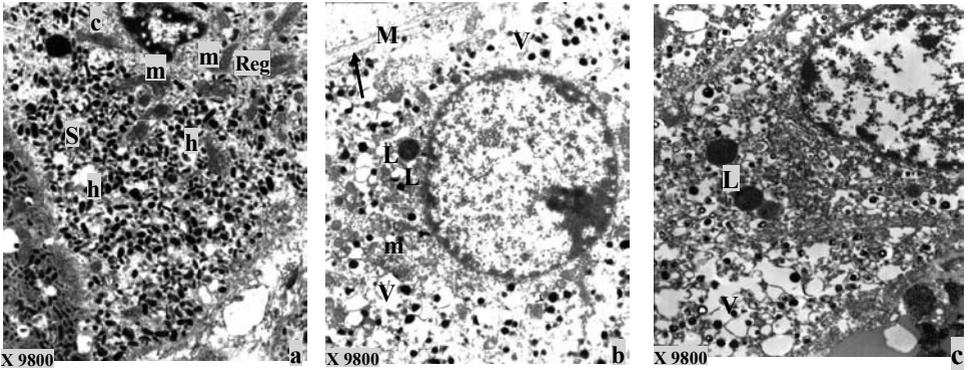
Diabétique : (h : x 6610)

Lipofuscines (flèche), corps résiduels (Cr), vacuolisation (V), lysosomes (L), mitochondries (m).

Traité à la metformine : (i : x 6610)

Corps résiduels (Cr), lysosomes (L), tissu conjonctif « fibrose » (Tc).

Figures 6 : Zone médullaire



Figures 6 : Aspects ultrastructuraux de la zone médullaire de la glande surrénale chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) soumis au régime standard de laboratoire et traité par un biguanide antidiabétique la metformine durant 3 mois.

Portion de la zone médullaire fixée au glutaraldéhyde à 2.5% et post-fixée à l'OsO4 à 0.2 M.

Témoin : (a : x 8900).

Cellules sombre (S), cellules claires (c), halo périphérique (h), REG (Reg), mitochondries (m).

Diabétique : (b : x 8900).

Vacuolisation (V), membrane plasmique (M), mitochondries (m), lysosomes (L), espace inter membranaire (flèche).

Traité à la metformine : (c : x 8900)

Lysosomes (L), vacuolisation (V).

- la zone réticulée, chez les animaux témoins (T1), laisse apparaître des cellules riches en REL d'aspect vésiculaire ou tubulaire, des mitochondries toujours à crêtes atypiques, des gouttelettes lipidiques denses aux électrons (Figure 5g).

Les cellules de cette zone, chez les animaux du (T2), présentent un noyau volumineux clair, des membranes cellulaires invisibles, une abondance en REL et en lysosomes, une intense vacuolisation, une importante fibrose intercellulaire (Figure 5h) et d'intenses dépôts lipidiques (dépôts noirâtres).

Toujours au niveau de cette zone, chez les rats des sables traités à la Met, les cellules se caractérisent par une moindre, voire absente, vacuolisation, une richesse en lysosomes et des grains de lipofuschine de petite taille (Figure 5i).

b/ la médullaire

La médullosurrénale du rat des sables normal montre deux types de cellules qui se distinguent par leurs grains de sécrétion. Les unes, à grains denses aux électrons de forme elliptique et sphérique les autres à grains de sécrétion arrondis avec un halo périphérique.

Les cellules de cette zone, sont volumineuses à membrane continue, disposées en travées ou en amas arrondis. Elles présentent un réticulum endoplasmique granulaire (REG) développé et des mitochondries à crêtes normales (Figure 6a).

Chez les animaux nourris au régime hypercalorique (T1), la médullosurrénale laisse apparaître des cellules volumineuses, des organites hypertrophiés et de nombreux lysosomes. Le cytoplasme de ces cellules se montre souvent dégranulé et vacuolisé (Figure 6b).

L'institution précoce de la Met semble avoir un effet bénéfique, sur les cellules médullaires. En effet, chez les animaux traités, la dégranulation des cellules de cette zone est partielle et la vacuolisation est moins marquée (Figure 6c).

DISCUSSION

Les rats des sables (*Psammomys obesus*) soumis au régime standard de laboratoire (T2), pendant 3 mois, développent, par rapport aux animaux soumis au régime naturel à base de plantes halophiles (T1), un désordre métabolique se traduisant par une obésité et une forte lipémie (19).

Le traitement par la NN-Dimethyl biguanide, administré précocement aux rats des sables nourris au régime hypercalorique (T2) pendant 3 mois, induit une légère régression pondérale. Cette chute de poids peut être due à l'effet anorexigène de la metformine ou à l'inhibition du transfert des triglycérides alimentaires, du tractus gastro-intestinal vers le plasma sanguin, réduisant de ce fait la captation de ces derniers par le tissu adipeux (20-21). D'autres travaux, ont montré que l'association de la

metformine avec d'autres drogues (rosiglitazone, thiazolidinedione...) provoque une diminution du poids corporel très significative chez les patients diabétiques obèses (22-23). Ces auteurs constatent, eux aussi, que la metformine associée à une autre drogue, comme le N-benzoyle-D-phénylalanine, normalise le poids corporel et améliore le métabolisme enzymatique des carbohydrates chez les nouveaux nés issus de rats rendus diabétiques (non-insulino dépendants) par la streptozotocine.

Le maintien de l'état euglycémique, chez les rats des sables soumis au régime standard de laboratoire (T2) et sous metformine, peut s'expliquer par une réduction de néoglucogénèse hépatique à partir du lactase et des aminoacides, point d'impact essentiel de l'action hypoglycémiant de cette drogue (24). La metformine améliore l'hyperglycémie en inhibant les gènes responsables de la production du glucose hépatique via l'activation de l'adénosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), enzyme sensible aux variations des niveaux d'énergie dans l'hépatocyte (4). Cette molécule, la metformine, agit par un mécanisme purement énergétique et modifie le fonctionnement des mitochondries des hépatocytes (25).

L'état euglycémique ne peut être dû à une hypersécrétion d'insuline, car il est largement admis que la metformine ne stimule pas l'insulino-sécrétion (6-26). La metformine par rapport aux autres drogues, comme les glipizides, les glibenclamides, les gliclazides..., réduit faiblement le taux d'insuline en agissant sur le transport du glucose transporteur type 1 (GLUT1) et maintient à l'état normal la glycémie plas-

matique (27). En outre l'activité à long terme de la metformine sur l'AMPK améliore la stéatose hépatique, voie qui déclencherait une meilleure sensibilité à l'insuline et empêcherait la production du glucose hépatique (28). Cela serait dû également à l'action de la metformine sur les inhibiteurs des α glucosidases et de l'aldose réductase intestinale, qui réduiraient et retarderaient l'absorption du glucose et par là même l'hyperglycémie postprandiale (4).

La lipémie chez les rats des sables traités par la metformine diminue de 39% pour les triglycérides et de 23 % pour le cholestérol. Chez des patients présentant ou non une dyslipémie, diabétiques ou non, on observe une baisse de 20 à 40% des triglycérides plasmatiques au bout d'une à deux semaines de traitement par la metformine (29) ainsi qu'un effet antiathérogène de la metformine chez les sujets diabétiques non insulino-dépendants (30).

Les glitazones, dérivés de la metformine et agonistes des récepteurs peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma), lorsqu'ils sont activés, forment des hétérodimères avec les récepteurs des rétinoïdes et modulent la transcription des gènes en acide ribonucléique messager (ARNm) puis traduction en protéines enzymatiques, ou glucose transporteur type 4 (Glut4), impliquées dans le métabolisme des acides gras notamment au niveau de l'adipocyte. Ainsi, il déduit que la diminution des triglycérides est liée principalement à la baisse des lipoprotéines de très basse densité (VLDL pour Very Low Density Lipoprotein) sans l'augmentation des lipoprotéine de basse densité (LDL pour Low Density Lipoprotein).

La metformine améliore également les modifications architecturales observées au niveau de la glande endocrine « la surrénale » hyperglycémiant par sa synthèse de cortisol et d'adrénaline. En effet, au vu de nos résultats morphométriques de la glande surrénale, nous remarquons une nette régression de la zone corticale et une légère expansion de la zone médullaire chez les rats des sables traités à la metformine par rapport aux animaux soumis au régime hypercalorique (T2). Des observations semblables ont été rapportées sur le rat de Zucker obèse et ont montré l'amélioration, sinon la normalisation de l'hypertrophie de la glande surrénale suite au traitement par la metformine (31).

L'ultrastructure de la glande surrénale, chez *Psammomys obesus*, soumis au régime standard de laboratoire (T2), manifeste des changements ultrastructuraux importants au niveau des deux zones corticale et médullaire, comparativement à l'animal soumis aux plantes halophiles (T1).

Les modifications ultrastructurales se caractérisent par une altération membranaire de certaines cellules, l'élargissement de l'espace intercellulaire, une dilatation du REL, une désintégration des crêtes mitochondriales, des dépôts lipidiques, des lysosomes, une importante vacuolisation des cellules corticales et une intense infiltration par du tissu conjonctif, tout particulièrement, de la zone réticulée. En effet, ces perturbations ultrastructurales des cellules endocrines de la glande surrénale chez le rat des sables soumis au stress nutritionnel (T2), peuvent s'expliquer par le fait qu'elles soient constamment stimulées, donc hyperactivées, jusqu'à altération et rupture

des membranes de certains organites de ces cellules.

L'administration précoce de la metformine chez les rats des sables soumis au régime standard de laboratoire (T2), semble rétablir l'état structural défectueux de la glande. En effet, cette molécule s'oppose aux altérations endocrines observées et manifeste un effet protecteur sur la glande surrénale (corticale et médullaire). La metformine agit également au niveau des vacuolisations des zones fasciculée et réticulée, en les réduisant et en diminuant la taille des grains de lipofuschine.

La zone médullaire des animaux obèses montre des cellules complètement dégranulées, avec un REG fortement dilaté, des mitochondries désintégrées, des lysosomes et une importante vacuolisation. L'institution précoce de la metformine chez les animaux diabétiques, semble également agir efficacement sur la zone médullaire. En effet, la dégranulation des cellules tend à diminuer et devient partielle. La vacuolisation, elle aussi, devient moins importante.

CONCLUSION

L'administration d'un régime standard de laboratoire (T2) chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) provoque des perturbations métaboliques et conjointement des

modifications structurales au niveau de la glande surrénale qui se manifeste par :

- une importante vacuolisation des zones glomérulée, fasciculée et réticulée,
- une forte dégranulation de la zone médullaire.

L'importante vacuolisation de la zone glomérulée serait la conséquence d'un stress nutritionnel qui induirait un changement fonctionnel. En effet, cette morphologie révèle d'importantes invasions de la zone glomérulée par les cellules de la zone fasciculée, offrant un réarrangement anatomique efficace pour un fonctionnement paracrine. La régulation de la signalisation intracellulaire est très dépendante de l'environnement cellulaire. Les interactions intercellulaires impliquent le cytoplasme, les seconds messagers et plusieurs protéines dont l'association très sélective est responsable de l'orientation de la cellule vers une sécrétion de survie.

L'institution précoce de la metformine chez le rat des sables soumis au régime standard de laboratoire (T2), corrige les désordres métaboliques, améliore et protège l'aspect ultrastructural des cellules surrénaliennes, sans toutefois retrouver l'état normal observé chez l'animal soumis au régime naturel à base de plante halophile (T1).

BIBLIOGRAPHIE

1. WATANABE C.K.: *J. Biol. Chem.*, 1918, 33, 253-265
2. STERNE J., DUVAL D.: Hypoglycemic effects of N-N-dimethylbiguanide. *3rd IDF Congress, Dusseldorf, Germany*, 1958, 443-452.
3. ZHOU G., MYERS R., LI Y., CHEN Y., SHEN X., FENYK-MELODY J., WU M., VENTRE J., DOEBBER T., FUJII N., MUSI N., HIRSHMAN M.F., GOODYEAR L.J., MOLLER D.E. : Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.*, 2001,108(8), 1167-74.
4. ALLAIN P.- Hypoglycémiantes, Autres médicaments ; in Pharmacorama : extrait de « les médicaments », 3^e éd., 2008.
5. NATHAN D.M., BUSE J.B., DAVIDSON M.B., HEINE R.J., HOLMAN R.R., SHERWIN R., ZINMAN B. : Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*, 2006, 29(8), 1963-1972.
6. CONSOLI A., GOMIS R., HALIMI S., HOME P.D., MEHNERT H., STROJEK K., VAN GAAL L.F.: Initiating oral glucose-lowering therapy with metformin in type 2 diabetic patients: an evidence-based strategy to reduce the burden of late developing diabetes complications. *Diabetes metab.*, 2004, 30, 509-516.
7. JACOBS D.B., HAYES G.R., TRUGLIA J.A., LOCKWOOD D.H.: Effects of metformin on insulin receptor tyrosine kinase activity in rat adipocytes. *Diabetologia*, 1986, 29(11), 798-801.
8. KAISER N., NESHER R., DONATH M.Y., FRAENKEL M., BEHAR V., MAGNAN C., KTORZA A., CERASI E., LEIBOWITZ G. : *Psammomys obesus*, a model for environment-gene interactions in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005 ; 54 (2), 137-44.
9. AMIRAT Z., KHAMMAR F., BRUDIEUX R.:Variations pondérales saisonnières de l'appareil reproducteur de la surrénale et du rein chez le rat des sables (*Psammomys obesus*) du Sahara occidental algérien. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord*, Alger, 1975,66, 31-60.
10. KHAMMAR F. - Variations saisonnières de la fonction glucocorticoïde de la surrénale en rapport avec l'activité sexuelle chez le rats des sables (*Psammomys obesus*), Thèse de 3^e cycle, ISN – USTHB, Alger, 1977.

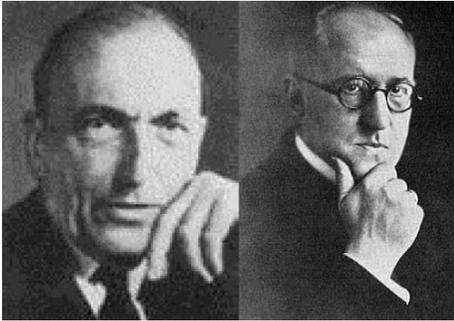
11. AMIRAT Z., KHAMMAR F., BRU-DIEUX R. : Variations saisonnières comparées de l'activité sexuelle (données pondérales) chez deux espèces de rongeurs *Psammomys obesus* et *Gerbillus gerbillus* du Sahara occidental algérien. *Mammalia*, 1977,41, 341-356.
12. PRANGE H.D., SCHMIDT-NIELSEN K., HACKEL D.B. : Care and breeding of the fat sand rat (*Psammomys obesus*). *Lab. Animal care*, 1968, 18(2), 170-181.
13. BALEYDIER C., LEGER L., QUOEX C.: Quelques modification apportées à la technique de perfusion pour la fixation du système nerveux central du chat en microscopie électronique, *J. Microscopie*, 1973,17, 233–240.
14. WATSON M. L.: Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 727.
15. REYNOLDS E.S.: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1963, 17, 208-212.
16. TRINDER P.: Determination of glucose in blood using glucose oxydase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Brioche*. 1969,6, 24-27.
17. FOSSATI P., PRENCIPE L.: Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin. Chem.*, 1982, 28(10), 2077-80.
18. SIEDEL J., SCHLUMBERGER H., KLOSE S., ZIEGENHORN J., WAHLEFELD A.W.: Improved reagent for the enzymatic determination of serum cholesterol. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1981,19, 838-839.
19. MARQUIE G., DUFOUR P., SEMMAR S., MICHONDET C., KOCEIR E.H.A., HAMED-BEY D., BOUGUERRA S., MESSAOUDI S.: Diabète sucré chez le rat des sables (*Psammomys obesus*). I- Evolution métabolique du syndrome diabétique. *Bull. Soc. Hist. Nat. Afr. Nord* (Alger), 1982, 4, 65-78.
20. GARDINER S.J., BEGG E.J., KIRKPATRICK C.M., BUCKHAM R.B.: Metformin therapy and diabetes in pregnancy. *Med. J. Aust.*, 2004, 180(9), 462-464.
21. GOLAY A.: Metformin and body weight. *Int. J. Obesity*, 2007, 32, 61-72.
22. HELLER S.: Diabetes research and clinical practice. - Elsevier, Supplement, 2004, 65, S23-S27.

23. PARI L., ASHOKKUMAR N. : Changements des glycoprotéines chez des rats diabétiques non-insulino dépendants : effet de la N-benzoyl-D-phénylalanine et de la metformine. *Thérapie, Pharm.*, 2005,61(2), 125 – 131.
24. LALAU J.-D.- www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/medecine/mte/sommaire.phtml?cle_parution=434&type=text.html"Médecine Thérapeutique Endocrinologie & Reproduction. Revue traitement du diabète de type 2, 2000, Volume 2, Numéro 3, 190-197.
25. FORETZ M., VIOLLET B. : Mécanisme d'inhibition de la production hépatique de glucose par la metformine : un nouveau concept pour un ancien remède. *Médecine/Sciences*. 2010, 26(6-7), 663-666.
26. BOLEN S., FELDMAN L., VASSY J., WILSON L., H-C. YEH, MARINOPOULOS S., WILEY C., SELVIN E., WILSON R., BASS E. B., BRANCATI F.L. : Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, 2007, 147(6), 386-399.
27. HOLMAN R.R.: Metformin as First Choice in oral Diabetes Treatment: the experience UKPDS. *Journ. Annu. Diabetol.*, 2007, 13, 13-20.
28. MILLER R.A., BIRNBAUM M.J.: An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(7), 2267-70.
29. ISNARD F., ANDRÉ P., IBAGNEZ A., WIERNSPERGER N.: Action of metformin on vascular risk factors in diabetes Jour. *Annu. Diabetol.* Hôtel-Dieu. 1988, 349-362.
30. WULFFELE M.G., KOOY A., ZEEUW D., STEHOUWER C.D.A. GANSEVOORT R.T.: The effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic review. *J. Inter. Med.*, 2004, 256, 1-14.
31. LIVINGSTONE D.E., KENYON C.J., WALKER B.R.: Mechanisms of dysregulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obese Zucker rats. *Journal of endocrinology.*, 2000, 167(3), 533-539.

LES ENCEPHALOPATHIES SPONGIFORMES HUMAINES : CREUTZFELDT, JAKOB ET LES AUTRES...

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

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



Creutzfeldt et Jakob

Hans-Gerhard CREUTZFELDT (1885-1964) acquiert une formation de neuropathologie à Breslau (Pologne) dans le service dirigé par le célèbre Alois Alzheimer. Il examine le cas d'une jeune femme et consigne ses observations, en allemand, dans un article publié en 1920 dans une revue de neurologie et de psychiatrie, intitulé « A propos d'une singulière atteinte du système nerveux central, avec formation de foyers de dégénérescence ». Par la suite, il ne publiera rien d'autre sur le sujet. Mort en 1964 à peu près

inconnu, cet article unique fera pourtant sa gloire posthume. **Alfons Maria JAKOB** (1884-1931), comme Creutzfeldt, se spécialise en neuropsychiatrie après ses études de médecine et bénéficie des avis expérimentés de Alois Alzheimer. Dans 3 articles publiés en 1921 et 1923, Jakob décrit plusieurs cas humains sous le titre général « Sur une maladie singulière du système nerveux central, avec des observations inhabituelles au plan anatomique ». Jakob note la ressemblance entre ses cas et celui décrit par Creutzfeldt. Cependant c'est un autre neurologue allemand, W. Spielmeyer qui fait référence dès 1922 à la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Par la suite, les travaux sur ces cas ne vont quasiment plus évoluer pendant une quarantaine d'année. En effet, Jakob, nommé professeur de neurologie en 1924 sera un chercheur de renommée internationale mais sur d'autres maladies comme la sclérose en plaques ou l'ataxie de Friedreich et mourra prématurément en 1931.



Gajdusek

Il fallut attendre les années 1960 pour qu'un nouveau regard soit porté sur les encéphalopathies spongiformes humaines, avec le travail fondateur de **Daniel Carleton GAJDUSEK** (1923-2008). Ce médecin pédiatre américain rejoint un jeune médecin allemand Vincent Zigas qui séjournait en Nouvelle-Guinée depuis 1950. Au cours de sa mission médicale et sanitaire visant à aider les populations locales, Gajdusek avait identifié une maladie étrange qui affectait un groupe ethnique, les Forés. . L'arrivée de Gajdusek en 1957 sera décisive, en une année le travail effectué est énorme, un « laboratoire » est monté sur place, des prélèvements sont effectués et envoyés pour analyses en Australie et aux Etats Unis. A la fin de l'année, les résultats histopathologiques révèlent une dégénérescence généralisée du cerveau, avec la présence de « plaques », sortes de « tâches » inhabituelles particulièrement fréquentes dans le cervelet. La structure de ces plaques est décrite pour la première fois comme étant constituée de fibres organisées en rayon autour d'une zone centrale sombre. Ces plaques sont différentes des plaques « séniles » décrites dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Elles se rapprochaient plus de celles décrites dans un unique cas de maladie de Creutzfeldt-Jakob avec la différence de n'être pas localisées dans le cervelet. Gajdusek s'empresse de publier plusieurs articles dès la fin de 1957 dans lesquels il rapporte tous les détails,

tableau clinique, histopathologie, éléments épidémiologique... Les efforts de Gajdusek vont se poursuivre par des expériences d'essai de transmission de la maladie, afin de pouvoir caractériser une origine potentiellement infectieuse de la maladie. Il est à l'origine de la dénomination d'encéphalopathie spongiforme subaiguë, complété plus tard par le qualificatif de transmissible. Ainsi, Gajdusek a accompli une avancée scientifique majeure en démontrant que le kuru, le nom de cette ESST identifiée en Papouasie-Nouvelle Guinée, comme pour la maladie de Creutzfeldt Jakob, était dus à un agent infectieux. Ceci lui valut l'attribution du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1976. Plus récemment, le travail de Gajdusek sur le kuru a servi de modèle pour comprendre le développement des cas de variant de la maladie de Creutzfeldt Jakob (vMCJ), la voie alimentaire étant la voie de contamination identifiée pour ces deux pathologies.



Prusiner

Celui qui occasionnera un nouveau bond dans les connaissances dans le domaine des ESST est **Stanley Ben PRUSINER** (1942). Au début des années 1980, les méthodologies et les techniques d'analyses et notamment de purifications avaient fait l'objets de progrès majeurs. Bénéficiant de ces progrès, ce médecin neurologue et biochimiste américain publia une avalanche de données visant à « démasquer » l'agent infectieux responsable de ces maladies, et

plus particulièrement « sa nature » et l'affaire n'était pas mince ! En effet en 1982, il publie l'hypothèse selon laquelle l'agent infectieux est une protéine. En purifiant des extraits de cerveaux de hamsters infectés par des cas de tremblante, il put mettre en évidence les caractéristiques de ces « virus » de nature protéique, ne contenant aucune trace d'acide nucléique : résistance à la chaleur, résistance à l'action des désoxyribonucléases et ribonucléases, (censées détruire les acides nucléiques), résistance à l'urée, qui dénature les protéines. Pour désigner ces agents infectieux particuliers, il introduit alors le terme de prion pour proteinaceous infectious particle qui désigne ainsi une protéine infectieuse. Grâce à ces mêmes extraits, la protéine a été séquencée, permettant la réalisation de sondes nucléiques dans le but de marquer le gène codant pour la protéine prion. Les résultats ont alors révélé

que le gène était présent chez les individus atteints et non atteint ; la protéine prion est donc une protéine physiologique cellulaire. La forme pathologique se distingue de la forme normale uniquement sur sa conformation, plus riches en feuillet béta, elle possède des propriétés d'agrégabilité et d'insolubilité à l'origine de sa résistance à de nombreux facteurs dont la digestion enzymatique. Prusiner fut très controversé à ses débuts, car ses hypothèses allaient à l'encontre de toutes les idées établies à savoir que les agents infectieux étaient nécessairement porteurs d'acide ribonucléique comme pour tous les virus, bactéries ou parasites. Ces recherches expérimentales basées sur l'étude de la tremblante ont bien entendu été étendues à la maladie de Creutzfeldt Jakob. Tous ses travaux ont été récompensés, en 1997, par l'attribution du Prix Nobel de physiologie et de médecine.

LE PET-BLOT EPITOPIQUE DANS L'ETUDE DES MALADIES À PRIONS : MISE EN EVIDENCE DE DIFFERENTS FRAGMENTS DE PROTEINE PRION PATHOLOGIQUE (PRPRES) *IN SITU*

Marion CHETAİL et Anna BENCSIK*

* anna.bencsik@anses.fr

Unité Maladies Neurodégénératives (MND)

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

RESUME

L'étude des souches d'agents infectieux responsables des maladies à prions telles que l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), la tremblante du mouton ou la maladie de Creutzfeldt Jakob (MCJ), repose sur la transmission de la maladie à des modèles murins. Plusieurs paramètres permettent d'identifier ces souches, particulièrement l'analyse de l'intensité des lésions de spongiose, la distribution cérébrale et le type de dépôts de protéine prion pathologique détectés dans le cerveau des souris malades par immunohistochimie ou Western blot. Les développements les plus récents reposent également sur des distinctions moléculaires, obtenues usuellement par des méthodes biochimiques. Notamment sont pris en compte des critères de

taille des fragments de protéine prion résistante à une digestion enzymatique (PrPres) mais aussi la présence de fragments additionnels de PrPres. Nous avons introduit et développé une méthode originale et sensible, le Paraffin Embedded Tissue Blot (PET-Blot), qui permet d'aborder cet aspect moléculaire sur des coupes histologiques. En effet, cette méthode permet non seulement de visualiser la cartographie cérébrale des sites d'accumulation de la PrPres mais aussi potentiellement de mettre en évidence des fragments de protéines prion PrPres de tailles différentes. Nous présentons ici le principe et l'application de cette approche à l'étude des souches de tremblante sur des cerveaux des souris de la lignée transgénique TgOvPrP4.

INTRODUCTION

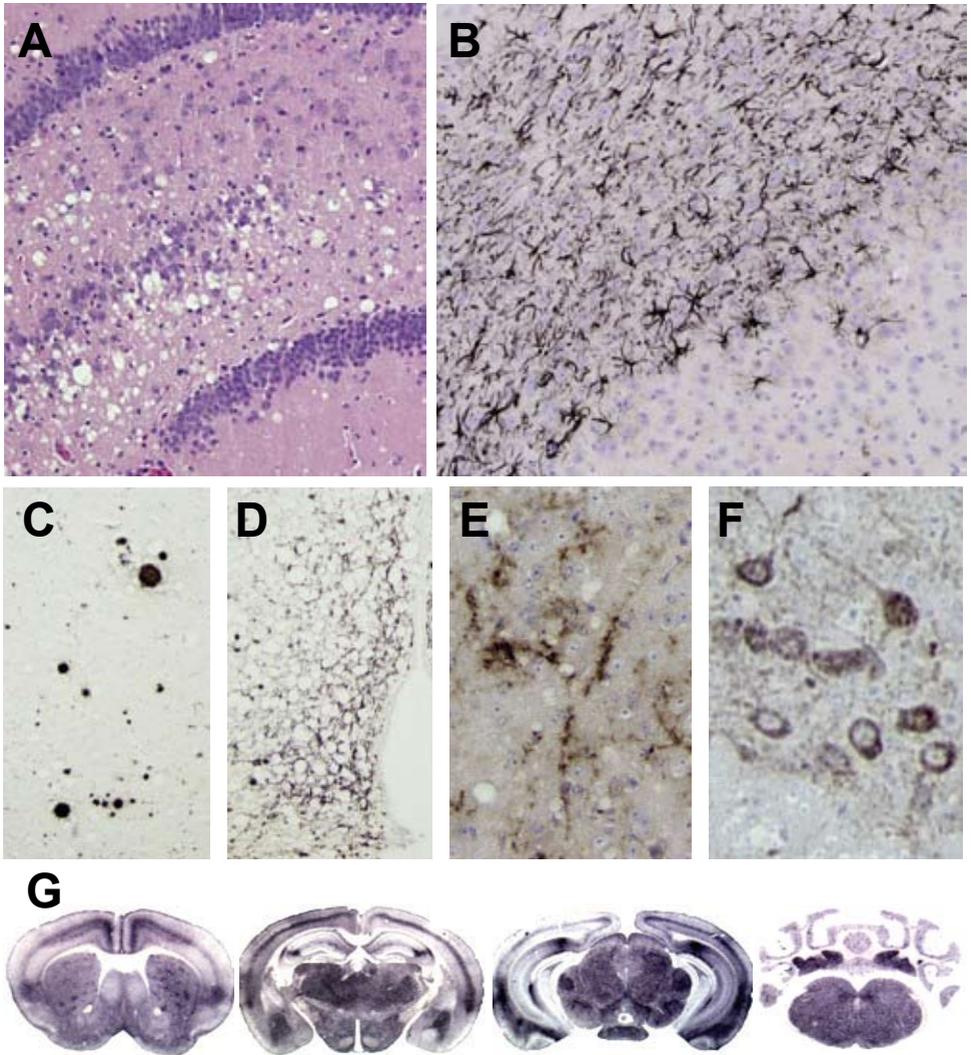
Les Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST) ou maladies à prions sont des maladies neurodégénératives rares (prévalence de 1/1 000 000 en France pour la maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ)), dont l'issue est toujours fatale. Elles affectent aussi bien l'Homme (MCJ, Kuru, Insomnie Fatale Familiale, syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker), que les animaux (tremblante des petits ruminants, encéphalopathie spongiforme bovine (ESB), maladie du dépérissement chronique des cervidés d'Amérique du Nord). Ces pathologies sont caractérisées par une longue période d'incubation (plusieurs années voire plusieurs dizaines d'années). La nature exacte de l'agent infectieux responsable n'est pas encore totalement déterminée, mais les ESST sont toujours associées à la présence d'une protéine physiologique de conformation anormale : la protéine prion pathologique (PrP^{sc}, sc pour *scrapie*, tremblante en anglais) représente tout ou partie de l'agent infectieux.

Sur le plan histologique, les ESST sont caractérisées par une vacuolisation du tissu cérébral, une prolifération d'astrocytes (Figures 1 A&B), une accumulation de PrP^{sc} (Figures 1 C-F) et parfois une mort neuronale. Cette protéine qui s'accumule majoritairement dans le système nerveux central (SNC) représente donc, à ce jour, le marqueur le plus spécifique pour identifier ces pathologies. De façon remarquable, l'étude de la protéine prion pathologique a pris une importance considérable car elle permet également d'appréhender la notion de souche, c'est à dire de distinguer diffé-

rentes familles de prions qui peuvent exister au sein d'une même espèce.

Les années 90 sont associées à une crise sanitaire liée à une recrudescence de cas de maladies à prions. La découverte des 1^{er} cas d'ESB et l'apparition quasi conjointe (10 ans plus tard) d'une nouvelle forme de MCJ, ont suscité des recherches visant à étudier leurs origines respectives. Les expérimentations de transmission à la souris ont permis de conclure à l'identité unique de la souche d'agent infectieux responsable de ces 2 formes de maladies (2). Le caractère transmissible à l'Homme ayant été démontré, il a été primordial et indispensable d'étudier plus systématiquement les souches responsables de ces pathologies.

Dans ce contexte, au laboratoire de Lyon, l'étude et la caractérisation des souches responsables des maladies à prions animales sont au cœur des travaux depuis bientôt 20 ans. La caractérisation des souches se fait essentiellement par des études de transmission à la souris de lignées sauvage ou transgénique. Différents critères sont étudiés : les signes cliniques, la période d'incubation de la maladie (délais entre la date d'inoculation et la date d'euthanasie), le profil lésionnel qui résume la distribution et l'intensité des lésions de vacuolisation dans des sites neuro-anatomiques de référence (3). Le profil lésionnel caractérise une souche donnée dans une lignée de souris donnée. La distribution cérébrale et la nature des dépôts de la PrP pathologique, établies par immunohistochimie, sont également d'autres paramètres étudiés (Figures 1C-F). Plus récemment, l'introduction de la méthode du Paraffin Embedded Tissue-Blot (PET-Blot), permettant de vi-



Figures 1 : A. Illustration de lésions de vacuolisation dans l'hippocampe d'une souris infectée par une souche de tremblante. H&E. B. Le plus souvent une gliose réactionnelle accompagne les lésions de vacuolisation, elle est visualisée par immunohistochimie de la GFAP. C. Dépôts en amas amyloïdes de PrP pathologiques. D. Dépôts de PrP pathologiques en grains fins dans le parenchyme cérébral. E. Dépôts de PrP pathologiques le long de prolongements nerveux. F. Dépôts intra-cytoplasmiques de PrP pathologiques dans le corps cellulaire et les prolongements de neurones. G. Résultat d'analyses par PET-Blot de la distribution cérébrale de PrPres (dépôts foncés) dans le cerveau de souris infectées.

sualiser *in situ* la protéine prion pathologique sous sa forme résistante à la digestion enzymatique (PrPres) (Figure 1G) a représenté une avancée remarquable et constitue un outil complémentaire de choix dans ces études (4). Ces dernières années, la multiplication des analyses biochimiques a permis de révéler des moyens de distinguer, de façon plus fine encore, les diverses souches d'agents prions, révélant notamment l'existence de fragments de PrPres de tailles différentes, parfois des fragments additionnels propres à certaines souches (5). Dans ce contexte scientifique et technique, il est apparu pertinent de voir s'il était possible de mettre en évidence cette diversité moléculaire *in situ*, en développant une approche nouvelle de « PET-Blot épitopique », c'est-à-dire en introduisant l'utilisation d'une large gamme d'anticorps reconnaissant différents épitopes de la protéine prion. Ainsi, il devrait être possible de mettre en évidence non seulement la distribution de la PrPres dans le cerveau des souris malades mais aussi de visualiser des fragments de PrPres de taille différente en fonction des souches étudiées. Le présent article repose sur les acquis d'un précédent travail publié dans la revue de l'AFH (6), dans lequel deux anticorps avaient été utilisés pour caractériser des souches de tremblante transmises à un modèle de souris transgéniques « ovinisées ». Dans la présente étude, le principe de l'approche est décrit et nous démontrons qu'il est possible de visualiser distinctement des populations de fragments de PrPres de tailles différentes, contribuant ainsi à la caractérisation moléculaire des souches sur la base d'études histologiques.

MATERIEL ET METHODES

Animaux et agents infectieux

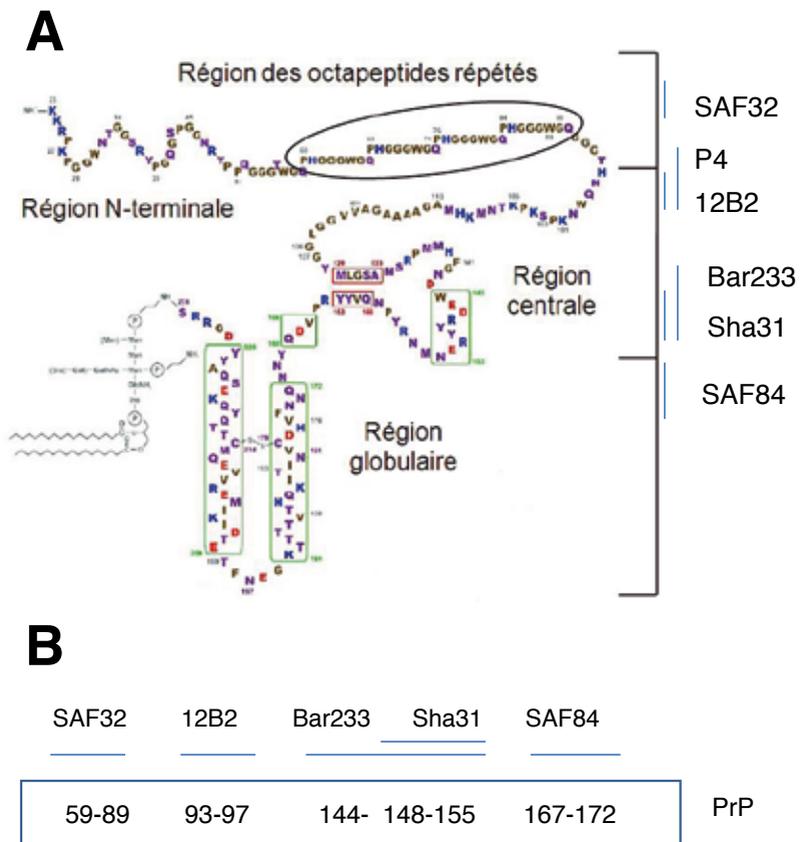
Plusieurs souches de tremblante (C506M3, 87V, 79A, 22A, Chandler) ou isolats de tremblante provenant directement de moutons malades (CH1641 et CH1641 « like ») sont injectés par voie intracérébrale (IC) à des souris transgéniques, TgOvPrP4, âgées d'environ 4 semaines exprimant uniquement la protéine prion ovine (7). Les souris sont issues de l'activité d'élevage de la plateforme d'expérimentations animales de l'Anses de Lyon. Au stade final de la maladie (1 à 2 ans après inoculation), les cerveaux sont prélevés et fixés dans une solution tamponnée de formol 10%, pendant au moins 48h. Toutes ces expériences sont menées en conformité avec le Comité d'Ethique Régional (CREEA n°98), le Comité d'Ethique Français (décret 87-848) et la Directive Européenne 86/609/EEC. Dans le but de valider nos résultats, des cerveaux de moutons (région de l'obex), atteints de tremblante, sont utilisés comme témoins positifs et les individus sains, comme témoins négatifs. De même, des souris TgOvPrP4 non inoculées (saines) ainsi que des souris KO pour le gène de la protéine prion (PrP) murine sont utilisées comme témoins négatifs. Pour la caractérisation de ces diverses souches de tremblante, plusieurs anticorps anti-prion reconnaissant différents épitopes de la protéine prion sont utilisés (Tableau 1 et Figure 2).

Préparation des membranes

Les cerveaux fixés sont recoupés macroscopiquement en cinq sections coronales standardisées, à l'aide d'une matrice en acrylique, afin d'assurer le caractère repro-

Anticorps primaires, <i>fournisseur</i>	Séquence peptidique ovine reconnue
SAF32, <i>SPI bio</i>	59-89
12B2, <i>offert par Jan Langeveldt</i> <i>Central Vet. Institute Wageningen, Pays Bas</i>	93-97
Bar233, <i>offert par Jacques Grassi CEA, France</i>	144-155
Sha31, <i>Bertin Pharma</i>	148-155
SAF84, <i>SPI bio</i>	167-172

Tableau 1 : Liste des différents anticorps monoclonaux produits chez la souris utilisés dans le cadre du PET-Blot épitopique.



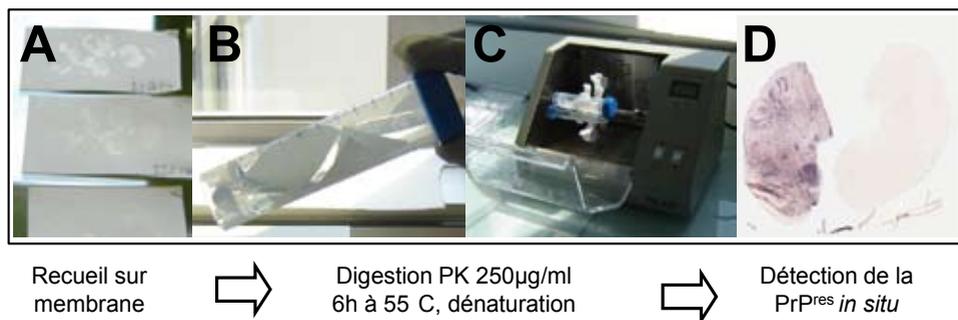
Figures 2 : Représentation schématique de la protéine prion humaine. Les séquences peptidiques reconnues par les différents anticorps sont représentées sur le schéma (A) ou selon une représentation linéaire (B).

ductible des coupes frontales. Puis, sous une hotte chimique, les prélèvements sont plongés dans un bain d'acide formique à 99% pendant 1h à température ambiante (TA), afin d'inactiver le pouvoir infectieux de l'agent prion. Les cerveaux sont ensuite inclus en paraffine à l'aide d'un automate (Excelsior, *Thermo Electron*). A partir de ces blocs, des coupes de paraffine de 5 µm d'épaisseur sont directement récupérées sur des membranes de nitrocellulose en vue d'effectuer des analyses par PET-Blot. Elles sèchent 1h à l'étuve, à 55°C, afin de favoriser l'adhésion des coupes de tissu à la membrane. Dans ces conditions, elles peuvent être conservées à plat, à l'abri de la lumière et de la poussière jusqu'à leur utilisation, et même pendant plusieurs années.

Paraffin Embedded Tissue-Blot (PET-Blot)

Les membranes sont d'abord déparaffinées à l'aide de bains de Clearify, substituant non toxique et inodore du xylène,

préchauffé à 40°C, à raison de 2 bains de 10 min, suivi de 2 bains de 10 min d'isopropanol 100°. Les membranes sèchent ensuite à plat pendant une nuit à TA (Figure 3A). Les membranes à analyser sont réhydratées avec du TBST tiède (Tampon Tris salin + Tween : 10mM Tris-HCl, pH 7.8, 100mM NaCl ; 0.05% Tween 20) pendant 10 min. Par la suite, toutes les étapes se déroulent dans des tubes, dans un four à hybridation à rotation, selon le protocole déjà décrit dans un précédent article publié dans la revue de l'AFH (6) (Figures 3 B&C). Une première étape consiste à effectuer une digestion enzymatique afin d'éliminer toutes les protéines sensibles à la protéinase K (PK) comme la PrPc. La PK est utilisée à une concentration de 250µg/ml, pendant 6h, à 55°C, en présence d'un tampon (TBST + 0.1% de polyoxyéthylenglycol dodecyl ether (Brij 35)). Dans ces conditions, seuls les fragments de PrP résistants à cette digestion enzymatique subsistent c'est-à-dire la PrPres. Après rinçage au TBST, la PrPres est dénaturée



Figures 3 : Principales étapes du Pet-Blot A. Recueil des coupes sur membranes de nitro-cellulose, B. Déparaffinage en tube, C. Digestion enzymatique, dénaturation et détection immunochimique à l'aide d'un four à hybridation, D. La présence de PrPres est révélée in situ par le dépôt de chromogènes (NBT-BCIP) de couleur bleu foncé.

à l'aide d'une solution de thiocyanate de guanidium 3M, pendant 10 min à TA, permettant de démasquer certains sites antigéniques. Plusieurs rinçages sont effectués avant d'ajouter l'anticorps primaire, dilué dans la solution de blocage (TBST + lait en poudre 0.2%) laissé en contact pendant une nuit à TA. L'anticorps secondaire (1/500) couplé à la phosphatase alcaline est ensuite mis en contact des membranes pendant 1h à 37°C, après avoir effectué au préalable des lavages au TBST. Les membranes, rincées à TA, sont ensuite plongées dans du Tris amino, NaCl 5M, MgCl₂ 1M, (NTM) tampon alcalin (pH 9,5), à raison de 2 bains de 5 min, afin d'être dans des conditions de pH optimales pour la phosphatase alcaline. Pour terminer, la révélation se fait à l'aide de Nitrobleu tetrazolium/5-bromo 4-chloro 3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) (*Kit Vector Laboratories*) : substrat de la phosphatase alcaline, pendant 20-30 min. Les dépôts spécifiques sont de couleurs bleue/noire (Figure 3 D). Afin d'arrêter la révélation, les membranes sont plongées dans de l'eau ultra-pure. Une fois sèches, elles sont mises sous plaques de verre pour permettre la capture d'image réalisée à l'aide d'un stéréomicroscope (Olympus) couplé à une station d'analyse d'images (logiciel Explora Nova Mosaïc).

RESULTATS ET DISCUSSION

Le développement du PET-Blot épitopique initié récemment dans le laboratoire a pour but de contribuer à l'étude de la caractérisation des souches des agents infectieux responsables des maladies à prions (6, 8). L'introduction de nouveaux anticorps reconnaissant différents épito-

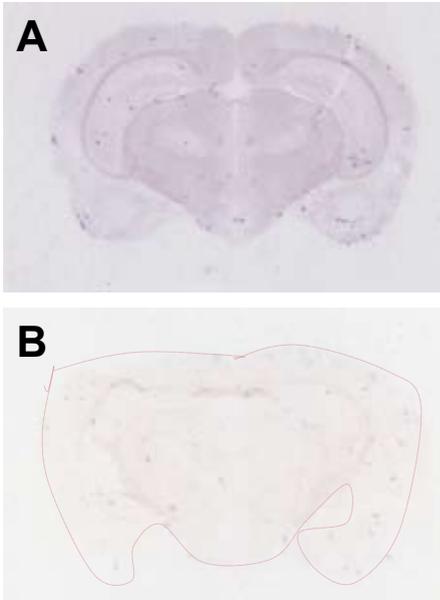
pes de la protéine prion devrait permettre de mettre en évidence des fragments de PrPres de tailles différentes. En effet, des études biochimiques antérieures ont pu démontré l'existence d'une plus ou moins grande sensibilité des souches à une digestion enzymatique à l'aide de protéinase K, se traduisant par l'existence de bandes de Western blot de tailles différentes en fonction des souches (5).

Le premier objectif de ce travail a été d'établir une liste « utile » d'anticorps dirigés contre des régions différentes de la protéine prion et déterminer les conditions optimales de leur application dans le protocole du PET-Blot. Les sites reconnus par les différents anticorps sont schématisés dans les figures 2.

Validations et contrôles

Les contrôles et les validations du PET-Blot épitopique ont fait l'objet du travail précédemment rapporté dans la revue de l'AFH. Ces contrôles sont nécessaires pour valider tout résultat obtenu. Les cerveaux de souris KO, dépourvues du gène *prnp* codant pour la PrP, servent de témoin négatif. Grâce à ce modèle, il est impossible d'observer de la PrP qu'elle soit cellulaire ou pathologique. Si un marquage est visible, celui-ci n'est pas spécifique (Figure 4A). Les cerveaux de souris TgOvPrP4 saines, non inoculées servent également de témoin négatif. L'absence de signal montre la spécificité de mise en évidence de la PrPres (Figure 4B).

Des cerveaux d'ovins atteints et non atteints de tremblante ont également servi de témoins positif et négatif lors des analyses en PET-Blot pour valider le bon déroule-



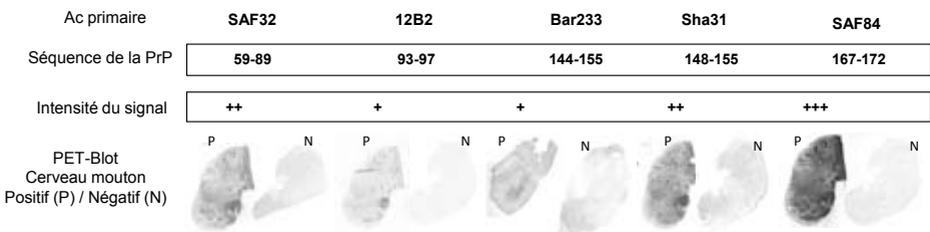
Figures 4 : Vérifications de la spécificité de la distribution cérébrale de PrPres par l'analyse de cerveaux contrôles. A. cerveau de souris KO et B. cerveau de souris TgOvPrP4 saine. Aucun dépôt n'est détecté après analyse par PET-Blot (SAF84 1/1000).

ment du protocole (contrôle interne) et permettre de détecter toute anomalie, comme par exemple un problème de réactifs défectueux. Ces cerveaux témoins nous ont également permis de vérifier si les anticorps anti-prion habituellement utilisés

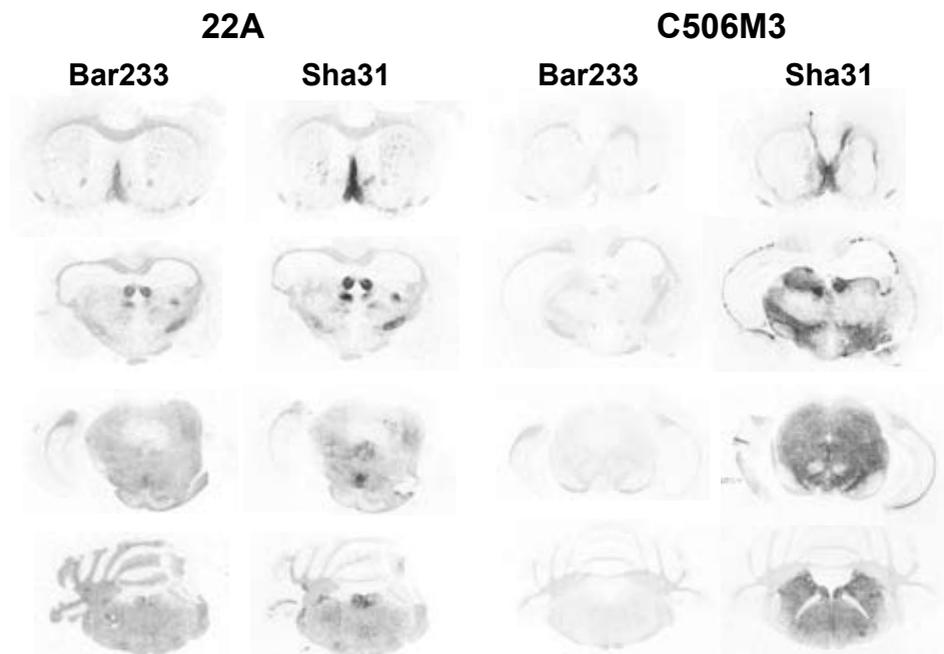
en Western blot sur le tissu cérébral ovin étaient aussi adaptés à un usage en PET-Blot, comme l'illustre les figures 5.

Dans le cadre de l'optimisation de l'approche, deux anticorps secondaires ont été testés pour chaque anticorps primaire. En dépit de cela, l'anticorps anti-prion Bar233 n'a pas donné de résultats sensibles et reproductibles. Cette interprétation a pu être faite par comparaison des données obtenues à l'aide de l'anticorps Sha31 (9) qui reconnaît quasiment la même séquence peptidique (respectivement 144-155 et 148-155) : or les résultats obtenus pour une même souche n'ont pas toujours été comparables, comme illustré avec les souches 22A et C506M3 (Figures 6). Au-delà d'une utilisation en PET-Blot, cette constatation rejoint des observations similaires faites dans le cadre d'une application en Western blot. Les résultats obtenus avec Bar233 ont donc été écartés de l'interprétation de la caractérisation des souches.

L'introduction de l'anticorps 12B2 nous a permis de revenir sur des données acquises à l'aide de l'anticorps P4 reconnaissant quasiment la même séquence (93-99 contre 93-97 pour 12B2), rapportées dans notre précédent article publié dans la revue de l'AFH (6). D'une façon générale, l'anti-



Figures 5 : Résultats d'analyse en PET-Blot de cerveaux de moutons sains (N) et atteints (P) de tremblante à l'aide des différents anticorps anti-prion.



Figures 6 : Analyses par PET Blot des souches 22A et C506M3 illustrant l'irrégularité des résultats obtenus à l'aide de l'anticorps Bar233 comparativement à Sha31 qui reconnaît une séquence peptidique équivalente.

corps 12B2 semble permettre une meilleure détection que P4, cependant 12B2 révèle des taux de marquage de la PrPres qui restent faibles comparativement aux autres anticorps, en particulier SAF84.

L'anticorps Sha31 apparaît être le plus sensible si l'on considère le taux de dilution appliqué (le plus important, 1/3000 comparativement aux autres anticorps primaires utilisés à 1/1000). Cependant en fonction des souches, l'intensité des marquages varie fortement. Une explication possible de cette observation pourrait se trouver dans le démasquage antigénique qui pourrait ne pas être adapté pour certaines souches. En effet, la conformation tri-dimensionnelle n'est pas identique d'une

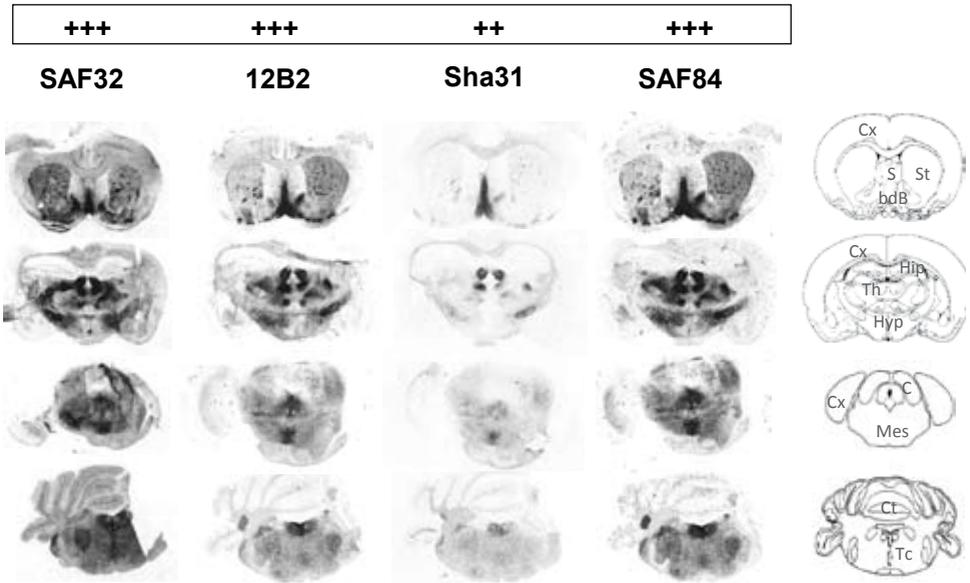
souche à l'autre et en conséquence ceci pourrait influencer sur l'accessibilité du site antigénique reconnu par Sha31. L'étude de l'effet de la concentration de thiocyanate de guanidium par exemple pourrait confirmer ou non cette hypothèse. Les anticorps SAF32 et SAF84, utilisés tous deux à la dilution 1/1000, ont également une très bonne sensibilité. De façon remarquable, leur distribution neuro-anatomique est le plus souvent comparable. La très bonne intensité de signal obtenu à l'aide de l'anticorps SAF32 résulte vraisemblablement de la possibilité que l'anticorps puisse se fixer sur chacune des répétitions de l'octapeptide (Figures 2).

Applications à l'étude des souches

En dehors de l'anticorps Bar233 et même si l'application de l'anticorps Sha31 pourrait nécessiter des tests additionnels, nous avons appliqués la démarche d'un PET-Blot épitopique à l'aide des protocoles validés aux souches transmises au modèle de souris TgOvPrP4. Nous avons pu ainsi identifier des différences entre souches. A titre d'exemple nous illustrons ci-après les résultats obtenus pour la souche 22A comparativement à la souche « CH1641-like ». Pour chacune de ces souches les résultats d'analyses sont illustrés de la même façon : en haut une barre horizontale schématise

les épitopes de la protéine prion détectés par les différents anticorps et une intensité de signal est indiquée selon le code suivant : - négatif, + : faiblement positif, ++ : positif, +++ : fortement positif. En dessous, issus directement des membranes de PET-Blot, sont présentés quatre niveaux de coupes de cerveaux de souris disposés verticalement orientés du haut vers le bas suivant un axe antéro-postérieur. A droite une représentation schématique permet de situer quelques repères neuro-anatomiques clés. Ainsi pour la souche 22 A (Figure 7), quel que soit l'anticorps utilisé, les régions marquées sont identiques même si l'inten-

Souche 22A

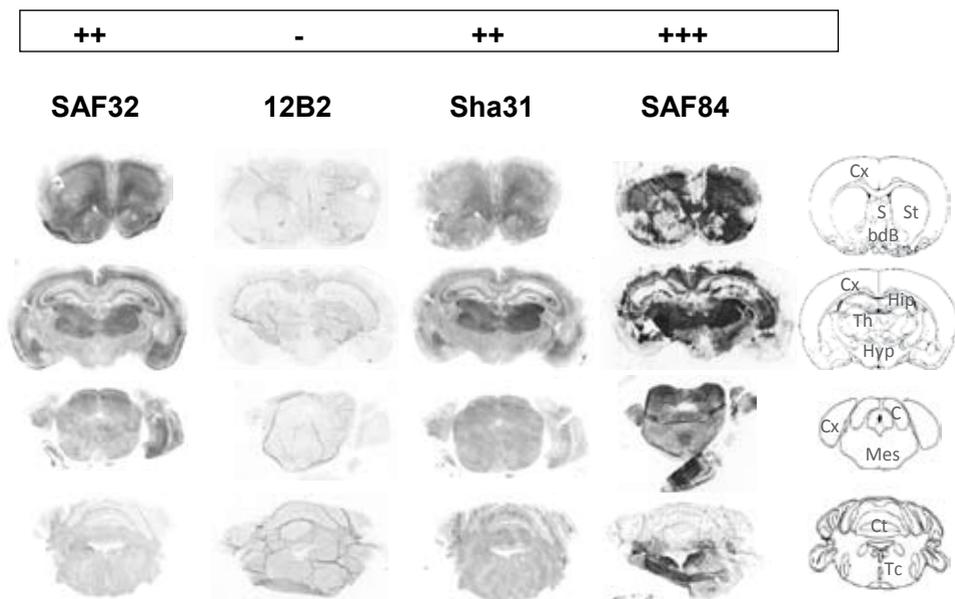


Figures 7 : Application du PET-Blot épitopique à la souche 22A transmise à la souris TgOvPrP4. Cx : cortex, S : septum, St : striatum, bdB: bande diagonale de Broca, Hip: hippocampe, Th: thalamus, Hyp: hypothalamus, C: collicules, Mes: mésencéphale, Ct: cervelet, Tc : tronc cérébral.

sité du signal varie, notamment pour Sha31. La bande diagonale de Broca, le striatum, l'habenula, l'hypothalamus, la substance grise périaqueducale, le mésencéphale et le tronc cérébral correspondent à ces zones. Ces résultats suggèrent que les fragments de PrPres sont longs (toute la longueur est identifiée par les différents anticorps), la taille de la PrPres accumulée paraît alors grande et homogène à l'échelle du cerveau entier ; l'interprétation plausible est donc que la souche 22A conduirait à l'accumulation de fragments de protéine prion très résistants à la PK. Dans le cas de la souche « CH1641-like » (Figure 8), aucun signal n'est observé pour l'anticorps 12B2. L'anticorps Sha31 détecte de la PrPres

dans le thalamus et le tronc cérébral. Les mêmes régions sont marquées avec l'anticorps SAF84 mais avec une intensité plus grande et dans des régions additionnelles : striatum, septum, cortex et mésencéphale. L'anticorps SAF32 indique une répartition semblable à SAF84. Le différentiel de distribution observé suggère l'existence de trois populations de fragments de PrPres de taille différente qui pourront être étudiés de façon fine et notamment à partir de dissections faites dans ces régions cérébrales, par western blot ou d'autres techniques séparatives. Les résultats laissent penser que la souche « CH1641-like » est sensible à la PK dans la région peptidique reconnue par 12B2.

Souche « CH1641-like »



Figures 8 : Application du PET-Blot épitopique à la souche « CH1641-like » transmise à la souris TgOvPrP4.

Les résultats obtenus confirment l'intérêt du PET-Blot différentiel dans la caractérisation de souches et plus particulièrement dans l'étude de la distribution de la PrPres *in situ*. En effet, l'étude de l'intensité de marquage pour un même anticorps, comme l'étude des régions dans lesquelles s'accumule la protéine prion montrent des différences notables qui permettent de distinguer les différentes souches entre elles. Elles se caractérisent par un ciblage reproductible de régions cérébrales précises. L'introduction de différents anticorps reconnaissant différents épitopes de la protéine prion nous permet d'accéder à une information complémentaire. En comparant les marquages différentiels, il est possible d'en déduire approximativement la taille des fragments de PrPres qui s'accumulent dans ces diverses régions cérébrales à l'image de ce qui a pu être mis en évidence par IHC différentielles sur des cas de tremblantes naturelle et expérimentale du mouton (10). Ainsi, ce critère est dès à présent un paramètre supplémentaire permettant de distinguer les souches entre elles. Dans ce modèle de souris transgéniques, les souches 22A et 79A accumulent majoritairement des fragments de PrPres de grande taille selon une répartition cérébrale homogène. En revanche, les souches 87V et CH1641 accumulent des fragments hétérogènes de plus petite taille.

CONCLUSION

Le PET-Blot épitopique est une nouvelle approche conceptuelle. Nous démontrons ici que cette méthode est applicable avec les anticorps SAF32, 12B2, Sha31 et SAF84 et permet de détecter distinctement des populations de fragments de PrPres de tailles différentes. Des analyses complémentaires à l'aide de techniques séparatives seront nécessaires pour visualiser et mesurer plus précisément la taille de ces fragments. En attendant, la sensibilité des anticorps 12B2 et Sha31 pourrait être améliorée notamment en analysant d'autres conditions dénaturantes. Dès à présent, nous envisageons également des analyses complémentaires par immunohistochimie afin de déterminer quels types cellulaires accumulent les différents fragments de PrPres identifiés.

Remerciements

Les auteurs remercient tout particulièrement Jean-Michel Bridon et Mikaël Leboindre, techniciens du secteur histologie prion (P3) de l'Unité Maladies Neurodégénératives pour leur implication dans le développement de ces travaux, sans oublier les techniciens et le responsable de la plateforme d'expérimentation animale de l'Anses de Lyon soit respectivement Émilie Antier, Rabah Belkheir, Damien Gaillard, Coralie Pulido, et Latefa Lakhdar, qui par leur professionnalisme contribuent à fournir des prélèvements histologiques de qualité.

BIBLIOGRAPHIE

1. PRUSINER SB. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science* 1982; **216**:136-44
2. BRUCE M.E., WILL G., IRONSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTLE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT S., COUSENS S., FRASER H., BOSTOCK C.J. Transmissions to mice indicate that «new variant» CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; **389**: 498-501
3. FRASER H. & DICKINSON AG. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 1968; **78**:301-11
4. LEZMI S., BENCSIK A., BARON T. PET-blot Analysis Contributes to BSE Strain Recognition in C57Bl/6 Mice. *J Histochem Cytochem* 2006; **54**:1087-94
5. BARON T., BENCSIK A., VULIN J., BIACABE AG., MORIGNAT E., VERCHERE J., BETEMPS D. A C-terminal protease-resistant prion fragment distinguishes ovine «CH1641-like» scrapie from bovine classical and L-Type BSE in ovine transgenic mice. *PLoS Pathog* 2008;4:e1000137
6. BUFFA J. & BENCSIK A. La méthode du PET-Blot différentiel : principe et contribution à l'étude des souches d'agents infectieux responsables des maladies à prion. *Rev Fr Histotechnol* 2009; n°1 :87-98
7. BENCSIK A., PHILIPPE S., DEBEER S., CROZET C., CALAVAS D., BARON T. Scrapie strain transmission studies in ovine PrP transgenic mice reveal dissimilar susceptibility. *Histochem Cell Biol* 2007; **127**:531-9
8. BENCSIK A. & BARON T. Histopathological studies of «CH1641-like» scrapie sources versus classical scrapie and BSE transmitted to ovine transgenic mice (TgOvPrP4). *PLoS ONE* 2011;6:e22105
9. MOREL N., SIMON S, FROBERT Y., VOLLAND H., MOURTON-GILLES C., NEGRO A., SORGATO M.C., CREMINON C., GRASSI J. Selective and efficient immunoprecipitation of the disease-associated form of the prion protein can be mediated by nonspecific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils. *J Biol Chem* 2004; **279**:30143-9
10. JEFFREY M., MARTIN S., GONZALEZ L. Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 2003; **84**:1033-45

PREMIERES APPROCHES SUR L'APPLICATION DE LA DETECTION MOLECULAIRE PAR RT-PCR POUR L'IDENTIFICATION DES HANTAVIRUS CHEZ L'AULACODE (THRYONOMIS SWINDERIANUS)

BLE Yatanan C1, *KAKOU NGAZOA S2, KOUASSI KAN S1, 2,
DOSSO M, 2 FANTODJI A1
* ngazoa_solange@yahoo.fr

1 Université Abobo-Adjamé, 02 BP 801 Abidjan 02 Côte d'Ivoire
2 Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, BP 490 Abidjan, Cote d'Ivoire

RESUME

Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la recherche sur les aulacodes, les pathologies zoonotiques restent toujours inconnues. Aucune étude sur les zoonoses transmises par ces rongeurs mammifères, gibier alimentaire, n'a encore été réalisée. Pourtant leur élevage prend de plus en plus de l'ampleur pour la consommation de sa viande. Les pathologies zoonotiques des rongeurs notamment celles liées aux Hantavirus sont émergentes dans le monde. La mise en place d'une technique de prélèvement d'échantillons pour le diagnostic moléculaire s'avère nécessaire pour élucider et identifier les facteurs de risque pour les éleveurs et les consommateurs. Cette étude a été réalisée pour la collecte de plusieurs types d'échantillons pour la détection moléculaire par RT-PCR et de séquençage. Au total, 177 échantillons ont été prélevés sur

six différents sites dans le District d'Abidjan. La bio-collection des échantillons d'aulacodes contribuera à la caractérisation moléculaire des pathologies de ce rongeur, en particulier la détection des Hantavirus et le séquençage des souches identifiées.

Mots clés : Aulacode, élevage, zoonose, Hantavirus, RT-PCR, bio-collection.

INTRODUCTION

Les Hantavirus, responsables de zoonoses virales, appartiennent à la famille des Bunyaviridae (12). Ils provoquent une infection asymptomatique chez les rongeurs et sont responsables des fièvres hémorragiques à syndrome rénal (FSPH) ou des fièvres hémorragiques à syndrome pulmonaire (HPS) et de la néphropathie épidémique chez l'homme.

Les émergences à Hantavirus sont rapportées dans plusieurs pays principalement en

Asie et en Europe. Chaque année 150000 à 200000 patients sont hospitalisés dans le monde, la plupart des cas survenant en Asie (Figure 1, OMS, 2010).

En Afrique, les fièvres hémorragiques sont sous-estimées à cause des symptômes similaires au paludisme et aux icères fébriles.

Le génome des Hantavirus est constitué de trois segments d'ARN simple brin de polarité négative, appelés selon leur taille relative L (large), M (moyen) et S (petit) (3). La transmission des Hantavirus à l'homme se fait par contact direct avec les rongeurs infectés, ou par inhalation de poussières et aérosols contenant les éléments infectieux provenant des excréments des rongeurs (2, Figure 2). Deux grandes familles rassemblent les rongeurs vecteurs d'Hantavirus: la famille des Murinae (sous-famille des Murinae) et la famille des Cricetidae (sous-famille des Arvicolinae, sous-famille des Sigmodontinae et la sous-famille des Neotominae).

En Afrique, la propagation des Hantavirus est peu ou mal connue (3, 13). Mais plusieurs enquêtes ont suggéré la présence des pathologies liées aux Hantavirus dans les zones de l'ouest et du centre (10).

Des souches de Hantavirus ont été identifiées chez les rongeurs sauvages en Guinée (7, 8) et en Côte d'Ivoire (6). Cependant aucune étude n'a été réalisée concernant la présence des Hantavirus chez les rongeurs d'élevage notamment l'aulacode (*Thryonomys swinderianus*, Figure 3). Les pathologies zoonotiques sont en émergence, et l'élevage en Côte d'Ivoire des rongeurs est en croissance. L'aulacode est très apprécié pour ses qualités organoleptiques. Même ces fèces prélevées directement dans le tractus digestif (dans l'intestin et le caecum) servent à l'assaisonnement des sauces dans certaines cuisines ouest-africaines (9, 4). Cependant en tant que rongeur sauvage et gibier alimentaire, ils peuvent héberger et transmettre des infections les plus fatales à l'homme et constituent ainsi

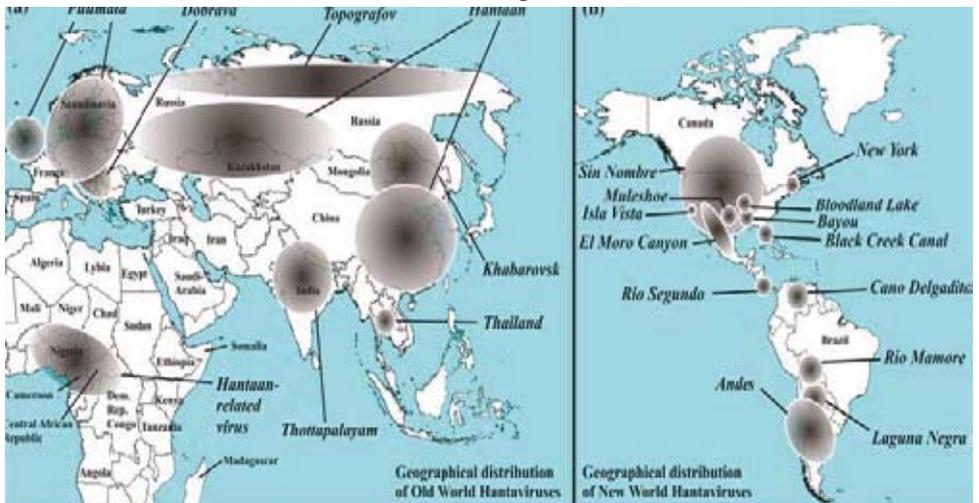


Figure 1 : Carte de distribution de Hantavirus dans le monde (OMS, 2010).

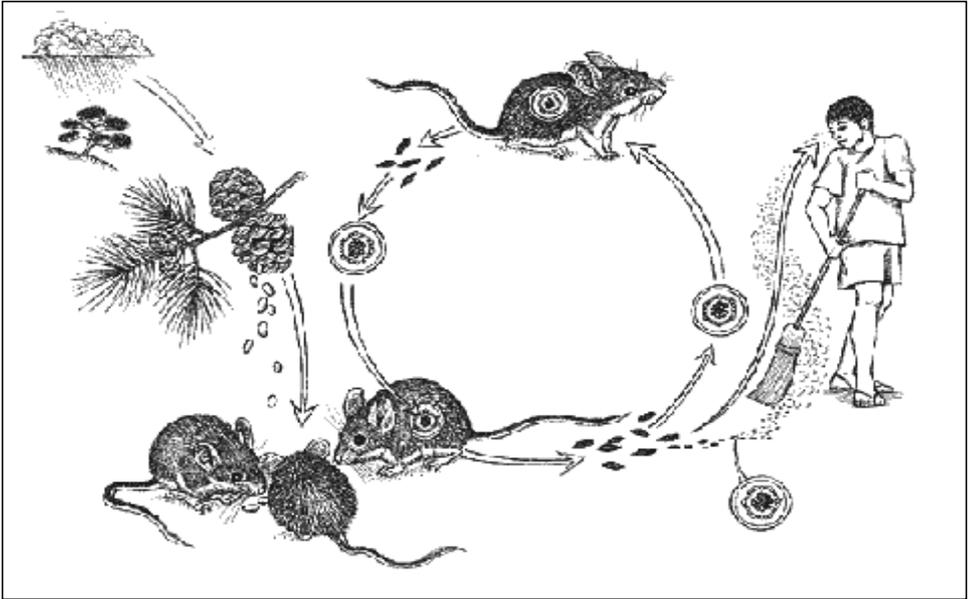


Figure 2 : Cycle de transmission des Hantavirus (Source: American Museum of Natural History, <http://www.sdnhm.org/archive/fieldguide/zoonoses/hantavirus.html>).



Figure 3 : Aulacode (*Thryonomis swinderianus*).

une menace pour la santé publique, d'où l'importance et l'urgence de cette étude. Aussi, cette étude a pour objet de constituer une bio-collection de prélèvements des rongeurs d'élevage et sauvages destinée à l'identification moléculaire des pathologies de ces rongeurs et en particulier la détection des infections à Hantavirus.

Prélèvement des organes

Le prélèvement post-mortem s'est fait sur les aulacodes d'élevage apparemment sains (Figure 3), issus de la ferme expérimentale de l'UAA et de trois (3) fermes en milieu réel à Abidjan et sur les aulacodes gibiers, vendus sur les marchés publics d'Abidjan. Les animaux ont été disséqués au laboratoire sur une table de dissection à surface stérile. Le tube digestif a été retiré et la dissection des organes a été faite selon le protocole établi pour les petits mammifères. Les organes (poumon, rate, rein, foie) ont été placés chacun dans un tube stérile contenant 2 ml de solution saline PBS (1X) et déposés dans une glacière. Une portion de 3 cm de colon descendant vidé des selles a été aussi prélevée. Cette opération de prélèvement d'organe a été exécutée dans

le strict respect des règles de biosécurité. Les organes ont été conservés à -20°C.

Prélèvement des selles d'aulacode

Pendant 2 jours dans chaque ferme, 5-10 g de fèces fraîches dans chaque enclos ont été prélevés à l'aide d'une pincette, mis dans des tubes stériles et placés dans une glacière.

Après ajout de 2-5 ml de PBS (1X) stérile sous la hotte, les fèces sont mélangées, homogénéisées, et la solution centrifugée à 5000 tours/min, à la température de 25°C, pendant 10 min. Le surnageant a été ensuite transféré dans des tubes stériles, distribué en plusieurs aliquots de 500 µl et conservés à -20°C avant l'extraction de l'ARN génomique.

Extraction génomique de l'ARN viral

L'extraction de l'ARN total est faite selon le protocole Phenol-Chloroforme à partir de 450 µl du surnageant de chaque échantillon auquel ont été ajoutés 50 µl d'Acétate de Sodium 1M contenant 1% de Dodecyl Sulfate de Sodium (SDS). La solution mélange est incubée pendant 15 min à 37°C. A cette solution sont ajoutés 500 µl de Phénol/ Chloroforme-isoamylique (25-24-1) et le mélange est incubé à 56°C, pendant 15 min. Après une centrifugation durant 3 min à 12000 tours/min à la température ambiante, le surnageant de la phase supérieure contenant l'ARN est prélevé et mis dans de nouveaux tubes eppendorf. Un volume de 250 µl de Phénol/Chloroforme est ajouté à la phase supérieure et la solution est mélangée pendant 5 min. Les tubes sont centrifugés pendant 3 min à 12000 tours/min. Le surnageant est récupéré dans de

nouveaux tubes et mélangé à 40 µl d'Acétate de Sodium 1M et 1 ml d'éthanol 96%. La solution est mélangée délicatement par retournement des tubes pendant 5 min puis incubée à -20°C pendant 24h. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 15 min à 12000 tours/min puis le surnageant est éliminé. Une quantité de 500 µl d'éthanol glacé 70% est ajoutée aux culots et l'ensemble est centrifugé à 12000 tours/min pendant 15 min. Les culots obtenus après l'élimination du surnageant sont séchés à la température ambiante pendant 10 min et suspendus à nouveau dans 40 µl du tampon d'élution, puis conservés à -20°C avant amplification (Tableau I).

RESULTATS

Collecte des échantillons

Cette étude a permis la collecte de 177 échantillons soit 88 échantillons de selles par les prélèvements directs et 89 échantillons d'organes pour les prélèvements post-mortem.

Un effectif de 62 organes (foie, rate, poumons) et de 27 colons a été collecté. La diversité des prélèvements dans les différentes régions permettra l'analyse histologique et biologique des pathologies de l'aulacode selon les fermes, les marchés et les régions d'origine des animaux. Les fermes d'élevage ont présenté la totalité des prélèvements directs des fèces, mais aucun prélèvement d'animaux malades n'a été fait dans ces fermes. Les élevages présentaient des populations mixtes au sein des enclos, ce qui favoriserait la transmission des virus respiratoires entre les animaux. Les prélèvements directs de selles dans les enclos à plusieurs individus sont impor-

Caractéristiques	Real-time (Temps réel) RT-PCR	RT-PCR
Phases	Une phase	Deux phases
Spécificité	Sonde et Amorces	Amorces
Taille de cible	50-150 bp	100-2000 bp
Durée du test	2 h	2-3 jours
Révélation et Confirmation	Courbe de fluorescence en temps réel	Electrophorèse et Hybridation
Sensibilité	100-10.000 fois	Moyenne ou inférieure
Capacité	96 Analyses	20-30 Analyses
Test	Quantificatif	Qualitatif

Tableau I : Les deux types de PCR.

tants et permettent de détecter les pathologies de chaque groupe.

Les organes obtenus par post-mortem permettent aussi l'analyse complète des animaux ou d'un animal dans un enclos correspondant. Les organes provenant des animaux capturés par la chasse et vendus dans les marchés permettront l'identification des pathologies dans l'environnement de ce rongeur.

Extraction génomique

Les acides nucléiques extraits par la méthode phénol-chloroforme permettent la détection des pathologies des aulacodes et la classification moléculaire des rongeurs. La technique de phénol-chloroforme permet une séparation des acides nucléiques et des protéines et donne des résultats satisfaisants pour la détection moléculaire. Cette étude a permis la collecte des acides nucléiques pour la détection des infections à Hantavirus à partir des selles et des organes.

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de l'extraction au phénol chloroforme pour l'ADN ou l'ARN total.

DISCUSSION

Les aulacodes constituent en Côte d'ivoire une source de protéines appréciée et une source de revenu pour les éleveurs (Fantodji & Soro, 2004). Cependant les pathologies des aulacodes sont peu connues et les risques sanitaires dans les fermes d'élevage sont mal contrôlés.

Cette étude a permis la collecte de plusieurs types d'échantillons pour la détection moléculaire des pathologies de l'aulacode dans les fermes d'élevage et dans l'environnement chez les animaux sauvages capturés par la chasse. La combinaison des prélèvements directs et post-mortem met en corrélation une éventuelle contamination généralisée groupée au sein d'un enclos et une éventuelle contamination individuelle des rongeurs dans la ferme. Le risque de transmission pour les éleveurs dans la ferme et pour les consommateurs

qui achètent les rongeurs pour la consommation alimentaire est également évalué. La détection moléculaire est la méthode de choix pour les Hantavirus. Elle utilise la présence de l'ARN viral par l'amplification de cibles conservées des fragments L et S. Pour les Hantavirus, deux méthodes PCR sont le plus exploitées, la RT-PCR et la PCR en temps réel. La diversité génétique des Hantavirus selon les régions géographiques et les rongeurs a montré une famille de virus encore mal connue. Les réservoirs des Hantavirus sont complexes car la co-divergence et la contamination croisée entre les familles de rongeurs a été démontré et a contribué à l'émergence des virus Asama virus (ASAV) au Japon chez les rongeurs *Urotrichus talpoides* (1). En Afrique, Klempa *et al.* (2007) ont détecté les Hantavirus en Guinée chez les rongeurs *Crocidura theresae*. Les extraits d'ARN obtenus des prélèvements chez les aulacodes dans cette étude permettront la détection moléculaire des Hantavirus. Les fragments L et S sont les séquences les plus utilisées pour l'alignement comparatif des séquences. Le segment S de taille 1839 nucléotides code pour une protéine de 428 acides aminés. Par contre le segment L de 6474 nucléotides contient 6 domaines conservés appelés pré-motifs A et motifs A-E qui codent pour RNA polymérase des Hantavirus. La RT-PCR de détection utilise cette région conservée pour une large sélection. La méthode de séquençage des souches identifiées permettra l'identification moléculaire complète.

La sécrétion des Hantavirus dans les selles constitue le mode de transmission courant et l'infection des organes respiratoires (poumons) a été démontrée dans les études antérieures. Kang *et al.* (5) ont démontré la présence des Hantavirus dans les organes collectés après plusieurs années dans les régions européennes.

CONCLUSION

Les infections à Hantavirus provoquent des fièvres hémorragiques à syndromes rénaux ou respiratoires de cause fatale, ainsi la présence des virus chez les rongeurs nécessite une surveillance microbiologique importante pour une riposte rapide chez les éleveurs et les consommateurs. Cette étude contribue à la mise au point des méthodes de détection moléculaire et de surveillance de la circulation des Hantavirus et des pathologies des rongeurs en Côte d'Ivoire.

REMERCIEMENTS

Cette étude qui émane d'un projet pour la surveillance des pathologies chez les aulacodes, est réalisée grâce à l'appui financier de Wellcome Trust à travers le Consortium Afrique One : "One Health Initiative – African Research Consortium for Ecosystem and Population Health", à qui nous tenons à exprimer toutes nos gratitude.



BIBLIOGRAPHIE

1. ARAI S, OHDACHI SD, ASAKAWA M, KANG HJ, MOCZ G. (2008) Molecular phylogeny of a newfound hantavirus in the Japanese shrew mole (*Urotrichus talpoides*). *Proc Natl Acad Sci*. 105: 16296–16301.
2. BOUÉ, F, UMBANG. G. (2010) Les Hantavirus à découvrir ou à redécouvrir. *Bulletin Epidémiologie* 37: 1p.
3. BOULOY M, ZELLER. H. (1999) Les Hantavirus : données récentes et revues de la littérature. Manuscrit n° 2155/RP3. 3è colloque de réseau international des Instituts Pasteurs et Instituts associés.
4. FANTODJI A, SORO D. (2004) Elevage des aulacodes : expérience en Côte d'Ivoire. Guide pratique. Agridoc. 133
5. KANG HJ, BENNETT SN, SUMIBCAY L, ARAI S, HOPE AG, MOCZ G, SONG JW, COOK JA, YANAGIHARA, R. (2009) Evolutionary Insights from a Genetically Divergent Hantavirus Harbored by the European Common Mole (*Talpa europaea*). *PLoS ONE* 6149: 1-12.
6. KANG HJ, KADJO B, DUBEY S, JACQUET F, YANAGIHARA R. (2011) Molecular evolution of Azagny virus, a newfound hantavirus harbored by the West African pygmy shrew (*Crocodyrus obscurior*) in Côte d'Ivoire. *Virol. Journal*. 373 : 1-7.
7. KLEMPA B, FICHET-CLAVET E, LECOMPTE E, AUSTE B, ANISKIN V, MEISEL H, DENYS C, KOIVOGUI L, TER MEULEN J, KRÜGER DH. (2006) Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 12: 838-840.
8. KLEMPA B, FICHET-CALVET E, LECOMPTE E, AUSTE B, ANISKIN V, MEISEL, H, BARRIÈRE P, KOIVOGUI L, TER MEULEN J, KRÜGER DH. (2007) Novel hantavirus sequences in shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 13: 520-522.
9. MENSAH G. A. (1999) Ecologie de l'aulacode. *Bulletin de la recherche agronomique, Afrique One* 17 : 19-31.
10. NAKOUNNE E, SELEKON B, MORVAN J. (2000) Veille microbiologique fièvre hémorragique virale en République Centrafricaine. 2035:8.
11. OMS, 2010. Fièvre hémorragiques, Crimée-Congo, Hantavirus et fièvre hémorragique Alkha Menace de maladie infectieuse émergente. Rapport du Secrétariat, conseil exécutif 127^e session point 5.1.
12. SCHMALJOHN, C. S., SCHMALJOHN, A. L, DALRYMPLE, J.M. (1987a). Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology* 157: 31-39.
13. SCHMALJOHN C, HJELLE B. (1997). Hantavirus a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 3 : 95- 104.

HISTOMORPHOMETRIE DU CARTILAGE ARTICULAIRE : DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE MESURE PAR ANALYSE D'IMAGES

MARSAIS Florence* ; SMADJA Michel\$; MERCIRIS Didier* ; GENDROT François * ;
PERRET Laetitia* ; BRYNS Reginald * ; LEPESCHEUX Lièn*
rd@glpg.com

*Galapagos SASU, 102 Avenue Gaston Roussel, 93230 Romainville, France \$ Sis'n Com
1, allée Louis Jouvet, 92600 Asnières

RESUME

Dans le contexte de sa recherche pour le traitement de l'arthrose, les laboratoires GALAPAGOS utilisent le modèle *in vivo* de rat ménisectomisé, qui reproduit la pathologie par érosion du cartilage articulaire. Nous testons l'efficacité de molécules contre l'arthrose induite chez l'animal selon deux étapes. La première étape consiste à évaluer la profondeur et l'étendue de l'érosion du cartilage articulaire par semi-quantification selon la méthode décrite par l'*OsteoArthritis Research Society International* (OARSI), considérée comme un standard international. Les molécules sélectionnées en première intention par cette méthode, sont ensuite évaluées par histomorphométrie, grâce à un logiciel d'analyse d'images développé de façon *ad hoc* (Sis'n Com, France). Ce logiciel permet de quantifier, de manière automatisée, l'effet des composés sur les différents compar-

timents impliqués dans le remodelage du cartilage, que sont la matrice cartilagineuse, les chondrocytes et l'os sous-chondral.

INTRODUCTION

L'arthrose causée par la dégénérescence du cartilage articulaire, est une pathologie chronique qui se manifeste par des douleurs persistantes aux articulations. Trois principales lésions anatomiques sont observées dans l'arthrose : l'érosion du cartilage articulaire (fissurations, ulcérations), pouvant conduire à la mise à nu du tissu osseux sous-jacent, qui se décalcifie et/ou s'épaissit (ostéosclérose sous-chondrale), ainsi que la formation d'excroissances osseuses sur les bords de l'articulation (ostéophyte).

Dans notre recherche de molécules dédiées au traitement de l'arthrose, notre laboratoire utilise le modèle *in vivo* du rat ménisectomisé (MNX), reconnu pour mimer

la pathologie humaine (1, 2). L'évaluation des molécules est faite par analyse histologique des 2 tissus cibles de l'arthrose : le cartilage articulaire et l'os sous-chondral. Les molécules testées sont triées en première intention grâce un scoring (ou semi-quantification) du cartilage articulaire, selon le standard international OARSI (3). En deuxième intention, des paramètres complémentaires sont quantifiés sur les tissus cibles, par analyse d'images (histomorphométrie). Etant donné le nombre important d'échantillons à analyser, un logiciel d'imagerie a été développé de façon *ad hoc* (Sis'n Com, France). Nous présentons dans cette étude les bénéfices apportés par ce logiciel d'analyse d'images, qui permet la quantification automatisée du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral.

MATERIEL ET METHODES

1/ Modèle in vivo d'arthrose

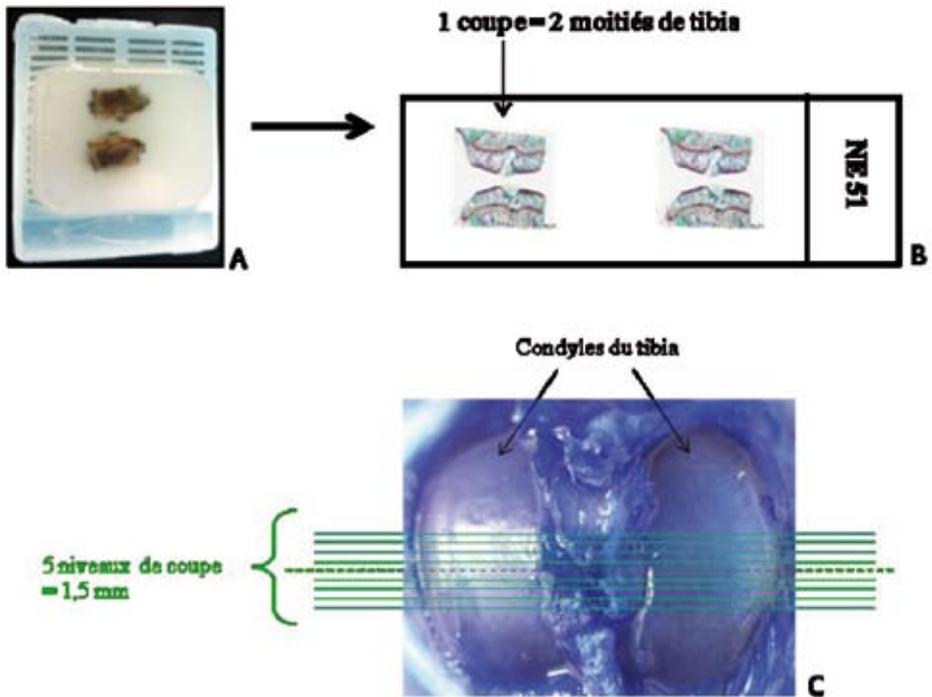
Des rats mâles Lewis âgés de 3 mois (CERJ, France) sont anesthésiés avec un mélange de ketamine (40 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) par voie intramusculaire, en vue de la ménisectomie. Les genoux droits sont ensuite rasés et nettoyés à l'alcool 70°. La peau du genou droit est incisée, de façon à accéder au tendon rotulien, qui sera coupé afin d'accéder à l'espace articulaire fémur-tibia. Après une résection partielle du ligament médian collatéral, le ménisque est sectionné en deux parties puis repoussé à l'avant et à l'arrière de l'articulation. Le ménisque ainsi sectionné, entraîne une mise en contact du fémur avec le tibia, et c'est le frottement mécanique de ces deux os qui va engendrer l'arthrose. La peau est ensuite suturée avec

du fil de soie 4-0. Les animaux du groupe Sham sont des rats anesthésiés, la peau du genou incisée puis refermée.

L'arthrose induite par MNX est par expérience très variable, aussi est-il nécessaire d'avoir un nombre important d'animaux par groupe (n=20) afin d'obtenir des statistiques significatives. L'étude que nous rapportons ici concerne 4 groupes de 20 rats:

- Sham + MC 0.5% (i.e. méthylcellulose (MC) à 0.5%)
- MNX + MC 0.5%
- MNX + molécule A
- MNX + molécule B

Les rats sont traités quotidiennement par gavage, pendant 3 semaines, dès le deuxième jour suivant la chirurgie, soit avec le MC 0.5% seul pour les groupes contrôles Sham et MNX, soit avec le composé A ou B pour les deux groupes traités. Après sacrifice des animaux, les tibias droits sont prélevés et fixés pendant 48 h dans du formaldéhyde à 3,7% (Labonord). Les os sont ensuite coupés, juste en dessous de la plaque de croissance, pour ne garder que la partie épiphysaire, puis mis à décalcifier dans le décalcifiant Osteosoft (Merck) pendant 6 jours, sous agitation, à température ambiante. Chaque tibia est ensuite coupé longitudinalement en deux parties équivalentes puis remis à décalcifier pendant 24 heures supplémentaires, avec d'être déshydratés dans un automate (TP1050, Leica). Puis les deux moitiés de tibia sont ensuite incluses, face à face, dans la paraffine (Figure 1A). Cette technique permet pour chaque coupe, de disposer de deux niveaux de tibia différents et donc de multiplier par deux les surfaces d'évaluation. Des coupes



Figures 1 : A. Les tibias inclus en paraffine. B. Deux niveaux de coupe en même temps. C. Cinq niveaux de coupes étudiés.

de 4 μm (Figure 1B) sont collectées sur une lame, tous les 200 μm et ce, sur 5 niveaux successifs, en partant de la zone centrale du tibia vers l'extérieur (Figure 1C). Sur chaque lame se trouvent deux coupes successives d'un même niveau. Au total les 10 coupes de chaque tibia représentent environ 1.5mm de la largeur du condyle (Figure 1C). Elles sont ensuite colorées par la safranine O et le vert lumière avec l'automate à coloration (Tribune Stainer, Labonord), avant leur examen et analyse en microscopie optique (Provis, Olympus). Un lot de lames est également coloré avec le marqueur fluorescent DAPI (Vector) de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN),

pour la quantification des chondrocytes. A raison de 6 lames par animal, le nombre de lames à évaluer est de $6 \times 80 = 480$ lames pour les 4 groupes à analyser.

2/ Evaluation du cartilage par semi-quantification (score OARSI)

Le cartilage articulaire est évalué selon la méthode de scoring OARSI (3). Pour chaque coupe de tibia, on affecte au cartilage articulaire deux scores : un pour la profondeur (grade) et un pour l'étendue (stage) de l'érosion du cartilage (Figure 2). Le score OARSI est ensuite calculé comme étant le produit du grade par le stage (Tableau I).

Grade = profondeur de l'érosion	Stage = étendue de l'érosion
grade 0 : intact	stage 0 : intact
grade 1 : surface intacte et légère fibrillation	stage 1 : <10%
grade 2 : surface discontinue, fibrillation superficielle et focale	stage 2 : 10-24%
grade 3 : fissures verticales et fibrillation dans la région moyenne	stage 3 : 25-50%
grade 4 : érosion avec perte de matrice	stage 4 : >50%
grade 5 : dénudation du cartilage	
Score OARSI = grade X stage	

Tableau 1 : Méthode d'évaluation semi-quantitative de l'érosion du cartilage articulaire selon la méthode OARSI. Le scoring se fait en lecture aveugle par deux examinateurs indépendants. Les résultats des deux lecteurs sont ensuite moyennés animal par animal.

Les analyses statistiques des scores OARSI sont faites à partir des médianes des groupes en utilisant le test de Kruskal-Wallis (5) suivi d'un test de comparaisons multiples de Dunnett (6). Niveaux de significativité : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs MNX+véhicule.

3/ Evaluation du cartilage par quantification (Histomorphométrie)

La semi-quantification selon la méthode OARSI permet de sélectionner les molécules actives sur la prévention de l'érosion du cartilage articulaire. Des paramètres complémentaires sont ensuite mesurés dans le but de : 1/ confirmer par la quantification l'efficacité des molécules et 2/ d'apporter des compléments d'information sur le mécanisme d'action. Les mesures histomorphométriques du cartilage articulaire sont effectuées séquentiellement sur des coupes colorées de tibia de rat :

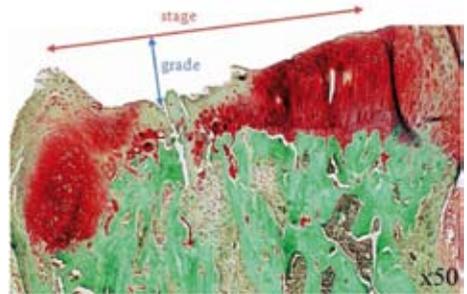


Figure 2 : Plateau médian d'un tibia coloré par la safranine O et le vert lumière marquant les protéoglycans (rouge) et le collagène (vert). Mesure du grade et du stage indiqués par les flèches.

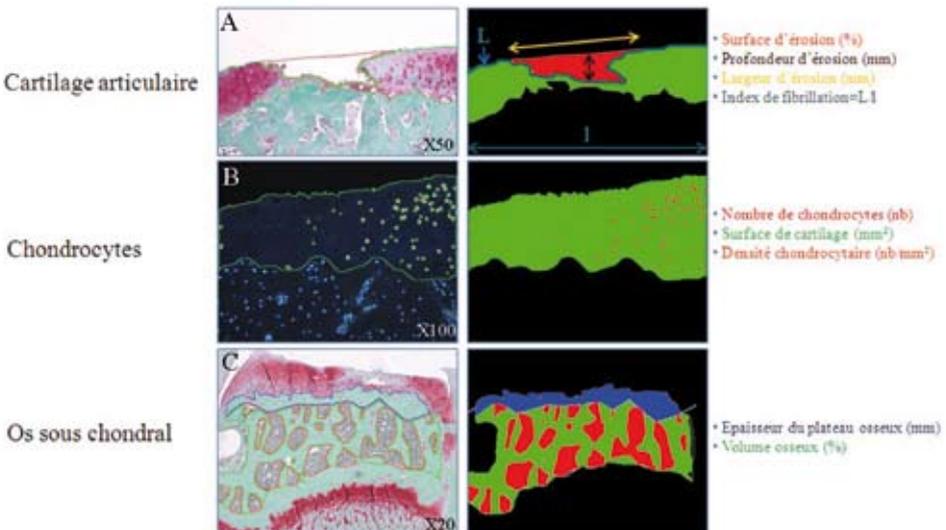
- phase d'acquisition d'images : les images des plateaux tibiaux sont capturées à l'aide d'une caméra numérique reliée au microscope optique. La surface de la cavité d'érosion ainsi que l'index de fibrillation sont calculés à partir d'images prises au microscope optique à l'objectif 10, l'épaisseur du plateau osseux sous-chondral ainsi que le volume osseux à partir d'images prises au microscope op-

tique à l'objectif 4 (3) et la densité chondrocytaire à partir d'images prises au microscope à fluorescence à l'objectif 20.

- phase de segmentation : chaque image est traitée automatiquement par le logiciel qui extrait toutes les régions d'intérêt. En effet, sur une coupe colorée avec la safranine O et le vert lumière, le logiciel Sis'n Com peut détourner automatiquement la zone érodée du cartilage (rouge) (Figure 3A), le cartilage articulaire (vert) (Figure 3A, B) ainsi que l'os sous chondral (bleu) (Figure 3C). Sur une coupe colorée au DAPI, le logiciel détectera automatiquement le cartilage articulaire (vert) et les chondrocytes (rouge) (Figure 3B).
- phase de correction : les images segmentées sont ensuite vérifiées et corrigées au besoin, de façon manuelle par un examinateur.

- phase d'analyse : une fois la correction des images segmentées faite, le système donne automatiquement les résultats chiffrés pour tous les paramètres. En effet, à partir des régions délimitées le logiciel mesure automatiquement la surface d'érosion, l'index de fibrillation, l'épaisseur de l'os sous chondral ainsi que le nombre de chondrocytes de la surface articulaire concernée.

Les analyses statistiques des paramètres histomorphométriques sont faites par comparaison des moyennes des groupes en utilisant le test de Tukey (7). Niveaux de significativité: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs MNX+véhicule.



Figures 3 : Coupe de la partie épiphysaire du tibia colorée avec la safranine O et le vert lumière A, C ou au DAPI, B.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'arthrose induite par la ménisectomie chez le rat, s'accompagne de changements morphologiques, tels l'érosion du cartilage articulaire avec des fibrillations en surface, la perte de chondrocytes dans la région érodée, ainsi qu'un épaissement de l'os sous-chondral (Figures 4).

Le score OARSI moyen du groupe contrôle MNX, traité avec le véhicule est de 12,45 + 0,62 (Figure 4A). L'efficacité du composé B, est démontrée par une diminution de 29% du score OARSI et est confirmée par la diminution de 48% de la surface d'érosion mesurée par histomorphométrie (Figure 4B). A l'inverse le composé A s'est montré inactif, car sans effet majeur sur les deux mêmes paramètres (Figures 4A, B).

De plus, le composé B diminue l'index de fibrillation de 15% ($p < 0.05$), alors que le composé A n'a aucun effet (Figure 4C). Si la densité chondrocytaire est similaire pour les deux composés A et B, (Figure 4D), il est intéressant de noter que tous deux tendent à prévenir l'épaississement de l'os sous-chondral induit par la ménisectomie (Figure 4E).

Sans remplacer la méthode de scoring OARSI, aujourd'hui considérée comme la méthode internationale de référence, notre méthode quantitative utilisant le logiciel d'analyse d'images Sis'n Com, présente pour nous de nombreux atouts pour trier les composés :

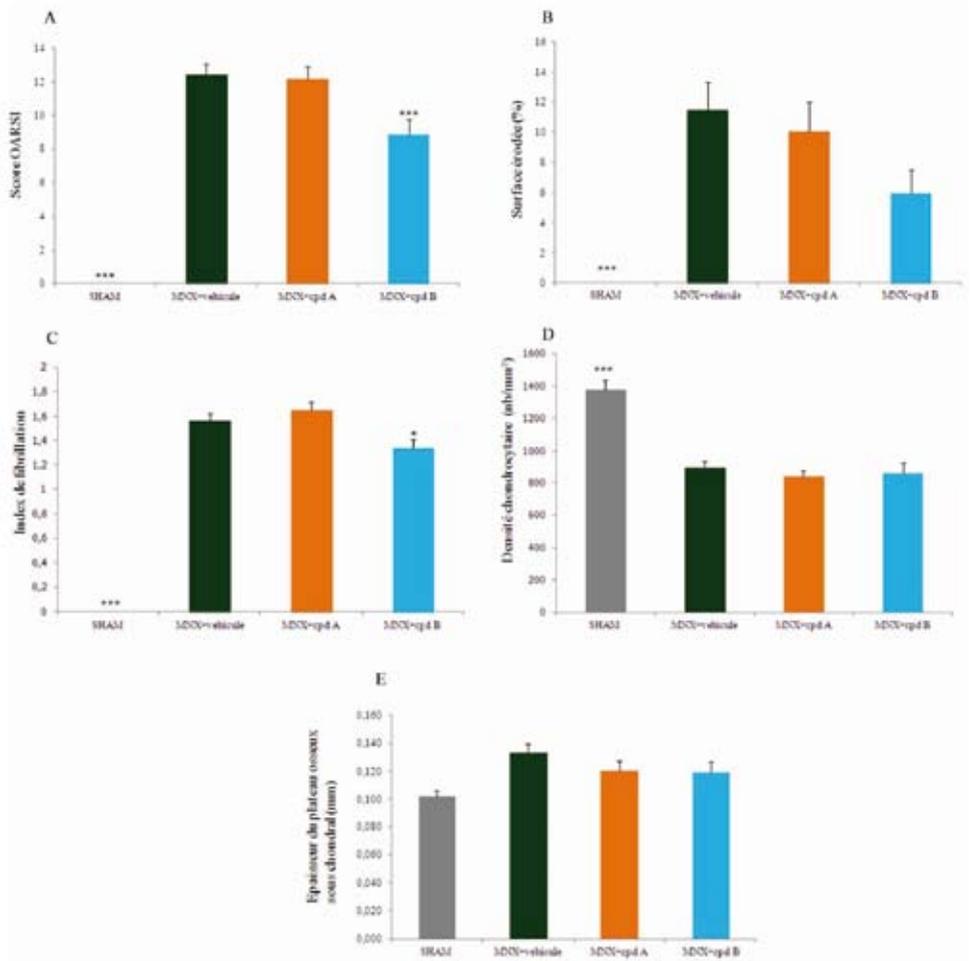
- Gain de temps : les méthodes de scoring sont coûteuses en temps et nécessitent une lecture en double aveugle, de

façon séquentielle, pour s'affranchir au maximum de la variabilité inter lecteur. L'histomorphométrie par imagerie permet à plusieurs lecteurs de travailler en parallèle sur les différents paramètres à quantifier. En effet, le fait d'acquérir les images dans plusieurs dossiers différents, permet à autant d'utilisateurs de corriger les images en parallèle et non de façon séquentielle.

- Puissance accrue : notre étude montre que l'histomorphométrie permet d'obtenir une fenêtre de lecture plus large que celle offerte par le scoring OARSI. En effet, le composé B protège le cartilage de l'érosion de 48% mesuré par histomorphométrie et de 29% évalué par le scoring OARSI. Cette plus grande largeur de fenêtre de lecture donne une meilleure discrimination des composés testés.
- Mécanisme d'action : grâce aux informations récoltées sur les différents acteurs intervenant dans l'histopathologie de l'arthrose (activité cellulaire, remodelage du cartilage et de l'os). A efficacité équivalente, des molécules sélectionnées peuvent être discriminées sur la base de ces informations mécanistiques.

CONCLUSION

La sélection de composés actifs dans un modèle *in vivo* d'arthrose, nécessite des outils d'évaluation à la fois robustes, fiables et rapides. A ce titre, le logiciel Sis'n Com permet de traiter un nombre d'échantillons important et de discriminer entre eux les composés les meilleurs, en fonction de leur mode d'action.



Figures 4 : A. Scores OARSI obtenus par la méthode semi quantitative de Pritzker. Les graphes B, C, D et E montrent les résultats de la mesure de la surface érodée, de l'index de fibrillation, de la densité chondrocytaire et de l'épaisseur de l'os sous-chondral.

BIBLIOGRAPHIE

- 1-WILLIAMS J.M., FELTEN D.L., PETERSON R.G., O'CONNOR B.L.: Effects of surgically induced instability on rat knee articular cartilage. *J. Anat.* 1982, 134 (1), 103-109.
- 2- BENDELE A.M.: Animal models of osteoarthritis. *J. Musculoskel Neuron Interact*, 2001, 1(4), 363-376.
- 3-PRITZLER K.P.H, GAY S., JIMENEZ S.A., OSTEERGARD K., PELLETIER J-P., REVELL P.A., SALTER D., VAN DEN BERG W.B.: Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and cartilage*, 2006, 14, 13-29.
- 4-PASTOUREAU P., LEDUC S., CHOMEL A., DE CEUNINCK F.: Quantitative assessment of articular cartilage and subchondral bone histology in the meniscectomized guinea pig model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2003, 11, 412-423.
- 5- KRUSKAL W.H., WALLIS W.A.: Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *J. Am. Stat. Assoc.*, 1952, 47, 583-621.
- 6- DUNNETT C.W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.*, 1955, **50**, 1096-1121.
- 7-TUKEY JW.: Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans N Y Acad Sci.*, 1953, 16(2), 88-97.

ÉVALUATION DE DIFFÉRENTES SOLUTIONS DE DÉCALCIFICATION POUR L'ÉTUDE DU CARTILAGE : COMPATIBILITÉ AVEC LES TECHNIQUES D'HISTOLOGIE, D'IMMUNOHISTOCHEMIE ET D'HYBRIDATION *IN SITU*

*Émilie VELOT 1, 2, Nadia MESSADDEQ 2, Jean-Luc WEICKERT 2,
Arnaud BIANCHI 1, Lydie VENTEO 3
*emilie.velot@univ-lorraine.fr

*1 : Faculté de Médecine, Bâtiment Biopôle, B.P. 184
UMR 7561 CNRS-Université de Lorraine
Physiopathologie, Pharmacologie et Ingénierie Articulaires
54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex*

*2 : Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
1 rue Laurent Fries, B.P. 10142 - 67404 Illkirch Cedex*

3 : Label Histologie - 8 rue Belin, 51100 Reims

RESUME

L'étude histologique du cartilage nécessite une étape de décalcification après la fixation du tissu, dans le but d'obtenir des coupes de bonne qualité pour l'observation au microscope. La décalcification est une étape clef à prendre en considération dans les études de ce tissu.

Il existe une multitude de décalcifiants, les plus couramment utilisés sont l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) et les polyacides. Ils présentent tous des avantages et des inconvénients comme par exem-

ple un temps de décalcification trop long, la perte de l'intégrité du tissu, la destruction d'épitopes... Depuis plusieurs années, de nouvelles formules commerciales sont disponibles, alliant parfois plusieurs types de décalcifiants.

Notre étude propose de comparer les effets de 5 décalcifiants (EDTA et 4 décalcifiants commerciaux) sur le cartilage de genou et de disque intervertébral de souris âgées de 2 mois. Afin d'évaluer leur compatibilité avec les techniques d'histologie, nous avons eu recours à des colorations histo-

logiques classiques dans l'étude cartilage : hématoxyline-éosine-safran (coloration topographique), rouge Sirius (organisation des fibres de collagènes) et safranine O (appréciation du contenu en protéoglycanes). Des techniques d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont été réalisées. Pour l'immunohistochimie, un marqueur de prolifération cellulaire (antigène Ki-67) a été étudié afin d'apprécier la préservation des épitopes tissulaires et l'intégrité de l'os sous-chondral. Pour l'hybridation *in situ*, une sonde spécifique de l'ARNm du collagène de type II, caractéristique du cartilage, a été utilisée pour évaluer l'intégrité des acides ribonucléiques. Enfin, l'analyse des modifications de la surface tissulaire a été réalisée grâce à la microscopie électronique à balayage (MEB) pour chaque décalcifiant testé.

Mots-clés : cartilage hyalin, fibrocartilage, décalcification, EDTA.

INTRODUCTION

L'étude histologique du cartilage peut s'avérer délicate lorsque les seuls moyens mis à disposition sont l'inclusion dans la paraffine de l'échantillon et la coupe de celui-ci par un microtome classique. Lors du prélèvement, les pièces cartilagineuses sont communément liées aux pièces osseuses par la zone d'os sous-chondral, d'où une coupe plus difficile liée à la dureté de l'échantillon. Il faut alors composer avec la diversité des tissus présents dans l'échantillon pour s'assurer d'une qualité optimale de coupe : A- l'os, tissu calcifié. B- le cartilage, tissu avasculaire et non innervé, dont les cellules sont appelées chon-

drocytes. Il contient une couche minéralisée en contact avec l'os sous-chondral où des chondrocytes hypertrophiques synthétisent une matrice extracellulaire (MEC) calcifiée. C- les autres types de tissus ne pouvant être éliminés pour éviter la perte de structure du prélèvement comme par exemple le muscle, le tissu adipeux ou le tissu fibreux.

Les chondrocytes synthétisent une matrice extracellulaire qui donne à chaque type de cartilage ses propriétés mécaniques spécifiques. Il existe trois types de cartilage : hyalin (résistance à la compression), fibreux (résistance à la traction) et élastique (résistance à la déformation). Le cartilage articulaire, comme celui de l'articulation fémoro-tibiale est de type hyalin, sa MEC est composée majoritairement de collagène de type II. Le fibrocartilage à une MEC riche en collagène de types I et II. *L'anulus fibrosus* des disques intervertébraux entourant le *nucleus pulposus*, est fait de cartilage de type fibreux. La MEC du cartilage élastique contient du collagène de type II et des fibres élastines. Le pavillon de l'oreille, par exemple, est fait de cartilage élastique. Dans nos travaux, nous nous sommes focalisés sur l'étude du cartilage hyalin de l'articulation fémoro-tibiale et du fibrocartilage des disques intervertébraux, qui sont directement en contact avec une zone d'ossification sous-chondrale, et donc, du tissu osseux.

En histologie, il est possible de travailler sur du tissu non décalcifié, il existe pour cela des méthodologies spécifiques. Le milieu d'inclusion doit être plus dur que la pa-

raffine et des résines ou plastiques peuvent être utilisés comme du méthyl-méthacrylate (1, 2). La coupe nécessite des couteaux particuliers, comme des couteaux de verre ou en carbure de tungstène (3). Cependant, les études sont réalisées principalement sur de l'os décalcifié, excepté pour le diagnostic de maladies métaboliques osseuses.

La décalcification est réalisée après la fixation et avant la déshydratation des échantillons et peut se faire soit par des acides, soit par des agents chélateurs. L'utilisation d'acides, même en solution tamponnée, aura des effets sur la colorabilité des tissus. Plus l'acide sera fort et la décalcification longue, plus les effets seront prononcés. Une sur-décalcification peut provoquer une absence totale de coloration nucléaire. Il est donc important de suivre régulièrement la cinétique de décalcification. Les solutions acides de décalcification peuvent avoir des pH compris entre 0,5 et 3. Les sels de calcium sont solubles à partir d'un pH de 4,5 et vont être dissouts et ionisés, ce qui permet le maintien de certaines activités enzymatiques, si la solution acide est tamponnée à ce pH. (2) L'acide chlorhydrique et l'acide nitrique décalcifient rapidement les tissus, mais le procédé de décalcification doit être suivi régulièrement afin d'éviter les artefacts tissulaires et les modifications tinctoriales. Si l'acide chlorhydrique est utilisé après une fixation par le formaldéhyde, les échantillons devront être rincés abondamment après fixation et avant la décalcification. Un composé carcinogène, le bis-chlorométhyl éther, peut se former par une réaction entre le formaldéhyde et l'acide chlorhydrique. (2) L'acide

formique agit beaucoup plus lentement et laisse à l'utilisateur plus de latitude pour gérer sa décalcification. Un mélange de formaldéhyde et d'acide formique est possible pour prolonger la fixation et décalcifier en même temps. La décalcification par des agents chélateurs est beaucoup plus douce. Il s'agit de composés organiques qui ont la propriété de se lier à certains métaux. L'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) est très souvent utilisé. Bien qu'il se nomme acide, il n'agit pas comme les acides classiques, mais se lie aux ions calcium et magnésium. L'EDTA ne se lie pas au calcium en dessous de pH 3. Une solution à pH 8 donne des conditions de liaison optimum, mais ce pH élevé peut endommager certaines protéines. Il est donc conseillé de travailler à un pH proche de la neutralité (3). L'EDTA lie les ions calcium présents sur la couche externe des cristaux d'hydroxyapatite et va diminuer progressivement la taille de ces cristaux. Il s'agit d'un procédé long qui n'endommage pas les tissus ni leur propriété tinctoriale. (2,3) C'est également un excellent décalcifiant pour les études enzymatique, immunohistochimique et d'hybridation *in situ*.

Différentes méthodes permettent d'évaluer la décalcification d'un échantillon. Les méthodes dites physiques : l'utilisation d'une aiguille ou d'une épingle pour estimer l'amollissement du tissu, ou encore presser l'échantillon entre ses doigts. Ces méthodes sont approximatives puisque leur évaluation est laissée à l'appréciation du manipulateur, et elles peuvent altérer la qualité structurale de l'échantillon (trou, déformation, etc.). Une autre méthode phy-

sique bien plus fiable, mais aussi beaucoup plus onéreuse et difficile d'accès, est la radiographie par rayons X. Les méthodes chimiques sont actuellement privilégiées aux méthodes physiques car elles sont faciles à mettre en œuvre et peu coûteuses. Leur principe est de récupérer la solution de décalcification dans laquelle est immergé l'échantillon, et de vérifier sa teneur en ions calcium grâce à des agents précipitants, comme l'oxalate d'ammonium utilisé dans les méthodes de Rosen (4) ou d'Arnim (5). Il suffit alors de remplacer l'ancienne solution de décalcification saturée en calcium par une nouvelle pour poursuivre la décalcification de l'échantillon. Une cinétique permettant de déterminer le point final de décalcification peut alors être établie. Une fois la décalcification achevée (la solution de décalcification reste limpide), l'échantillon peut alors être déshydraté et inclus dans la paraffine.

L'OsteoArthritis Research Society International (OARSI) est une organisation internationale dont le but est la prévention et le traitement de l'arthrose. Le supplément 3 du volume 18 publié en octobre 2010 de la revue « Osteoarthritis and Cartilage » (6), comporte une série de recommandations concernant l'étude histologique du cartilage en fonction de diverses espèces animales: souris, rat, cochon d'Inde, lapin, chien... tout ceci afin d'étudier au mieux la progression de l'arthrose (7). Pour les espèces de petite taille comme la souris, différentes solutions de décalcification des tissus articulaires sont préconisées : 10% d'EDTA ou 5% d'acide formique (CH₂O₂) avec évaluation du point final de

décalcification (8), 20% d'EDTA pendant 7 jours sous agitation ou 10% de CH₂O₂ pendant 48h (9).

La contrainte principale de ces décalcifiants est le temps nécessaire à la décalcification de l'échantillon pour son exploitation. Des solutions commerciales proposent une alternative face à cette difficulté, tout en garantissant une préservation du prélèvement. Pour évaluer les différentes propriétés de décalcifiants en fonction de leur composition, nous proposons de comparer les effets de 4 décalcifiants commerciaux par rapport à l'EDTA sur le cartilage du genou et du disque intervertébral de souris âgées de 2 mois.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

• Préparation des échantillons pour la coupe

Les genoux et des séries de vertèbres sont prélevés sur des souris C57Bl/6J âgées de deux mois. Les échantillons sont fixés 24h dans du formol 10% tamponné (Labonord) (9). La décalcification est réalisée sous agitation lente après un rinçage en tampon phosphate salin (PBS). Les échantillons ne sont exposés à aucune source de chaleur. La vérification du point final de décalcification est effectuée par méthode chimique en utilisant la méthode d'Arnim (LUNA) (5). Brièvement, 5 ml d'hydroxyde d'ammonium à 5% et 5 ml d'oxalate d'ammonium à 5% sont ajoutés à 5 ml de la solution de décalcification où sont plongés les échantillons, puis vortexés vigoureusement. Si aucun précipité blanc d'oxalate de calcium n'apparaît au bout de 15 min d'attente, la décalcification est ache-

vée. Dans le cas contraire, la solution de décalcification doit être renouvelée jusqu'à validation du processus. Les échantillons sont alors rincés abondamment plusieurs fois dans du tampon PBS avant de poursuivre leur traitement par la déshydratation en alcools 70°, 95° et 100°, la clarification par le xylène, l'imprégnation et l'inclusion dans la paraffine. Les blocs de paraffine sont placés sur plaque froide avant d'être coupés. Des agents d'amollissement à base d'un mélange d'éthanol/acétone (Mollifex®, VWR) sont utilisés si les sections s'avèrent trop difficiles. Les lames de microtome utilisées pour la coupe sont de type S35p (MMFrance). Des sections coronales d'une épaisseur de 5 µm sont récupérées puis étalées sur lame Superfrost plus® (CML).

• Décalcifiants testés

Les décalcifiants utilisés pour cette étude sont les suivants :

- Une solution d'EDTA à 10% diluée dans l'eau distillée à pH 7.4,
- Le décalcifiant rapide DC3 (Labonord)
- Le MicroDEC (MMFrance)
- L'OsteoRAL L (RAL diagnostics)
- Le TBD-2 (Thermo Fisher Scientific)

La composition et les propriétés de ces différents décalcifiants, selon la littérature ou les fournisseurs, sont résumées dans le tableau I.

• Colorations histologiques pour la microscopie photonique

Les colorations histologiques choisies sont adaptées à l'étude du cartilage (8). Elles permettent d'évaluer au mieux l'aspect et

le contenu du tissu, tant au niveau cellulaire que de la MEC.

La coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) permet d'apprécier l'aspect général du tissu. Les noyaux sont colorés en violet. Le cytoplasme en rose-rouge et le collagène en jaune-orangé. Les lames sont déparaffinées et réhydratées (alcools 100°, 95°, 70° et eau), incubées dans l'hématoxyline de Mayer pendant 5 minutes, rincées à l'eau, bleuies par un bain de carbonate de lithium, colorées par une solution aqueuse d'éosine à 1% pendant 5 minutes. Les coupes sont déshydratées avec les alcools 70°, 95° et 100°. Une coloration dans une solution de safran alcoolique est réalisée pendant 5 minutes. Les coupes sont rincées en alcool 100° puis dans un bain de xylène pour finaliser la déshydratation avant le montage des lames en milieu organique (Pertex).

La coloration safranine O / Fast green (SO) colore les protéoglycanes en orange-rouge et le cytoplasme en gris-vert. Les lames sont déparaffinées, réhydratées, puis rincées à l'eau du robinet. Les coupes sont ensuite colorées par une solution de fast green (FCF) à 0,03 g pour 100 ml pendant 5 minutes, rincées dans une solution d'acide acétique 1% pendant 15 secondes, puis colorées par une solution aqueuse de safranine O 0,1% à pH 5,3 pendant 5 minutes. Les coupes sont rincées dans l'alcool 70°, puis déshydratées et montées entre lame et lamelle avec du Pertex.

Le rouge Sirius (RS) colore les collagènes en rouge foncé et le cytoplasme en rose-

rouge. Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont incubées 30 minutes dans une solution micro-rouge sirius à 0,1%. Les coupes sont rincées, déshydratées et montées entre lame et lamelle avec du Pertex.

• **Etude immunohistochimique : anticorps Ki-67**

Les coupes sont déparaffinées puis réhydratées. Les peroxydases endogènes sont inhibées par un bain d'eau oxygénée à 3% pendant 10 min, puis rincées soigneusement à l'eau. La restauration antigénique est réalisée par une incubation des coupes dans un tampon citrate pH 6 à 70°C toute la nuit dans un bain-marie. Les coupes sont rincées dans du PBS. Un sérum bloquant de cheval (kit ImPRESS - Vectastain) est ajouté pendant 20 minutes. Un marqueur de la prolifération cellulaire, l'anticorps anti-Ki-67 (anticorps polyclonal Novocastra – Leica) est dilué au 1/1800ème puis incubé une nuit à 4°C. Les coupes sont rincées avec du tampon PBS, l'anticorps secondaire couplé à un polymère-peroxydase (kit ImmPRESS anti-rabbit Ig - Vectastain) est déposé sur les coupes pendant 30 min. Après rinçage des lames, le chromogène (3-amino-9-ethyl-carbozol ou AEC) est ajouté jusqu'à révélation du signal. Les coupes sont rincées à l'eau, contre-colorées à l'hématoxyline de Mayer et montées en milieu aqueux. Le signal est nucléaire : les cellules positives pour l'antigène Ki67 présentent un noyau coloré en rouge, les autres cellules sont bleues.

• **Hybridation in situ : collagène II murin**
Après déparaffinage et réhydratation des

lames, les coupes sont incubées en présence d'une solution de protéinase K afin de digérer les protéines cellulaires, puis fixées dans une solution de formol 4% pendant 10 minutes. Une étape d'acétylation est ensuite réalisée pour diminuer le bruit de fond, l'acétique anhydre va modifier les groupes amines réactifs en groupes amines substitués neutres. Après rinçage dans du PBS, les coupes sont pré-hybridées dans le tampon d'hybridation pendant une heure à température ambiante. La sonde utilisée est une ribosonde collagène 2 murin marquée à la digoxygénine. Elle est diluée à raison de 5 ng/µl dans le tampon d'hybridation puis dénaturée 10 min à 75°C. La sonde est incubée une nuit à 70°C en chambre humide. Après des lavages post-hybridation en tampon salin citrate de sodium (SSC) (2xSSC + formamide) pendant 1 heure, l'anticorps anti-digoxygénine couplé à la phosphatase alcaline (Roche) dilué au 1/2500ème, est ajouté une nuit à 4°C. Après rinçage en tampon Tris-NaCl, le chromogène (NBT/BCIP) est déposé sur les coupes jusqu'à l'apparition du signal. Une légère contre-coloration à la safranine est réalisée. Le signal est bleu-violet foncé, le fond des coupes est rose pâle.

• **Microscopie électronique à balayage**

Les échantillons sont collectés à partir de prélèvements de genoux de souris C57Bl/6J. Ils sont fixés dans le glutaraldéhyde à 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pendant toute une nuit à 4°C, puis lavés avec ce même tampon pendant 10 min. Les échantillons sont décalcifiés dans les mêmes conditions que les prélèvements pour la microscopie photonique. Ils

sont post-fixés dans l'acide osmique (1%) à l'abri de la lumière pendant 1h à 4°C. Les tissus sont déshydratés dans différents bains d'alcool de concentration croissante (50°, 70°, 90° et 100°) et séchés au point critique avec une solution d'héxaméthylsilazane pendant la nuit. Les échantillons sont ensuite collés sur des supports métalliques, puis métallisés au palladium (Baltec, SCD 005), avant d'être observés au microscope électronique à balayage (Philips, XL20). Le témoin est un prélèvement n'ayant pas été décalcifié.

petites tailles, le temps de décalcification conseillé avec une solution d'EDTA à 10% est en général de 7 jours [9], de 2 à 4h pour le DC3 à base d'HCl/EDTA, de 24h pour le MicroDEC EDTA, de 5 à 8h pour l'OsteoRAL L. Le TBD-2 peut être utilisé jusqu'à 48h et même au-delà du point final de décalcification. L'argument commercial majeur des décalcifiants autres que l'EDTA est leur rapidité. Elle est associée à une préservation de l'échantillon, en particulier les sites antigéniques, pour le MicroDEC EDTA, l'OsteoRAL L et le TBD-2. (Données fournisseurs, tableau I)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

• Temps de décalcification

Le temps et l'efficacité de la décalcification dépendent de la taille du spécimen et de la pénétration du décalcifiant dans le tissu. Pour les pièces anatomiques de

En pratique, le temps de décalcification pour les genoux ou les vertèbres observé dans notre étude était du même ordre, la taille des échantillons étant très proche. Suite à l'évaluation du point final de décalcification, le temps était de : 7 jours pour

Tableau I : Les différents décalcifiants testés.

	EDTA 10% pH 7,4	DC3	MicroDEC	OsteoRAL L	TBD2
Fournisseurs		Labonord	MMFrance	RAL Diagnostics	Thermo Fisher Scientific
Composition	-EDTA	-HCL -EDTA -Surfactants non ioniques -autre ?	-EDTA -autre ?	-acide nitrique -autre ?	-acide formique -autre ?
Temps conseillé	Plusieurs jours	4-8 heures	24 heures	5-8 heures	3-12 heures
Propriétés	Préservation des acides nucléiques et de la chromatine nucléaire. (10)		Préservation des sites antigéniques pour des échantillons de petite ou moyenne taille	Prélèvements de petite taille	Préservation des tissus même si le point final de décalcification est dépassé

un traitement à l'EDTA 10%; de 4h pour le DC3 ; 24h pour le MicroDEC ; 4h pour l'OsteoRAL L et de 48 heures pour le TBD-2. Le temps évalué correspond bien aux données de la littérature et aux informations des fournisseurs. L'avantage des décalcifiants commerciaux concernant la diminution du temps de décalcification est donc clairement vérifié. Même le TBD-2, qui parmi les quatre décalcifiants testés pourrait être qualifié de lent, permet un gain de 5 jours comparé à l'utilisation de l'EDTA 10%.

• Colorations histologiques du cartilage

Les trois colorations utilisées pour l'étude du cartilage permettent dans un premier temps d'évaluer l'aspect général du tissu (HES), le contenu en protéoglycanes (SO) et enfin en fibres de collagène (RS). Les photographies en microscopie photonique sont orientées avec la face articulaire en haut et la zone d'ossification endochondrale en bas pour le genou, le *nucleus pulposus* en haut, le fibrocartilage puis la zone d'ossification endochondrale en bas pour le disque intervertébral.

Suite au traitement à l'EDTA 10%, les colorations sont nettes, parfaitement contrastées, que ce soit pour le cartilage hyalin de la surface articulaire du genou ou le fibrocartilage de disque intervertébral. La distinction des structures : noyaux, zone du cartilage, zone de d'ossification endochondrale, est bien définie avec la coloration HES. Le cartilage est plus riche en collagène au niveau des surfaces articulaires, du fibrocartilage en contact avec le *nucleus pulposus*, ou au niveau de la zone

endochondrale, mais pas dans la zone intermédiaire du cartilage vertébral, comme le montre les colorations HES et RS. En revanche, la coloration rouge intense observée par la SO montre que cette zone intermédiaire est riche en protéoglycanes, comme le cartilage hyalin (Figure 1).

Un traitement au DC3 permet d'obtenir des colorations HES et SO de bonne qualité que ce soit pour le cartilage fibreux ou hyalin. La coloration RS est moins bien contrastée. Le tissu présente un aspect lysé, cet artefact est plus marqué pour le fibrocartilage. L'utilisation de MicroDEC permet d'obtenir des coupes tissulaires moins lysées que précédemment. Cependant, les colorations sont moins contrastées que celles de l'EDTA 10%. L'OsteoRAL L semble particulièrement altérer les zones riches en protéoglycanes. Les colorations SO donnent des résultats de moins bonne qualité surtout pour le cartilage fibreux. Globalement, les structures sont moins nettes et les couleurs peu contrastées, quel que soit le type de cartilage ou de coloration. Les structures sont plus difficiles à différencier. Le TBD-2 permet d'obtenir des colorations bien contrastées mais de plus faible intensité que celles obtenues après traitement à l'EDTA 10%. Le tissu a un aspect légèrement lysé pour les colorations HES et RS, quel que soit le type de cartilage (Figure 1).

Les décalcifiants commerciaux donnent des résultats de qualité satisfaisante. Cependant, le tissu peut présenter un aspect lysé et les colorations sont moins bien contrastées. Nous observons essentielle-

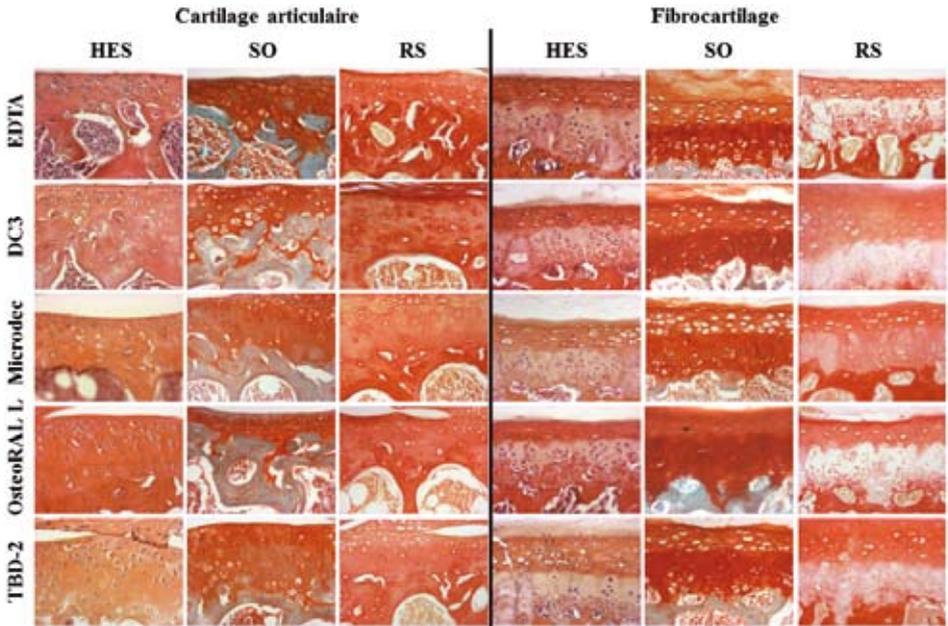


Figure 1: Colorations histologiques du cartilage articulaire de genou et de fibrocartilage de disque intervertébral (x40). Coupes de cartilage hyalin de surface articulaire et de cartilage fibreux de disque intervertébral colorées à l'hématoxyline-éosine-safran (HES), à la safranine O (SO) contre-colorée au Fast green et au rouge Sirius (RS). Les prélèvements ont été décalcifiés avec différentes solutions : EDTA à 10%, DC3, MicroDEC, OsteoRAL L et TBD-2.

ment une altération de la coloration des composants matriciels comme le collagène avec le RS ou les protéoglycanes avec la SO. Le traitement à l'aide des décalcifiants commerciaux semble donc être plus agressif qu'un traitement à l'EDTA.

• Préservation des épitopes antigéniques

Les décalcifiants s'attaquent principalement au tissu osseux et à la MEC calcifiée synthétisée par les chondrocytes hypertrophiques. Il faut concevoir que les chondrocytes ont une forte activité métabolique au niveau de la synthèse matricielle, mais cependant ne prolifèrent quasiment plus dans le cartilage sain, alors que le tissu osseux

est en remodelage constant avec une importante prolifération cellulaire.

Un marqueur de prolifération cellulaire a été analysé afin d'apprécier la préservation des sites antigéniques en immunohistochimie. L'antigène Ki-67 est exprimé dans le noyau des cellules en prolifération. Cette protéine est présente dans toutes les phases du cycle cellulaire, G1, S, G2 ou M. Le contrôle positif interne à l'échantillon est la moelle osseuse, le contrôle négatif interne étant un tissu cartilagineux systématiquement non marqué (données non présentées).

Les photographies de microscopie photonique présentent la moelle osseuse des divers échantillons. L'utilisation de notre mode opératoire en immunohistochimie montre que seuls les traitements à l'EDTA 10% et au TBD-2 permettent d'observer un signal nucléaire positif rouge signifiant la présence de l'antigène Ki-67. Le marquage de la condition EDTA 10% est plus intense que celui de la condition TBD-2, particulièrement pour le genou. Les autres décalcifiants ne permettent pas de détecter l'antigène recherché. Une légère coloration cytoplasmique des mégacaryocytes est observée sur la coupe de l'échantillon traité avec l'OsteoRAL L. Ce signal non spécifique n'est pas retrouvé dans les autres lames. (Flèches bleues) (Figure 2)

L'intégrité de l'os sous-chondral semble préservée après une décalcification à l'EDTA ou avec des solutions à base d'acide formique. Les autres traitements à base d'acide chlorhydrique ou nitrique sont trop agressifs pour conserver le site antigénique Ki-67.

• Préservation des acides ribonucléiques

Le fibrocartilage et le cartilage hyalin sont deux tissus dont la MEC est composée de fibres de collagène de type II. L'ARNm du collagène de type II est transcrit par leurs chondrocytes et est présent dans le cytoplasme de ces cellules. Le marquage par la sonde s'hybridant avec l'ARNm du Col2 est donc détecté au niveau intracellulaire. Les contrôles négatifs internes à l'échantillon sont premièrement une absence de marquage de la couche de chondrocytes hypertrophiques pour le cartilage hyalin,

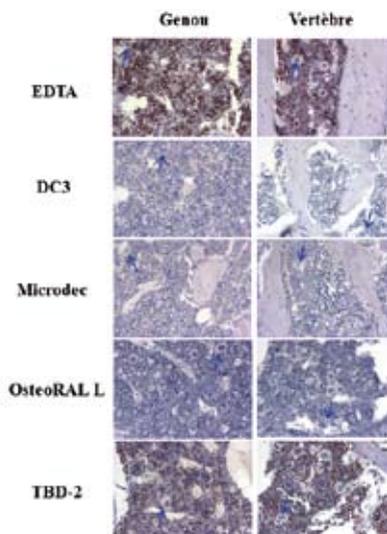


Figure 2: Marquage immunohistochimique de l'antigène Ki-67 sur coupe de tissu osseux de genou et de vertèbre (x40). Coupes de tissu osseux de genou et de vertèbres marquées par un anticorps spécifique anti-antigène Ki-67. Les flèches bleues désignent les mégacaryocytes de la moelle osseuse. Les prélèvements ont été décalcifiés avec différentes solutions : EDTA à 10%, DC3, MicroDEC, OsteoRAL L et TBD-2.

car ces cellules synthétisent essentiellement du collagène X, et deuxièmement une absence de marquage du *nucleus pulposus* constitué essentiellement de tissu adipeux, pour le fibrocartilage. Les photographies en microscopie photonique sont orientées avec la face articulaire en haut et la zone d'ossification endochondrale en bas pour le genou, avec le *nucleus pulposus* en haut, le fibrocartilage puis la zone d'ossification endochondrale en bas pour le disque intervertébral.

D'après notre technique d'hybridation in situ, seul le traitement par l'EDTA 10%

permet d'obtenir un signal net, spécifique et intense, que ce soit pour le cartilage hyalin ou fibreux. Le signal est moins fort pour le fibrocartilage, ce qui est attendu sachant que sa MEC est composée d'un mélange de collagène de type I et de collagène de type II, alors que la MEC du cartilage hyalin est faite exclusivement de collagène de type II. Les autres décalcifiants ne permettent pas de révéler la présence du transcrite du gène *Col2* selon le protocole employé. Tous les tissus présentent un aspect lysé avec parfois des structures totalement non identifiables. Un signal très faible est détecté pour les conditions DC3 et TBD-2, néanmoins le marquage n'est pas uniquement cellulaire, des traces de précipité sont détectables et s'apparentent à du bruit de fond. Les résultats pour les traitements au MicroDEC et à l'OsteoRAL L ne sont pas présentés pour le fibrocartilage du disque intervertébral, les coupes sont négatives et sont partiellement décollées. (Figure 3).

Une décalcification à l'EDTA semble être la méthode la plus appropriée pour préserver l'intégrité du tissu au niveau des acides ribonucléiques afin de détecter l'ARNm de *Col2* en hybridation in situ sur du cartilage articulaire ou du fibrocartilage.

• Altération de la surface des échantillons

La microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour l'analyse des modifications de la surface du genou provoquées par les différents décalcifiants.

Au grossissement x62, tous les échantillons présentent un aspect quasi identique avec le prélèvement contrôle. En revanche,

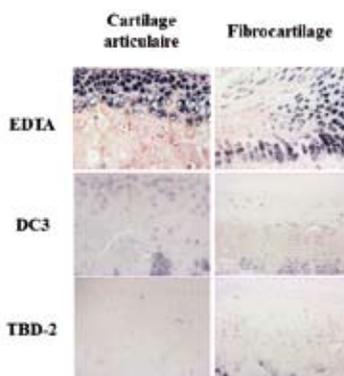


Figure 3: Hybridation in situ de la sonde ciblant le collagène de type II sur coupe de cartilage articulaire de genou et de fibrocartilage de disque intervertébral (x40). Coupes de cartilage hyalin de surface articulaire de genou et de cartilage fibreux de disque intervertébral marquées par une ribosonde ciblant l'ARNm du collagène de type II. Les prélèvements ont été décalcifiés avec différentes solutions : EDTA à 10%, DC3 et TBD-2.

des différences sont visibles au grossissement x500, les prélèvements traités avec un décalcifiant ont un aspect beaucoup plus lisse que la surface du témoin. Au grossissement x2000, les échantillons traités par le DC3, MicroDEC et OsteoRAL L présentent des altérations de la surface plus importantes. Les conditions EDTA 10% et TBD-2 semblent être les moins agressives sur la surface du tissu car les micrographies sont proches de la référence quel que soit le grossissement. (Figure 4).

Les résultats obtenus en MEB suggèrent que l'EDTA et le TBD-2 sont les décalcifiants les moins délétères au niveau de la surface du genou. La modification de la surface en fonction du traitement effectué peut expliquer les variations de résultats obtenues pour les colorations histologi-

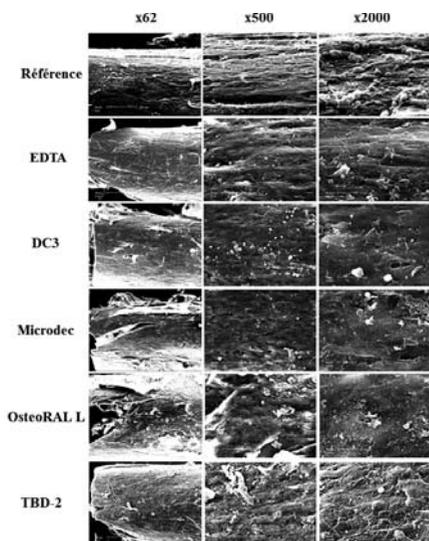


Figure 4: Microscopie électronique à balayage sur la surface de l'articulation du genou (x62, x500, x2000). Les prélèvements ont été non décalcifiés (contrôle) ou décalcifiés avec différentes solutions : EDTA à 10%, DC3, MicroDEC, OsteoRAL L et TBD-2.

ques, l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*. Les décalcifiants plus rapides sont probablement aussi plus agressifs et ont un pouvoir de pénétration plus grand que l'EDTA et le TBD-2, qui peuvent être classés parmi les décalcifiants les plus lents sur l'ensemble de ceux testés.

CONCLUSION

Les pressions actuelles exercées sur la recherche et la volonté d'obtenir des résultats de plus en plus rapidement, tendent à faire utiliser aux chercheurs des produits optimisés pour gagner du temps. L'étude du cartilage est souvent très longue et difficile en particulier pour la préparation des

échantillons lors de l'étape de décalcification. L'EDTA est un décalcifiant connu pour sa lenteur, mais aussi pour préserver de façon optimale les tissus, en particulier les protéoglycanes, il est également recommandé pour l'hybridation *in situ* (8, 10).

Le propos de notre étude était de comparer divers décalcifiants à l'EDTA, qui ont tous l'avantage d'agir beaucoup plus rapidement. Toutefois, notre étude montre que le gain de temps associé à nos modes opératoires entraîne bien souvent une altération du tissu et de ce fait, une impossibilité d'exploiter *in extenso* l'échantillon. Nous avons également observé que bien que l'EDTA soit l'agent décalcifiant le plus lent, il permet une conservation optimale de l'échantillon pour les colorations histologiques classiques, l'immunohistochimie et même l'hybridation *in situ*. Son utilisation n'est néanmoins pas une finalité et tout dépend des expériences mises en jeu. Ainsi, l'acide formique est connu pour être un décalcifiant plus rapide, tout en garantissant une bonne préservation du tissu décalcifié (8). Par exemple, le DC3 ou le TBD-2 pourront être préféré à l'EDTA pour des colorations standards, et permettre ainsi un gain de temps pour une analyse histologique simple du prélèvement tout en adaptant les colorations. De même, une fixation plus adaptée dans du paraformaldéhyde à 4% permettrait peut-être une meilleure conservation des épitopes et ainsi d'optimiser les résultats d'immunohistochimie avec les décalcifiants commerciaux (9).

BIBLIOGRAPHIE

1. ISLAM A, FRISCH B., Plastic embedding in routine histology. I: Preparation of semi-thin sections of undecalcified marrow cores. *Histopathol*, 1985, 9 (12) : 1263-1274
2. CARSON FL, HADIK C. *Histotechnology A self-instructional text*. 3rd edition, ASCP Press, Hong-Kong 2009
3. BANCROFT J.D., GAMBLE M., *Theory and practice of histological techniques*. Sixth edition, CHURCHILL LIVINGSTON, Elsevier, China, 2008
4. ROSEN A.D., End-point determination in EDTA decalcification using ammonium oxalate. *Stain Technol*, 1981. 56(1): p. 48-9.
5. LUNA L.G., *Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts*. 1992, Gaithersburg, MD: American Histolabs. 767 p.
6. BERENBAUM, F., The OARSI histopathology initiative - the tasks and limitations. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010, 18 Suppl 3: p. S1.
7. AIGNER, T., et al., Histopathology atlas of animal model systems - overview of guiding principles. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010, 18 Suppl 3: p. S2-6.
8. SCHMITZ N., et al., Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010, 18 Suppl 3: p. S113-6.
9. GLASSON S.S., et al., The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the mouse. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010, 18 Suppl 3: p. S17-23.
10. ALERS J.C., et al., Effect of bone decalcification procedures on DNA in situ hybridization and comparative genomic hybridization. EDTA is highly preferable to a routinely used acid decalcifier. *J Histochem Cytochem*, 1999. 47(5): p. 703-10.

LES DIFFÉRENTS SYSTÈMES D'AMPLIFICATION EN IMMUNOHISTOCHIMIE : AVANTAGES, INCONVENIENTS ET OPTIMISATION

*Lydie VENTEO1, Anne SUTTER2

*lydie.venteo@orange.fr

(1) *Label Histologie, 8 rue Belin, 51100 Reims*

(2) *Laboratoire d'Histologie, ICS, 1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch*

RESUME

Les techniques d'immunohistochimie permettent la mise en évidence d'antigènes tissulaires ou cellulaires grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. La visualisation des complexes antigène-anticorps se fait par l'intermédiaire de marqueurs (fluorochromes, éléments radioactifs, enzymes, quantum dots, métaux lourds...). C'est en 1966 que Nakane (1) a introduit l'utilisation d'enzymes comme systèmes de révélation pour l'immunohistochimie (IHC) en microscopie optique. Depuis les années 1970, de nombreux systèmes de détection utilisant ces enzymes couplées à des molécules amplificatrices apparaissent et permettent d'augmenter la sensibilité des techniques d'IHC. Deux enzymes sont couramment utilisées en IHC : la peroxydase de raifort et la phosphatase alcaline. A ce jour, une dizaine de systèmes d'amplification existent. La qualité des marquages obtenue va dépendre du système utilisé.

INTRODUCTION

Les enzymes utilisées en immunohistochimie

Les enzymes utilisées comme système de révélation en IHC, doivent catalyser des réactions difficilement réversibles. Elles doivent être stables, peu coûteuses, faciles à conjuguer, sans perte d'activité et présenter une activité facilement détectable.

Le substrat de ces enzymes (chromogène) est soluble et incolore. Il doit précipiter immédiatement sur place après avoir été modifié par l'enzyme. Cette attaque enzymatique le transforme en un produit coloré, insoluble qui ne doit pas diffuser dans le tissu. De nombreux chromogènes existent pour les enzymes en IHC. (Tableau I.)

Deux enzymes sont couramment utilisées en IHC, la peroxydase de raifort (POD) et la phosphatase alcaline (PAL). Cepen-

Tableau I : Chromogènes des différentes enzymes utilisées en immunohistochimie

Enzyme	Chromogène	Couleur observée	Propriétés
Horseradish Peroxydase - peroxydase de raifort (POD)	AEC	Rouge-orangé	Soluble / insoluble dans les solvants *
	DAB	Noir	Insoluble dans les solvants
	DAB + nickel	Noir	Insoluble dans les solvants
	CN	Bleu	Soluble dans les solvants
	Novared	Rouge	Insoluble dans les solvants
	VIP	Violet	Insoluble dans les solvants
	SG	Bleu-gris	Insoluble dans les solvants
	Histogreen	Vert	Insoluble dans les solvants **
Phosphatase Alcaline (PAL)	Fast blue	Bleu	Soluble dans les solvants
	Fast red	Rouge	Soluble / insoluble dans les solvants *
	New fuchhine	Rouge	Insoluble dans les solvants
	BCIP/INT	Brun	Soluble dans les solvants
	BCIP /NBT	Violet	Insoluble dans les solvants
	BCIP/TNBT	Violet	Insoluble dans les solvants
Glucose Oxydase	MPMS/NBT	Violet	Insoluble dans les solvants
	MPMS/TNMT	Noir	Insoluble dans les solvants
	MPMS/ INT	Rouge-violet	Soluble dans les solvants
β Galactosidase	X-gal	Bleu	Insoluble dans les solvants

* : ces chromogènes sont normalement solubles dans les solvants. Il existe cependant des formes insolubles trouvées dans le commerce

** : l'histogreen est un chromogène insoluble dans les solvants mais soluble en milieu aqueux.

dant, ces enzymes peuvent être présentes de façon endogène dans certains tissus biologiques et donner un signal non spécifique lors de la révélation du complexe antigène-anticorps. Il est donc nécessaire de les inhiber durant la technique d'IHC.

- Les peroxydases permettent la décomposition de l'eau oxygénée (substrat de l'enzyme). Cette activité enzymatique est présente dans toutes les hémoprotéines comme l'hémoglobine (hématies), la myoglobine (cellules musculaires), les cytochromes (polynucléaires, monocytes) et les catalases (foie et rein). L'inhibition de ces peroxydases endogènes se fait par une incubation des coupes dans un bain d'eau

oxygénée avant la réaction d'immunohistochimie.

- Les phosphatases alcalines (PAL) endogènes existent dans les tissus biologiques sous deux isoformes : les PAL intestinales et non intestinales. La forme non intestinale est présente dans le foie, le rein, l'os, le placenta, les leucocytes et certaines tumeurs. Cette isoforme est facilement inhibée par du levamisole. Les PAL intestinales résistent à cette substance.

La PAL exogène utilisée comme marqueur dans les systèmes de révélation en IHC est issue de l'intestin de veau et n'est donc pas inhibée par le levamisole. L'inhibition des PAL endogènes est réalisée par addition de

levamisole (1mM) au chromogène au moment de l'étape de révélation des immunomarquages. Seules les PAL endogènes non intestinales seront inhibées. Pour bloquer la forme intestinale endogène, une solution d'acide acétique à 1% peut être utilisée, avec précaution car elle peut endommager certains antigènes. Ce blocage à l'acide acétique est réalisé avant la réaction d'immunohistochimie. La fixation au formol et le traitement (deshydratation, clarification et imprégnation) des échantillons peuvent également éliminer les PAL endogènes.

D'autres enzymes peuvent être utilisées comme système de révélation, la glucose oxydase (enzyme végétale) et la -galactosidase (dérivée de bactéries). Ces deux enzymes ont la propriété de ne pas être

présentes dans les tissus animaux de façon endogène mais elles sont moins sensibles que la POD et la PAL. Leur utilisation doit être réservée pour la révélation d'antigènes moyennement ou fortement exprimés.

La POD reste l'enzyme la plus utilisée en IHC, elle est retrouvée dans de nombreux systèmes d'amplification.

Les différents systèmes de révélation/amplification (Figure 1)

A- Les systèmes non amplifiés

a. méthode directe

C'est la technique la plus simple, la réaction se fait en une étape. Le marqueur est directement conjugué à l'anticorps d'intérêt. Ce système est peu utilisé en microscopie optique. Les marqueurs utilisés

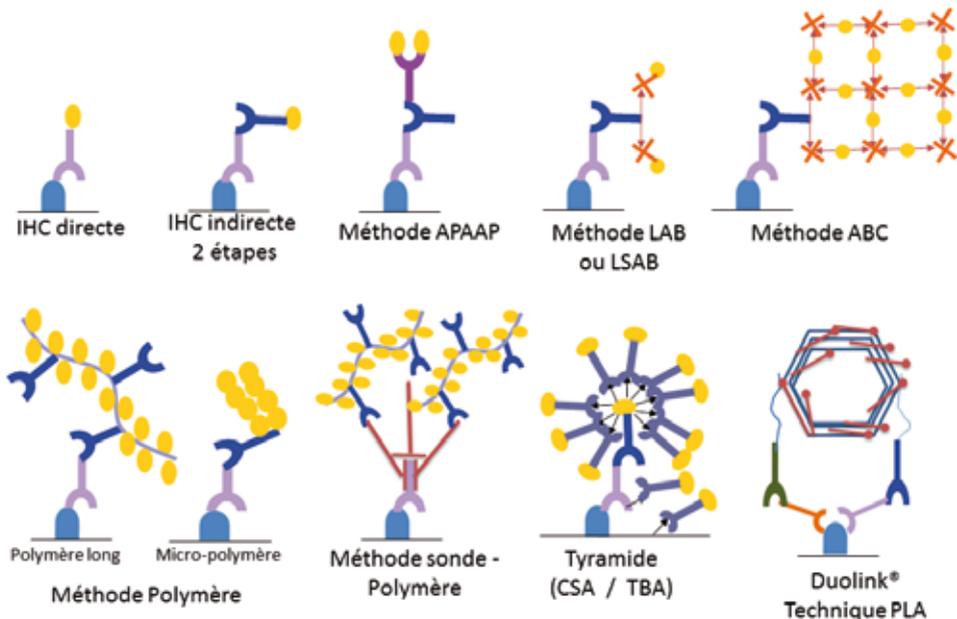


Figure 1 : schéma des différents systèmes de révélation/amplification en immunohistochimie.

sont essentiellement des fluorochromes. Cette technique est appliquée pour certains diagnostics en pathologie cutanée ou rénale.

b. technique indirecte en deux étapes

Le marqueur est couplé à l'anticorps secondaire. Les marqueurs peuvent être des enzymes, mais cette technique est régulièrement utilisée avec des fluorochromes.

C'est en 1955 que Coons (2) a augmenté la sensibilité des méthodes d'immunofluorescence en introduisant une seconde étape. La première étape consiste à incuber l'anticorps primaire, spécifique de l'antigène d'intérêt. Cet anticorps primaire n'est pas directement conjugué au marqueur mais il sera mis en évidence après liaison à un anticorps secondaire qui lui sera couplé à un marqueur. L'anticorps secondaire est dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce animale qui a donné les anticorps primaires.

B- Les systèmes faiblement amplifiés : technique PAP et APAAP

Ces techniques se font en trois étapes.

a. Technique Peroxydase Anti Peroxydase (PAP)

La technique PAP, développée par Sternberger, nécessite 3 anticorps différents (3). L'anticorps primaire spécifique de l'antigène à étudier est issu d'une espèce animale, *lapin* par exemple. L'anticorps secondaire est dirigé contre les immunoglobulines (Ig) de l'espèce animale de l'anticorps primaire (dans notre exemple anti-Ig de *lapin*). Cet anticorps secondaire

est issu d'une autre espèce animale par exemple, chèvre, mouton, cheval, âne...

Un anticorps tertiaire spécifiquement dirigé contre les peroxydases, provenant de la même espèce animale que l'anticorps primaire (dans notre exemple le *lapin*) va pouvoir se lier à l'anticorps secondaire qui est lui-même lié à l'anticorps primaire. Ce troisième anticorps est préalablement couplé à la peroxydase afin de former un complexe soluble, stable et cyclique, composé de deux molécules d'anticorps tertiaires combiné à trois molécules de peroxydase dont une qui est reconnue et liée par les deux anticorps tertiaires. Ce complexe ira se fixer sur l'anticorps secondaire anti-Ig de lapin. La peroxydase n'est pas chimiquement conjuguée à l'anticorps mais liée immunologiquement, il n'y a donc pas de perte de l'activité enzymatique. De même l'anticorps n'est pas encombré sur sa partie Fc (fragment cristallisable) par la peroxydase et garde toutes ses propriétés biologiques.

b. Technique Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase (APAAP)

Cette technique est basée sur le même principe que la technique PAP ; l'enzyme est la phosphatase alcaline. Le complexe APAAP, correspondant aux anticorps tertiaires et à la phosphatase alcaline, n'est pas cyclique comme le complexe PAP. Il est plus facile à préparer en mettant les phosphatases alcalines en excès par rapport aux anticorps anti-phosphatase alcaline. (4) Le complexe APAAP permet la liaison d'une quantité maximale de phosphatase alcaline sur l'anticorps tertiaire. L'amplification est légèrement plus faible

que pour le système PAP : 3 peroxydases liées contre deux phosphatases par complexe. Pour augmenter la sensibilité de la technique APAAP, Masson (5) recommande de réaliser une seconde application de l'anticorps secondaire après avoir mis une première fois le complexe APAAP, suivi d'une autre application du complexe APAAP.

C- Les systèmes avidine-biotine ou streptavidine-biotine:

Deux grandes techniques : LAB / LSAB et ABC qui nécessitent 3 étapes.

L'avidine est une glycoprotéine extraite de l'albumine (blanc d'œuf), qui présente quatre sites de fixation pour une vitamine de faible poids moléculaire : la biotine également appelée vitamine H. La biotine présente un seul site de fixation et une forte affinité de liaison non covalente pour l'avidine. La biotine et l'avidine peuvent être conjuguées à d'autres molécules comme des anticorps, des enzymes, des fluorochromes... et sont très utilisées dans différentes techniques d'IHC.

a. Les techniques LAB et LSAB (Labelled Avidine Biotine et Labelled Streptavidine Biotine)

L'anticorps secondaire est couplé à la biotine, il est dit biotinylé. La troisième étape correspond à l'incubation de l'avidine (ou streptavidine) couplée à des enzymes. Un grand nombre de molécules de biotine peut être fixé sur l'anticorps et donc de nombreuses molécules d'avidine-enzyme pourront se fixer et amplifier le signal.

b. La technique ABC (Avidin-Biotin-Complexe)

La technique ABC est également une technique où l'anticorps secondaire est biotinylé.

Le troisième réactif est un complexe d'avidine, biotine et peroxydase. Dans ce cas, l'enzyme est fixée à deux molécules de biotine. Les deux biotines ayant un seul site de fixation pour l'avidine, vont pouvoir se fixer à deux molécules distinctes d'avidine. Ces dernières ont quatre sites de fixation pour la biotine, elles n'auront qu'un seul site de bloqué et pourront donc fixer d'autres molécules de biotine qui elles-mêmes seront conjuguées au marqueur et à une autre biotine, et ainsi de suite, créant ainsi un énorme complexe d'amplification.

c. Marquage non spécifique des systèmes avidine-biotine

Il est à noter que l'avidine peut donner du bruit de fond par ses groupements glycosylés en se fixant sur des lectines présentes dans les tissus biologiques. Des liaisons à des molécules chargées négativement sont également possibles puisque le point isoélectrique de l'avidine est de 10. L'utilisation d'avidine modifiée permet d'éviter ces liaisons qui donneront un signal non spécifique. De même, l'utilisation de streptavidine extraite de *Streptomyces avidinii* va éviter ces liaisons. Cette protéine est semblable à l'avidine. Cependant, elle n'est pas glycosylée, elle ne se lie pas aux lectines et présente un point isoélectrique à sept. Par contre, elle contient une séquence identique à la séquence de reconnaissance de la fibrine et d'autres molécules d'adhé-

sion, qui pourrait expliquer certains marquages non spécifiques. (6)

La biotine est présente de façon naturelle dans de nombreux tissus animaux comme le foie, le rein, les surrénales, les glandes salivaires, les testicules... mais également dans certaines tumeurs comme les carcinomes rénaux, les tumeurs cortico-surréaliennes, les tumeurs salivaires... Ces biotines endogènes peuvent donner un marquage non spécifique en fixant l'avidine ou la streptavidine des réactifs d'IHC.

Durant de nombreuses années, l'opinion générale était que le nombre de faux positifs liés aux biotines endogènes dans les tissus biologiques fixés dans le formol puis inclus en paraffine était négligeable. L'inhibition des biotines endogènes n'était pas réalisée de façon systématique. Or, il a été démontré que l'utilisation des techniques de restauration antigénique par la chaleur permettait de démasquer les antigènes tissulaires, mais également les biotines endogènes. De même, l'utilisation du système d'amplification à la tyramide couplée à la biotine pouvait donner lieu à un marquage non spécifique par la liaison aux biotines endogènes. (7 et 8)

Ces marquages non spécifiques peuvent être éliminés en bloquant les biotines endogènes avant de réaliser la technique d'IHC. Il suffit d'appliquer sur les coupes une solution d'avidine non marquée. Comme la biotine ne présente qu'un seul site de fixation à l'avidine, les biotines endogènes sont donc masquées. Par contre, l'avidine qui présente quatre sites de fixation pour la biotine, n'a qu'un seul site de bloqué.

Pour saturer les trois autres sites libres qui pourraient fixer des biotines conjuguées aux anticorps secondaire et donc donner du bruit de fond, il suffit d'incuber une solution de biotine sur les coupes. (9)

D- Les systèmes avec polymères :

Il s'agit d'une technique en deux étapes, incubation de l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène d'intérêt, puis incubation de l'anticorps secondaire directement couplé au polymère sur lequel les marqueurs sont fixés. Il existe deux familles de polymères, les macropolymères et les micropolymères.

Les macropolymères sont composés d'un squelette de dextran, molécule inerte, sur lequel des anticorps secondaires et des marqueurs sont fixés. Sur certains macropolymères une dizaine d'anticorps secondaires et 70 enzymes sont présentes par polymère.

Les micropolymères sont composés de petites molécules (acide acrylique et ses dérivés...) capables de polymériser et d'emprisonner des enzymes et des anticorps sans augmenter énormément le poids et la taille du complexe, pour pouvoir pénétrer dans la cellule.

Ces micropolymères sont de plus petite taille que les macropolymères ils pénètrent plus facilement dans les cellules et donnent de meilleurs résultats. (10)

Comme les polymères sont des molécules inertes, la théorie veut qu'il n'y ait pas de liaison non spécifique. Cependant, Vyberg a observé des marquages non spécifiques dans le collagène, le muscle lisse et dans les noyaux pour les macropolymères. (11)

Pour les micropolymères, un marquage cytoplasmique non spécifique a également été reporté. (10)

La technique sonde-polymère est un autre système d'amplification en trois étapes. Après incubation de l'anticorps primaire, une sonde peptidique est incubée sur les coupes de tissus biologiques. Un anticorps couplé au polymère-peroxydase ira se fixer sur la sonde.

E- Les systèmes à la tyramide :

Egalement appelé TSA (Tyramine Signal Amplification), CARD (CAtalysed Reporter Deposition), CSA (Catalysed Signal Amplification) et TBA (Tyramine-Based Amplified).

La clé de cette méthode de détection est un tout petit composé phénolique appelé tyramine, qui possède deux groupes réactifs et qui précipite après oxydation. La tyramine contient à une extrémité un groupement amine (NH₂), qui se lie au marqueur des systèmes de détection (biotine, fluorochrome, haptène...) et à l'autre extrémité un groupement hydroxyl (OH). Quand le marqueur est couplé au groupement amine, la molécule s'appelle tyramide. En présence d'une peroxydase et d'eau oxygénée, la tyramide devient active. Son groupement hydroxyle est capable de se lier au premier groupement amine de toutes les protéines du tissu biologique et essentiellement à ceux de la tyrosine. Comme il y a un grand nombre de résidus de tyrosine autour de l'antigène, les molécules de tyramide activées vont pouvoir se lier autour de l'an-

tigène. Les autres molécules de tyramide activées non liées au complexe antigène-anticorps, peuvent se lier entre elles et seront éliminées lors des lavages. (12, 13)

F- Le système duolink® ou la technologie PLA (Proximity Ligation Assay):

Ce système met en évidence de façon spécifique une protéine ou permet d'étudier les relations entre deux protéines. Deux anticorps primaires issus d'espèces d'animaux différentes (par exemple souris et lapin) sont incubés sur les coupes tissulaires. Dans le cas de l'étude d'une protéine unique, les deux anticorps sont spécifiques à deux épitopes différents de la molécule d'intérêt. Pour l'étude de la relation entre deux protéines, un anticorps est spécifique de la première protéine et l'autre anticorps de la deuxième protéine.

Les anticorps secondaires sont spécifiques des immunoglobulines des deux espèces animales des anticorps primaires (anti-Ig de lapin et anti-Ig de souris). Ces anticorps secondaires sont couplés à un brin d'ADN de séquence unique. Un fragment d'ADN circulaire est ajouté. Les brins d'ADN des anticorps secondaires vont pouvoir s'hybrider sur l'ADN circulaire, si et seulement si, les deux anticorps sont proches l'un de l'autre (distance inférieure à 40nm). Une fois l'ADN hybridé, une ligase va lier les sondes ADN des anticorps secondaires avec l'ADN circulaire. Une réaction d'amplification est ensuite réalisée par une polymérase. Le système est ensuite révélé par des sondes marquées (fluorochrome ou peroxydase). Cette technique est intéressante pour étudier les connexions entre deux

protéines (14). Cependant sa mise au point est complexe notamment dans le choix des anticorps primaires qui doivent avoir une affinité équivalente.

COMPARAISON DE DIFFERENTS SYSTEMES D'AMPLIFICATION

Matériel et méthodes

Six systèmes de détection ont été testés sur du pancréas normal de souris avec un marqueur de la prolifération cellulaire, l'anticorps anti-Ki67 (polyclonal de lapin, Novocastra) afin d'évaluer leur niveau d'amplification.

Le pancréas est fixé dans du formol 10% pH 7,4 pendant 24 heures à température ambiante. Les échantillons sont ensuite déshydratés et inclus en paraffine. Des coupes de 3µm sont étalées sur des lames superfrost plus® et séchées à 54°C pendant une nuit. Après déparaffinage et réhydratation, les coupes sont incubées dans une solution d'eau oxygénée à 3% pendant 10 minutes pour l'inhibition des peroxydases endogènes. La restauration antigénique est réalisée par incubation des coupes dans du tampon citrate à pH6 dans un bain-marie à 94°C pendant 40 minutes puis 20 minutes à température ambiante. L'incubation avec l'anticorps anti-Ki67 est réalisée à 4°C pendant 16 heures. Ces paramètres sont identiques pour tous les systèmes d'amplification testés. Seule une gamme de dilution de l'anticorps anti-Ki67 a été réalisée afin de déterminer la dilution adéquate pour chaque type d'amplification.

Les systèmes d'amplification étudiés correspondent à un anticorps de chèvre anti-Ig de lapin directement couplé à une peroxy-

dase ou système indirect à deux étapes (PerkinElmer), un système LSAB (Abcam), système ABC (Vector), système micro-polymère (impress, Vector), système sonde-polymère (Mach3, Biocare medical) et un système à la tyramide couplé à un haptène (dinitrophenyl ou DNP) (PerkinElmer).

Le blocage des biotines endogènes a été réalisé pour les systèmes utilisant la biotine (LSAB et ABC). Brièvement, une solution d'avidine est incubée 15 minutes sur les coupes, après rinçage en tampon PBS, une deuxième solution de biotine est incubée 15 minutes (kit avidin/biotin blocking Vector). La technique d'immunohistochimie est réalisée après rinçage des lames.

Résultats

Pour chaque système d'amplification, différents paramètres ont été analysés : le temps technique, le nombre d'étapes du système d'amplification, la complexité de la mise au point et le prix sont résumés dans le Tableau II. La qualité de l'amplification (dilution de l'anticorps primaire) obtenue dans des conditions techniques classiques et le bruit de fond observé sont présentés dans le Tableau III. Les différents avantages et inconvénients de ces systèmes sont résumés dans le Tableau IV.

L'anticorps secondaire directement couplé à une peroxydase (système indirect à deux étapes) présente la plus faible amplification (Ki67 au 1/400ème), suivi du système LSAB (Ki67 au 1/600ème). Le système ABC, le micro-polymère et le système sonde-polymère présentent une amplification équivalente (Ki67 au 1/800ème). La tyramide reste le meilleur système d'amplification mais la mise au point est plus

Tableau II : Comparaison des propriétés techniques des différents systèmes d'amplification

Système d'amplification	Système Indirect à 2 étapes	Technique LSAB	Technique ABC	Technique micro-polymère	Technique sonde-polymère	Technique tyramide
Temps incubation du système	30 minutes	30 minutes	70 minutes	30 minutes	30 minutes	150 minutes
Nbre d'étapes du système	1	2	2	1	2	3
Nbre d'étapes avec lavages et révélation	7	10 + 4*	10 + 4*	7	10	18
Complexité de la technique	+	++	++	++	++	+++++
Prix du système	+	+(+)	++	+++	++++	+++++

* : étapes pour l'inhibition des biotines endogènes

Tableau III : Qualité de l'amplification des différents systèmes d'amplification, exemple avec un anticorps anti-Ki67

	Système Indirect à 2 étapes	Technique LSAB	Technique ABC	Technique micro-polymère	Technique sonde-polymère	Technique tyramide
Ki67 dilution optimale	1/400	1/600	1/800	1/800	1/800	1/6000
Qualité de l'amplification	+	++	+++	+++	+++	+++++
Bruit de fond observé	Effet de bord +++	- *	- *	-	++ vaisseaux et trame	++ Trame et cytoplasme

* : négatif si blocage des biotines endogènes

Tableau IV : Avantages et inconvénients des différents systèmes d'amplification

	Système Indirect à 2 étapes	Technique LSAB	Technique ABC	Technique micro-polymère	Technique sonde-polymère	Technique tyramide
Avantages	-rapidité -prix	-rapidité -prix	-amplification correcte -rapport qualité / prix +++	-amplification correcte -rapide	-amplification correcte -rapide	-amplification ++++
Inconvénients	-faible amplification -BDF possible	-faible amplification -BDF possible*	-BDF possible* -temps	-BDF possible** -prix	-BDF possible -prix	-mise au point -prix -temps -BDF possible

* : bruit de fond lié aux biotines endogènes possible

** : bruit de fond observé par Ramos-Vara (10)

délicate (Ki67 au 1/6000ème). La qualité et l'intensité du signal sont identiques quel que soit le système. Le nombre de cellules positives est identique pour chaque système d'amplification. (Figure 2) Au niveau du bruit de fond, un effet de bord (marquages nucléaire et cytoplasmique à la périphérie du tissu) est observé avec le système indirect à deux étapes quelles que soient les conditions utilisées.

La technique sonde-polymère montre un marquage non spécifique de la trame et des capillaires quelle que soit la dilution de l'anticorps primaire utilisée et même en absence d'anticorps primaire. Pour l'amplification à la tyramide un marquage cytoplasmique non spécifique a été observé dans les îlots de Langerhans. (Figure 3)

Aucun bruit de fond n'a été observé pour les techniques qui utilisent la biotine (LSAB et ABC), l'inhibition des biotines endogènes ayant été réalisée au préalable. A l'inverse de Ramos-Vara (10), nous n'avons pas observé de signal non spécifique pour la technique micro-polymère.

L'étude de la sensibilité des systèmes de révélation a été réalisée à partir de cette observation : pour une dilution d'un anticorps primaire donné, si le temps d'incubation des réactifs du système d'amplification est augmenté, un marquage non spécifique est observé. (Figure 4) Il est donc possible d'augmenter la dilution de l'anticorps primaire pour faire disparaître le bruit de fond observé. (Figure 5) En effet, il s'agit

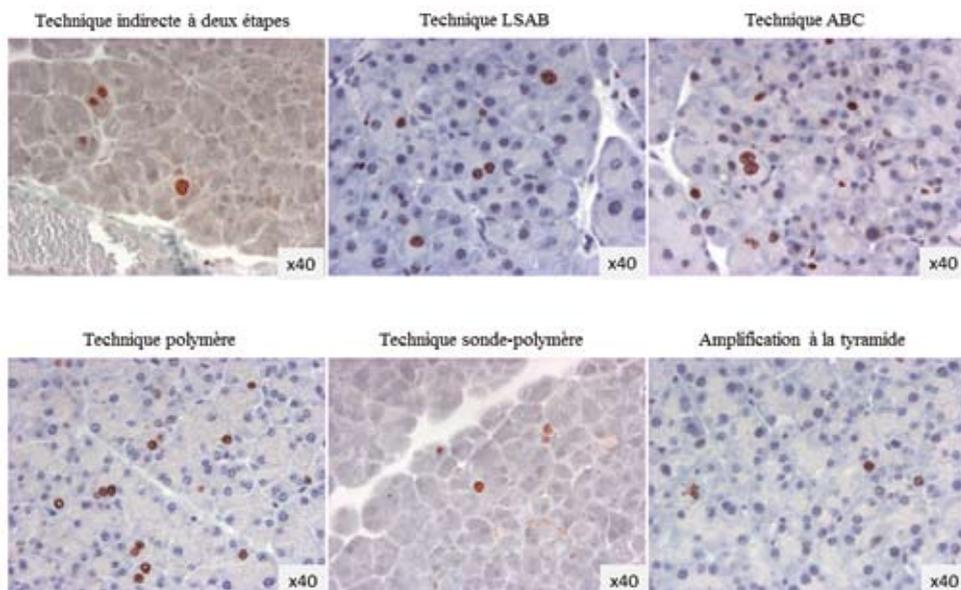


Figure 2 : marquage Ki67 avec les différents systèmes d'amplification testés : système indirect à deux étapes (Ki67 au 1/400ème), technique LSAB (Ki67 au 1/600ème), technique ABC (Ki67 au 1/800ème), technique polymère (Ki67 au 1/800ème), technique sonde-polymère (Ki67 au 1/800ème) et technique à la tyramide (Ki67 au 1/6000ème).

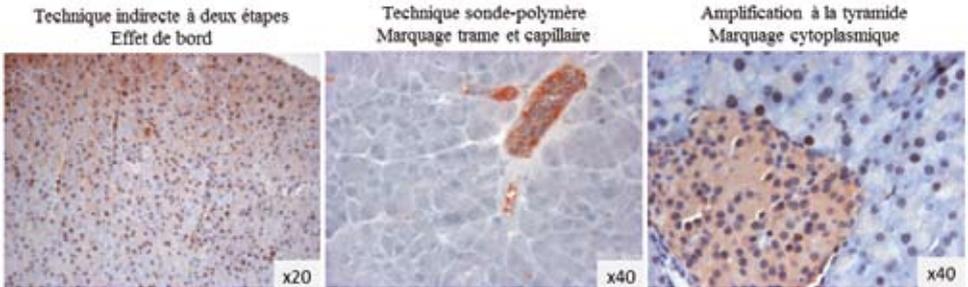


Figure 3 : bruit de fond observé avec différents systèmes d'amplification : effet de bord pour le système indirect à deux étapes, marquage des capillaires et de la trame pour le système sonde-polymère, marquage cytoplasmique au niveau des îlots de Langerhans pour l'amplification à la tyramide.

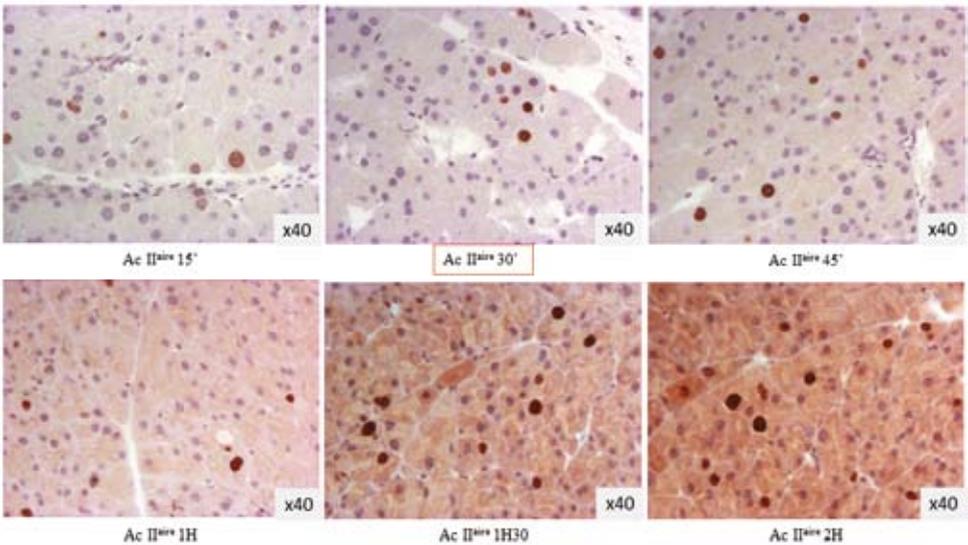


Figure 4 : augmentation du temps d'incubation des réactifs du système d'amplification avec polymère pour une dilution donnée de Ki67 (1/800ème).

15 minutes d'incubation : signal positif de faible intensité. 30 minutes (temps préconisé) : marquage nucléaire intense. 45 minutes : marquage nucléaire intense, observation d'un léger bruit de fond. 1 heure, 1 heure 30 et 2 heures : marquage nucléaire intense et bruit de fond de plus en plus important.

d'une réaction antigène – anticorps et il est nécessaire de trouver un équilibre entre le temps d'incubation, la dilution des différents anticorps et la température pour obtenir un signal spécifique. La sensibilité des différents systèmes

d'amplification, excepté le système à la tyramide, a été étudiée en augmentant le temps d'incubation des réactifs du système d'amplification par 2 ou par 4. Une gamme de dilution de l'anticorps anti-Ki67 a été réalisée afin d'évaluer la sensibilité de cha-

que technique. L'augmentation du temps d'incubation de ces différents réactifs a permis de doubler la dilution de l'anticorps primaire pour la majorité des systèmes analysés, tout en conservant une excellente qualité de marquage et sans observer une augmentation du bruit de fond. (Tableau V)

Après optimisation des techniques, l'anticorps directement couplé à une peroxydase reste la technique ayant la plus faible amplification (Ki67 au 1/800ème), suivi du système LSAB (Ki67 au 1/1000ème). Le système ABC et le polymère présentent une amplification équivalente (Ki67 au 1/1500ème). Le système sonde-polymère montre une amplification supérieure à ces systèmes (Ki67 au 1/2500ème), mais un marquage non spécifique est observé quel que soit le temps d'incubation du système.

La tyramide reste le meilleur système d'amplification.

CONCLUSION

Il existe une dizaine de systèmes de révélation en immunohistochimie. Leur niveau d'amplification est variable ainsi que leur complexité d'utilisation et l'observation de bruit de fond. Il est important de connaître le principe du système utilisé au laboratoire pour adapter la technique afin de limiter l'apparition de signal non spécifique, par exemple réaliser une étape de blocage des biotines endogènes dans le cas d'utilisation d'un système LSAB ou ABC. De même, il est indispensable de tester les systèmes d'amplification pour connaître leurs limites et optimiser la qualité des marquages réalisés.

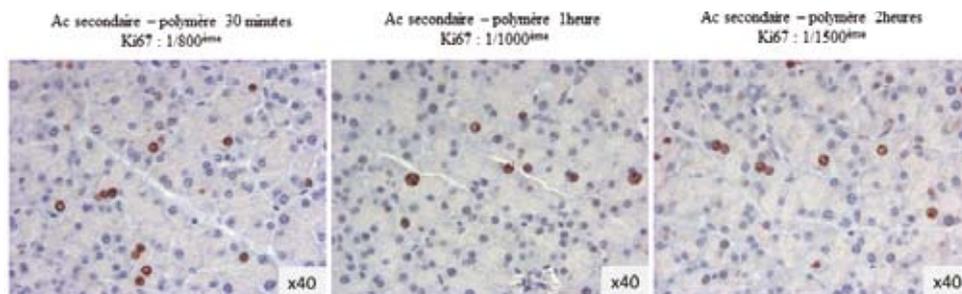


Figure 5 : étude de la sensibilité des systèmes d'amplification : augmentation du temps d'incubation des réactifs du système d'amplification et ajustement de la dilution de Ki67 afin d'obtenir un signal de bonne qualité.

Tableau V : Comparaison des dilutions de Ki67 pour chaque système avant et après optimisation des protocoles.

Conditions des systèmes d'amplification	Sy. Indirect 2 étapes	LSAB	ABC	Micro-Polymère	Sonde-polymère
Dilution de Ki67 en conditions normales	1/400	1/600	1/800	1/800	1/800
Dilution de Ki67 après optimisation	1/800	1/1000	1/1500	1/1500	1/2500

BIBLIOGRAPHIE

1. NAKANE P.K., PIERCE GB Jr. : Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem.* 1966, 14(12), 929-31.
2. COONSA.H., LEDUCE.H., CONNOLLY J.M.: Studies on antibody production. I : a method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* 1955, 102, 49-60.
3. STERNBERGER L.A., HARDY P.H., CUCULIS I.J., MAYER H.G.: The unlabeled antibody – enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem.* 1970, 18(5), 315-333
4. CORDELL J.L., FALINI B., ERBER W.N., GHOSH A.K., ABDULAZIZ Z., MAC DONALD S., PULFORD K.A.F., STEIN H, MASON D.Y.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* 1984, 32, 219-222.
5. MASSON D.Y.: Immunocytochemical labeling of monoclonal antibodies by the APAAP immunoalkaline phosphatase technique. In *Techniques in immunocytochemistry.* vol3, edition GR Bullock, P Petrusz, Academic Press, New York, 1985
6. ALON R., BAYER E.A., WILCHEK M.: Streptavidine contains an RYD sequence which mimics the RGD receptor domain of fibronectin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 170, 1236-1241.
7. BUSSOLATI G., LEONARDO E.: Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 2008, 61, 1184–1192.
8. KIM S.H., JUNG K.C., SHIN Y.K., LEE K.M., PARK Y.S., CHOI Y.L., OH K.I., KIM M.K., CHUNG D.H., SON H.G., PARK S.H.: The enhanced reactivity of endogenous biotin-like molecules by antigen retrieval procedures and signal amplification with tyramine. *The Histochemical Journal* 2002, 34, 97–103.
9. WOOD G.S., WARNKE R.: Suppression of endogenous avidin-biotin activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. *J. Histochem. Cytochem.* 1981, 26, 1196-1204.

10. RAMOS-VARA J.E, MILLER M.A.: Comparison of two polymer-based immunohistochemical detection systems: ENVISION+™ and ImmPRESS™. *J. Microsc.*, 2006, 224, 135-9
11. VYBERG M, NIELSEN S.: Dextran Polymer Conjugate Two-Step Visualization System for Immunohistochemistry: A Comparison of EnVision+ With Two Three-Step Avidin-Biotin Techniques. *Appl. Immunohistochem.*, 1998, 6, 3-10.
12. BURRY R.W.: A practical guide for biomedical research. Springer, New York, 2010
13. BUCHWALOW I.B., BOCKER W.: Immunohistochemistry basics and methods. Springer Berlin 2010.
14. BROBEIL A., BOBRICH M., GRAF M., KRUCHTEN A., BLAU W., RUMMEL M., OESCHGER S., STEGER K., WIMMER M.: PTP1B51 is phosphorylated by Lyn and c-Src kinases lacking dephosphorylation by PTP1B in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2011, 35(10), 1367-75.

ETUDE DE L'ORGANISATION CELLULAIRE D'UN TISSU DE PLANTE PAR COLORATION A L'IODURE DE PROPIDIUM

Marina BUREAU, Jérôme MUTTERER, *Mathieu ERHARDT

*Mathieu.erhardt@ibmp-cnrs.unistra.fr

*Plateforme de microscopie, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, UPR
2357,
12 rue du général Zimmer, 67084 Strasbourg cedex*

RESUME

L'analyse structurale d'un tissu végétal et la mise en évidence du profil d'expression d'un gène peuvent être réalisées sur des coupes sériées d'un objet inclus dans une résine. Les images obtenues par microscopie électronique ou photonique nous renseignent alors sur l'organisation cellulaire de notre échantillon dans un espace en 2 dimensions. Une analyse histologique en 2 dimensions de l'objet nécessitera l'utilisation de procédures fastidieuses d'alignement des images.

Une alternative à cette technique difficile à mettre en œuvre est l'analyse par microscopie photonique d'un tissu coloré au pseudo-Schiff-iodure de propidium (PS-IP). Ce colorant fluorescent spécifique de la paroi végétale, couplé à des agents éclaircissants, permet d'imager par mi-

croscopie confocale, l'ensemble des organes de plante sur une profondeur supérieure à 200 micromètres. La reconstruction en 3 dimensions de l'organe sera obtenue à partir des différentes sections optiques. Plus simplement, il est aussi possible de colorer à l'IP des tissus frais afin de localiser une protéine d'intérêt couplée à un autre marqueur fluorescent. Grâce à cette technique simple et rapide nous pouvons étudier simultanément l'architecture d'un tissu végétal et la localisation d'une molécule, sans devoir maîtriser les techniques d'inclusion et de microtomie.

INTRODUCTION

L'arrangement des cellules dans un tissu végétal est difficile à observer. La lumière doit franchir de multiples barrières, cytoplasme, vacuole et paroi, avant d'at-

teindre la lentille de l'objectif. Une observation directe d'un tissu végétal n'est donc pas possible sans générer de nombreuses aberrations liées aux indices de réfractifs des différents milieux. L'éclaircissement est donc une étape clé pour l'observation d'un tissu végétal (1).

Une première méthode consiste à utiliser le réactif de Gazet du Chatelier (2). Ce réactif permet d'éclaircir les tissus et d'observer l'échantillon en microscopie à fond clair. L'épaisseur du tissu découpé à main levée et l'absence de marqueurs fluorescents excluent l'utilisation de la microscopie confocale pour imager l'échantillon. Cette méthode, tout comme la méthode de décoloration à l'alcool n'est applicable qu'aux échantillons fins (50 µm).

La méthode « fixation/inclusion en paraffine/coupe/coloration au bleu de toluidine » a longtemps été l'unique technique permettant d'observer le cœur des organes. Chaque tranche épaisse de 10-20 µm est imagée. Pour reconstituer l'objet dans ses 3 dimensions, la collection d'images obtenues doit être ordonnée et alignée.

Cette méthode fastidieuse, dont la difficulté est l'obtention d'une série complète de coupes, peut aujourd'hui être contournée par la technique de coloration au réactif pseudo-schiff-iodure de propidium (PS-IP). Cette technique combine l'utilisation d'agents éclaircissants, d'un colorant fluorescent spécifique de la paroi (PS-IP) et de la microscopie confocale.

MATERIEL ET METHODES

Plantules, racines, feuilles :

Découper les différents organes de la plante à l'aide d'une lame de rasoir. Placer les échantillons dans le fixateur : méthanol 50% - acide acétique 10%, 12h à 4 °. A ce stade les échantillons peuvent être conservés pendant un mois. Après fixation, les échantillons sont perméabilisés, par chauffage à 60°C dans une étuve avec une solution d'éthanol 80%. Cette étape est omise pour les racines.

Pour éviter d'abîmer les échantillons, il est préférable d'utiliser un tamis cellulaire (panier à filtre) qui est successivement déplacé de solution en solution dans une plaque de culture cellulaire, six puits. La stabilisation des échantillons fragilisés par l'étape chauffage/alcool est obtenue par une seconde fixation dans un mélange méthanol 50% - acide acétique 10%, 1 heure à température ambiante. La coloration des polysaccharides de la paroi cellulaire est ensuite réalisée en trois étapes : (i) Traitement à l'acide périodique 1% (40 min à température ambiante), (ii) Rinçage à l'eau (3x10 min) et (iii) Incubation dans le PS-IP (100mM métabisulfite de sodium, 0,15N HCl, Iodure de propidium 100 µg/ml). Une fois les tissus colorés en rouge (minimum 1h), l'excédant de colorant est éliminé à l'aide d'une solution de chloral hydrate (4g d'hydrate de chloral, 1ml glycérol, 2ml eau). Les tissus peuvent ensuite être montés entre lame et lamelle avec la solution de chloral hydrate et observés au microscope confocal (Iodure de Propidium : longueur d'onde d'excitation maximale 535 nm, longueur d'onde d'émission maximale 617 nm) (3).

Embryons et siliques :

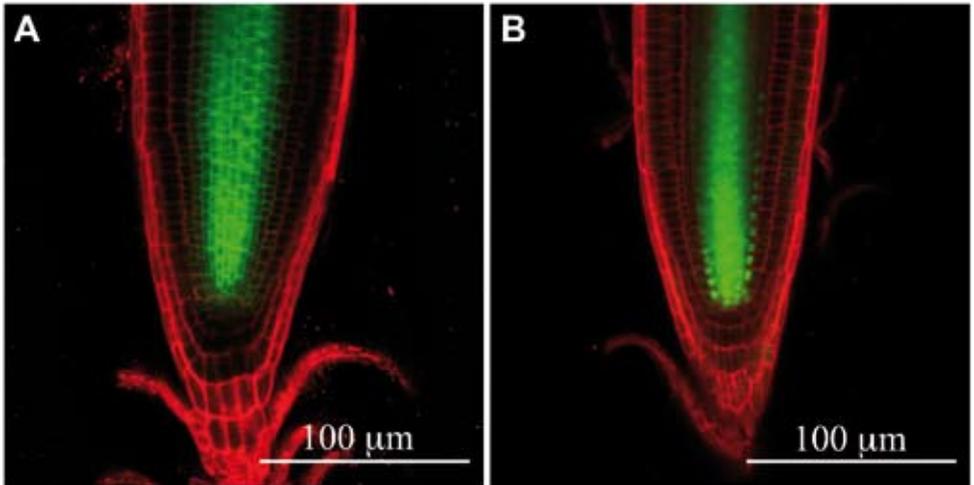
Pour faciliter la pénétration des différentes solutions, les siliques sont coupées aux deux extrémités. Après l'étape de fixation (méthanol 50% - acide acétique 10%) les échantillons sont incubés durant une nuit dans une solution NaOH 0,2N - 1%. Le protocole est ensuite identique à celui des plantules et feuilles (voir ci-dessus). Pour extraire les embryons, la silique est collée sur une lame à l'aide d'un ruban adhésif double face et ouverte sur toute sa longueur. Une fois les deux valves séparées, les graines en formation sont raclées avec une aiguille et déposées dans le fixateur. Les graines sont ensuite dilacérées avec deux aiguilles. Le broyat obtenu, contenant les embryons, est aspiré et déposé sur un tamis cellulaire (taille 40µm). Les embryons sont traités avec les solutions décrites précédemment.

RESULTATS

Organisation tissulaire d'une feuille d'*Arabidopsis thaliana* : iodure de propidium vs bleu de toluidine

Le bleu de toluidine est un colorant non spécifique qui met en évidence les noyaux, la paroi pectocellulosique et les chloroplastes. Il agit aussi bien sur le tissu frais que sur le tissu fixé. Non fluorescent, il ne peut pas être visualisé par microscopie confocale. La Figure 1A représente une coupe transversale de 10 µm d'une feuille d'*Arabidopsis thaliana*, colorée au bleu de toluidine et observée par microscopie à fond clair.

Pour la méthode de coloration au PS-IP, c'est le positionnement de l'échantillon entre lame et lamelle qui préjugera de l'orientation des coupes optiques obtenues par microscopie confocale. Les différents tissus de la feuille sont imagés à l'aide d'un microscope LSM 700 Zeiss.



Figures 1 : Analyse structurale d'une feuille d'*Arabidopsis thaliana* après coloration au bleu de toluidine (A) et au pseudo-Schiff-iodure de propidium (B-F). Barre d'échelle 100 µm.

Le marqueur PS-IP est excité à 555 nm, et le signal d'émission est filtré à l'aide d'un LP 566 nm. L'épaisseur de la section optique de 2 μm permet de voir individuellement l'épiderme supérieur (Figure 1B), le parenchyme palissadique (Figure 1C), le parenchyme lacuneux (Figure 1D) et l'épiderme inférieur avec un signal bruité dû à l'épaisseur de l'objet (Figure 1E). Le volume de la feuille (Figure 1F) est reconstitué à partir des 43 images acquises sur toute l'épaisseur.

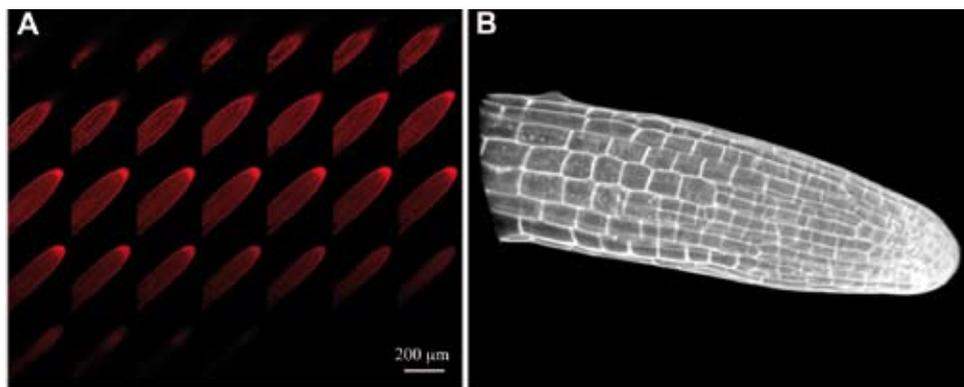
Construction d'une image en 3D à partir d'une série de coupes optiques : exemple d'une pointe racinaire.

Les racines sont obtenues à partir de plantules issues de graines semées sur milieu gélosé. L'absence de chlorophylle et la présence d'une zone méristématique font de la racine un matériel végétal facile à étudier. Les racines traitées et colorées au PS-IP sont placées entre lame et lamelle et observées à l'aide d'un microscope confocal. L'acquisition de 35 images dans l'axe

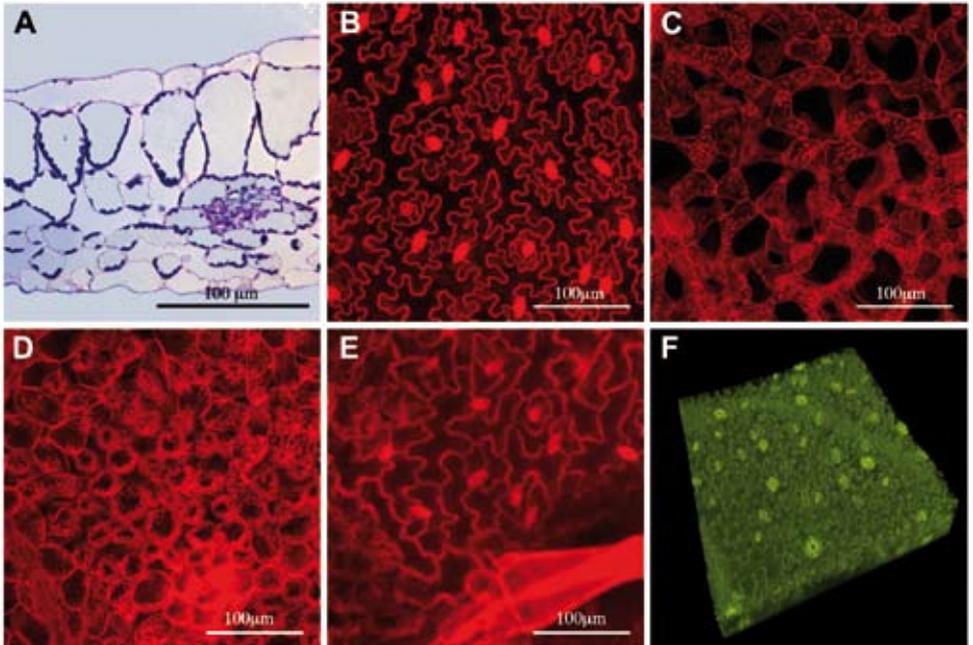
Z permet d'étudier la répartition cellulaire de la pointe racinaire sur toute son épaisseur (Figure 2A). La reconstruction dans les 3 dimensions a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (Figure 2B). On distingue la coiffe suivie de la zone méristématique formée de cellules régulières et enfin, la zone d'élongation avec des cellules allongées.

Mise en évidence d'un pattern d'expression d'un gène dans la racine.

La présence d'agents dénaturants (fixateur, agents éclaircissants) dans le protocole de coloration PS-IP n'est pas compatible avec la évidence des marqueurs fluorescents de type Green Fluorescent Protein (GFP). Si toutefois l'on souhaite visualiser simultanément le pattern d'expression d'un gène fusionné à la GFP et le pourtour des cellules, il est possible de colorer, avec une efficacité moindre, la paroi pectocellulosique avec de l'iodure de propidium. Pour ne pas être gêné par l'autofluorescence de la chlorophylle, il sera préférable de travailler sur les pointes de racines. Les



Figures 2 : Reconstruction d'une pointe de racine (B) à partir d'une collection de coupes optiques (A). Barre d'échelle 200 μm .



Figures 3 : Racine colorée à l'iodure de propidium gène d'intérêt fusionné à la GFP : promoteur PIN FORMED: PIN FORMED-GFP (A), promoteur SHORT ROOT: SHORT ROOT-GFP (B). Barre d'échelle 100 µm.

figures 3A et 3B illustrent la combinaison iodure de propidium – GFP avec la mise en évidence des cellules de la stèle (Figure 3A), ou de la stèle, de l'endoderme et des cellules quiescentes (Figure 3B).

CONCLUSION

La technique de coloration à l'iodure de propidium est une coloration rapide et facile à mettre en œuvre. Elle est applicable à tous les organes de plante. L'analyse structurale des tissus nécessite l'utilisation d'un microscope confocal. Les limites de la technique sont donc liées à l'épaisseur (environ 300 µm) et à la bonne qualité de la préparation de l'échantillon. Grâce aux images 2D collectées le long de l'axe Z il

est facile de cibler la zone d'intérêt dans un échantillon et d'en étudier sa structure. Ces différentes sections optiques peuvent également servir à la reconstruction de l'organe dans ses 3 dimensions. Cette technique simplifie grandement l'analyse structurale d'un échantillon qui était jusqu'à présent liée à l'obtention de coupes sériées au microtome. Enfin, il est possible d'ajouter, à l'information structurale fournie par la coloration PS-IP, une information de localisation de gène d'intérêt fusionné à la GFP ou au marqueur β -glucuronidase (GUS) (4). Pour toutes ces raisons, cette technique est devenue une technique incontournable pour l'analyse structurale d'un échantillon végétal.

BIBLIOGRAPHIE

1. HASELOFF J. Old botanical techniques for new microscopes. *BioTechniques*, 2003, 34 : 1174-1182
2. ROHFRIETSCH O. Etude de la structure du végétal à l'aide de techniques simples. *Rev. Fr. Histotechnol.*, 1992, 5 : 31-35
3. TRUERNIT E., BAUDY H., DUBREUCQ B., GRANDJEAN O., RUNIONS J., BARTHELEMY J., PALAUQUI J-C. High-resolution whole-mount Imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of phloem development and structure in *Arabidopsis*. 2008, *Plant cell*, 20 : 1494-1503
4. PAUTOT V., DOCKX J., HAMANT O., KRONENBERGER J., GRANDJEAN O., JUBLOT D., TRAAS J. KNAT2 : Evidence for a link between knotted-like genes and carpel development. *Plant Cell* 2001, 13 : 1719-1734.

« UN UNIVERS INVISIBLE À L'ŒIL HUMAIN » AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

*Nadia MESSADDEQ

nadiame@igbmc.fr

*Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U 964,
CNRS UMR1704, Université de Strasbourg, 67404 Illkirch, France.*

RÉSUMÉ

Une grande partie de la beauté et de la complexité du monde qui nous entoure échappent à notre perception. L'air, l'eau, le sol, notre propre organisme et les objets de la vie quotidienne abritent une infinité de formes et d'êtres vivants. La Microscopie Electronique (ME) nous révèle cet univers invisible à l'œil, au travers d'images surprenantes. Tous les mondes peuvent être explorés : l'animal, le végétal, le corps humain, les cellules, les micro-organismes, le minéral, le monde industriel... Derrière l'approche technologique de la ME, il y a un travail considérable, long et délicat qu'est la préparation des échantillons biologiques, nécessitant un matériel lourd et coûteux et un personnel qualifié.

Nous présentons ici le principe général de la ME avec les étapes de préparation nécessaires à l'obtention d'images interprétables et les différents artefacts qu'il est possible de rencontrer.

INTRODUCTION

Le terme « microscope » dérive du grec signifiant observer le petit (mickos = petit et skopein = observer, examiner). Jadis, grâce à notre expérience sensorielle quotidienne, nous avons appris à connaître le monde qui nous entoure. Notre vision joue un rôle important, voire primordial, dans l'exploitation de notre environnement. Mais si riche soit elle, cette perception visuelle n'offre qu'un champ limité d'exploration et depuis longtemps l'homme s'est ingénié à réaliser des outils permettant de dépasser ces limites et d'explorer l'inconnu au niveau de l'infiniment petit. Le premier outil développé est la loupe pour agrandir un objet, puis le microscope photonique qui permet de grossir 100 fois les détails les plus petits et les plus fins visibles à l'œil nu. En 1931, Ruska et Knoll construisent le premier prototype de Microscope Electronique à Transmission (MET). Bien que pour ce premier instrument, le grossis-

sement maximal des objets était de quatre cent fois, il a montré les caractéristiques d'un microscope électronique. Deux ans plus tard, Ruska construisait un microscope électronique qui dépassait la résolution possible d'un microscope optique (500 Angströms). (1, 2) Ce premier microscope électronique à transmission permettait de focaliser, sous vide, un faisceau d'électrons par un électro-aimant sous une tension comprise entre 50 et 120kV (3). C'est en 1939 que Siemens lance la commercialisation des MET avec son 'Siemens Super Microscope'. (1, 2) En revanche, il a fallu près de vingt ans pour découvrir, à l'aide de cette technique, l'aspect tri lamellaire des membranes biologiques phospholipidiques (4).

Les Microscopes électroniques sont des appareils de taille importante, coûteux, dont l'installation et l'entretien demandent les plus grands soins. Ils sont installés dans des pièces spécialement conçues avec arrivée d'eau, d'azote, systèmes plus au moins complexes de pompage, de ventilation, de climatisation et nécessite un personnel qualifié pour leur manipulation.

Les applications de la ME couvrent un très vaste domaine, allant de l'observation d'échantillons biologiques (végétal, animal ou humain) à l'analyse d'échantillons industriels dans la métallurgie ou l'industrie des semi-conducteurs.

Il existe trois grands types de microscopes électroniques : le microscope électronique à force atomique, le microscope électronique à Transmission (MET, Figure 1 et 3) et le microscope électronique à Balayage (MEB, Figure 2), auxquels on peut ajouter le microscope à Balayage en Transmission

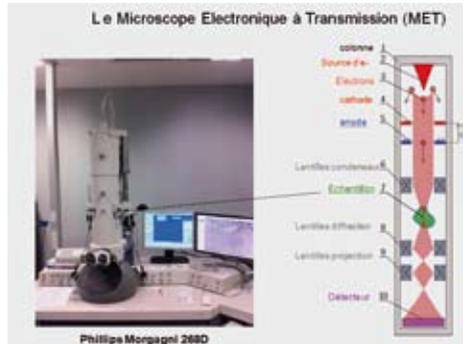


Figure 1 : MET (Morgagni 268D) avec un schéma montrant les différentes parties de la colonne du ME.

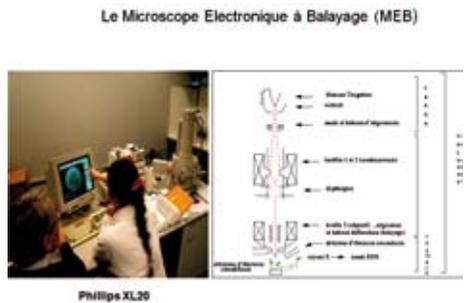


Figure 2 : MEB XL 20 avec un schéma explicatif des principaux composants.

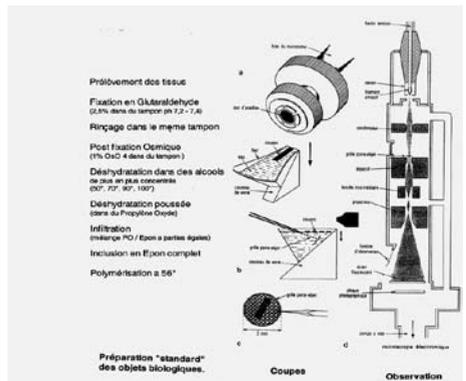


Figure 3 : Résumé des principales étapes pour réaliser une observation au MET.

(STEM). Nous ne citerons ici que des préparations destinées à la microscopie électronique à transmission conventionnelle et à la microscopie électronique à balayage.

MATERIELS ET METHODES

A- Le Microscope Electronique à Transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission permet l'étude ultra-structurale des échantillons. Un faisceau d'électrons est focalisé sur la préparation à observer par l'intermédiaire de lentilles électromagnétiques. Les interactions entre les électrons incidents et l'échantillon sont de différentes sortes. On peut observer des rayons X utilisés en microanalyse, des électrons secondaires et rétrodiffusés en microscopie électronique à balayage. Dans le cas de la microscopie électronique à transmission, seuls les électrons traversant la préparation sont analysés. A la sortie de l'échantillon plusieurs types d'électrons peuvent être distingués : des électrons transmis et des électrons diffusés. La distinction entre les électrons transmis et les électrons diffusés permet de créer le contraste des images en MET.

Trois règles impératives sont à prendre en compte pour l'observation des échantillons biologiques :

-La qualité de la fixation : Les tissus biologiques sont fragiles et doivent être protégés de l'environnement hostile interne du microscope électronique, qui inclut un vide poussé et un bombardement par un faisceau d'électrons. La protection de ces tissus se fait par différents traitements des échan-

tillons. La première étape correspond à la fixation et a pour but de stabiliser les tissus de sorte qu'ils auront un aspect aussi proche que possible de leur état vivant. Cette fixation devra préserver les structures des composés cellulaires avec un minimum de modification du volume, de la morphologie et des relations intercellulaires. Il est nécessaire de recourir à des techniques de fixation rigoureuses, tenant compte notamment de la pression osmotique du liquide de fixation et de son pH. (5-6-7)

-La finesse de l'échantillon : la taille et l'épaisseur des coupes doivent être beaucoup plus fines que pour la microscopie photonique, le faisceau électronique étant arrêté par une coupe de matière trop épaisse. Il est nécessaire, pour obtenir une image de bonne qualité de disposer de coupes de l'ordre de 50 nm d'épaisseur. Pour la même raison, le milieu d'enrobage doit être transparent aux électrons. Enfin, il est important de réduire le support des coupes ultrafines. La lame de verre utilisée en microscopie optique sera remplacée par une grille métallique : l'objet ne pouvant être observé que dans les « trous » correspondant aux espaces libres de la grille. Des supports très fins comme des films de carbone, transparents aux électrons et en même temps très résistants aux électrons, peuvent également être utilisés sur des grilles à fentes ou à grillage.

-Le contraste de l'image électronique : les diverses techniques de coloration en microscopie photonique jouent sur le principe que les colorants spécifiques de telle ou telle structure servent de filtres sélectifs ne laissant passer que certaines longueurs d'onde du spectre photonique. Ce qui per-

met de colorer des images qui autrement resteraient grisâtres. Le faisceau électronique n'offre pas les mêmes possibilités. Cependant, il est possible de contraster les images en liant des métaux lourds à certaines structures biologiques : le plomb aux lipoprotéines, l'uranium aux acides nucléiques, pour ne citer que les agents contrastants les plus communément utilisés. (8) Les différentes étapes en microscopie électronique sont résumées dans la Figure3.

Le prélèvement de l'échantillon :

La qualité des prélèvements conditionne le succès de l'étude morphologique en MET.

La fixation chimique :

Il n'y a pas de fixation chimique universelle. Chaque tissu, organe ou cellule a une fixation spécifique adaptée. Le fixateur fige l'édifice labile d'un tissu ou d'une cellule vivante. Cette action est irréversible et doit être limitée dans le temps car le fixateur n'est pas un conservateur. La pénétration du fixateur doit pouvoir se faire jusqu'au centre du tissu et de la cellule en un temps court. Nous présenterons ici les deux techniques généralement utilisées dans la plupart des laboratoires.

- La fixation par perfusion intracardiaque est rapide et homogène. Les cellules gardent une forme présumée proche de celle qu'elles avaient « *in vivo* » (9). Elle est favorable à une bonne préservation du matériel biologique pour les études en MET (10), particulièrement pour le cerveau, les poumons, les reins, les testicules, le foie. Ce sont des techniques délicates qui doivent être adaptées à l'organe étu-

dié en choisissant le fixateur et/ou le mode opératoire (voie de perfusion, nature du fixateur, pression et débit de perfusion), (11-12). Toutefois cette technique n'est pas toujours réalisable car elle consomme de grandes quantités de fixateur, nécessite un certain temps et est utilisable sur des petits mammifères. Il est parfois préférable d'utiliser une approche plus rapide comme la technique d'immersion.

- La fixation par immersion dans des aldéhydes notamment le glutaraldéhyde (GLUT) est particulièrement bénéfique pour la conservation de la morphologie des tissus biologiques. Le GLUT peut être combiné au paraformaldéhyde (PFA). Les tissus biologiques sont découpés en petits cubes d'un millimètre, afin d'optimiser la diffusion du fixateur. Le tissu prélevé est immédiatement immergé dans le fixateur pendant plusieurs heures à 4°C. La fixation par immersion est également utilisée pour la fixation des cultures cellulaires, sur des lamelles de verre ou sur des lames type lap tek. (5-6)

Quelles que soient les modalités de fixation, les fixateurs ne sont pas des conservateurs. Les échantillons sont ensuite transférés dans un tampon qui peut être à base de phosphate ou de cacodylate 0,1M pH 7,4. (7)

Post-fixation et déshydratation :

La fixation est suivie d'une post-fixation au tétr oxyde d'osmium (OsO₄) qui agit par une réaction d'oxydation. Cette molécule interagit fortement avec les phospholipides membranaires, préserve les membranes dites osmiophiles et contraste les structures cellulaires. Les prélèvements biologiques seront ensuite déshydratés (remplacement

de l'eau intracellulaire par un solvant) par de l'éthanol ou à l'acétone de plus en plus concentrés puis par de l'oxyde de propylène. (5-6-7).

Inclusion dans une résine:

Vient ensuite une pré-impregnation dans un mélange de résine avec de l'oxyde de propylène, une impregnation dans une résine pure pendant plusieurs heures puis l'inclusion dans un moule (figure 4A) des pièces biologiques avec la résine et enfin polymérisation dans une étuve à des températures différentes selon les résines employées.

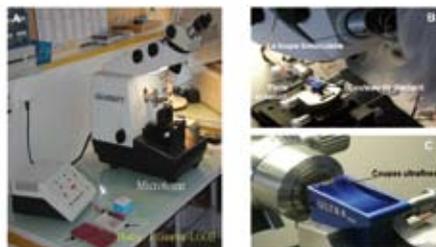
Brièvement, les résines sont de deux types : les résines hydrophyles (LRW, Lowicryl...) qui préservent mieux les sites antigéniques, mais conservent moins bien la morphologie et les résines epoxy (Araldite, Epon 812) qui conservent très correctement la morphologie cellulaire des tissus biologiques. Le choix de la résine dépend de l'application envisagée. (13)

Réalisation des coupes:

Des coupes ultrafines, d'une épaisseur variant de 30 à 100nm sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome. (Figure 4A) Son fonctionnement est similaire au microtome, utilisé en histologie, l'avance mécanique peut être remplacée par une avance thermique réglée par un dispositif électronique, le couteau d'acier est remplacé par un couteau de verre ou de diamant. Le fil de ces couteaux est de l'ordre de 2mm. Ils sont montés sur une petite cuvette que l'on remplit d'eau très propre, dont le niveau affleure le fil du couteau, ainsi la coupe s'étale à la surface de l'eau au moment où

elle est réalisée. Toutes ces opérations se font à l'aide d'une loupe binoculaire, ce qui permet d'identifier l'épaisseur de la coupe par sa couleur, qui est la résultante de la réfringence à la surface de l'eau. (14) (Figures 4B et 4C).

Ultra microtomie (appareil de coupe)



Figures 4 : A : Appareil destiné à confectionner des coupes semi-fines ou ultrafines, à gauche de l'appareil 3 moules à inclusion (flèches). B : un fort grossissement de la loupe et du couteau de diamant. C : le couteau de diamant et des coupes ultrafines flottant sur l'eau.

Récupération et contraste des coupes :

Les coupes flottent à la surface de l'eau et sont récupérées sur une grille (disque de 2.5mm de diamètre, multi perforé ou à fente) maintenue par une pince fine. Les coupes sont séchées et soumis aux agents contrastants. Le contraste de l'OsO4 est renforcé par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. L'acétate d'uranyle se lie en particulier aux acides nucléiques, le citrate de plomb se lie à l'osmium et renforce ainsi le contraste des membranes. (8) Ces « colorations » sont réalisées en faisant flotter dans un premier temps, les grilles sur une goutte d'une solution de sel d'uranium à l'abri de la lumière, suivi d'un rinçage avec de l'eau bi-distillée, puis dans un deuxième temps, sur une goutte d'une solution de citrate de

plomb et rincer. Là encore, il s'agit d'un travail qui exige beaucoup de soin. Après séchage, la coupe est prête à être examinée au MET.

Réception, traitement et observation de l'image:

L'observation de « l'image électronique » peut être réalisée sur différents supports :

- par l'observation sur l'écran fluorescent : celui-ci renvoie en chaque point des photons en quantité proportionnelle aux électrons incidents ; les zones sombres correspondent aux régions de l'objet qui ont dévié le plus d'électrons, donc les zones dans lesquelles sont concentrés les atomes lourds. L'émission lumineuse est observée à travers des hublots du MET. La résolution de l'image, et par conséquent de la mise au point, est limitée par le calibre des grains de sulfure de zinc fluorescent.

- par l'observation des micrographies prises en substituant l'écran par une émulsion photographique sensible aux électrons. Il existe alors sous l'écran une caméra équipée d'un chargeur de plans films. Ce système est complexe au point de vue maintenance et coûteux; il permet à tout moment, de retirer du MET tous les clichés déjà pris. La photographie est complémentaire à l'observation directe, mais avec une meilleure résolution et la possibilité d'analyse à postériori.

- par digitalisation de l'image, moins coûteuse avec un encombrement négligeable et une grande souplesse d'utilisation :

certains appareils sont dotés de systèmes informatiques et de traitement d'images, qui permettent de stocker sur disques, de nombreuses données iconographiques.

B- La Microscopie Electronique à Balayage :

L'application principale de la microscopie électronique à balayage est l'étude morphologique des surfaces par l'observation tridimensionnelle de l'échantillon avec une profondeur de champ très importante.

Le MEB est un appareil qui balaie l'échantillon d'un faisceau d'électrons. Ces électrons percutent l'échantillon qui émet à son tour des électrons secondaires dont le nombre dépend de la nature de la surface étudiée. Ce sont ces électrons qui sont collectés et détectés. L'exploitation des électrons secondaires, servie par une technologie bien au point, est certainement le domaine qui a été le plus largement développé et a contribué à donner au MEB ses lettres de noblesse. La richesse et la diversité des informations produites par cette technique révèle le monde biologique de l'infiniment petit sous un angle complètement différent du MET avec ses aspects parfois surprenants où l'esthétique n'est jamais exclue. Toutefois, il est à noter que le grossissement obtenu par le MEB est nettement inférieur à celui du MET (X100000).

Le principe de fonctionnement de cet appareil est décrit en détail dans le livre de Delhi Guillaumin (15). Signalons que la colonne est plus simple que celle du MET ; elle présente moins de lentilles, se prolonge par une vaste chambre porte-objet permettant d'introduire des échantillons de

plusieurs centimètres de diamètre que l'on peut faire tourner dans les trois plans de l'espace. On précisera ici uniquement les techniques de préparation d'échantillons biologiques les plus employées. Cette préparation est primordiale et doit permettre aux échantillons de supporter le vide du microscope et l'impact du faisceau d'électrons, tout en conservant une forme fidèle à la réalité. Cette préparation se déroule généralement en plusieurs étapes : fixation, déshydratation, dessiccation ou séchage au point critique et métallisation des échantillons.

Fixation, déshydratation, dessiccation ou séchage par la technique au point critique :

La fixation de l'objet présente les mêmes exigences et requiert les mêmes techniques que la microscopie électronique à transmission, à ceci près, que les échantillons sont plus volumineux. L'intégrité des formes est fondamentale pour cette analyse. La nature, la pression osmotique, la concentration ionique et le pH du fixateur doivent être rigoureusement ajustés. En pratique, la fixation est réalisée dans le glutaraldéhyde, suivie d'une post-fixation dans l'acide osmique. La déshydratation a pour but de remplacer l'eau intracellulaire par un solvant (éthanol ou acétone). (16)

Les solvants utilisés dans la déshydratation devront être miscibles avec le fluide de transition utilisé pour la dessiccation. La dessiccation est une étape qui consiste à vider l'échantillon de tout liquide qu'il peut contenir. Un échantillon biologique contient beaucoup d'eau. Pendant l'analyse au MEB, le vide du microscope va

évaporer cette eau violemment et la structure de l'objet sera déformée. Pour éviter cette déformation, les échantillons hydratés doivent subir une étape de dessiccation. La dessiccation au point critique peut être expliquée simplement. La tension superficielle fait que si l'on supprime l'eau d'une structure molle hydratée (cellules par exemple), la structure est déformée. Dans certaines conditions de température et de pression qui dépendent de la nature du liquide, cette tension est nulle et correspond au point critique. Le fluide utilisé se trouve dans un état instable, ni liquide, ni gazeux, où il ne présente plus de tension de surface. On pourra alors éliminer tout le liquide d'une structure sans la déformer. En pratique, le point critique de l'eau est difficile à obtenir au laboratoire (217.7 atmosphères à 374 °C). On lui préférera le CO₂ dont le point critique est de 72.9 atmosphères à 31°C. Le CO₂ liquide a longtemps été utilisé, mais demande un équipement particulier permettant de contrôler la température et la pression. (7) Une alternative à cette technique est l'utilisation de produits dont le point critique est plus proche de la température ambiante comme l'Héxaméthyl-disilazane mais plus toxique. (17) (Figure 5).

Collage, protection et métallisation :

Les prélèvements biologiques ne sont pas conducteurs. Ils doivent être métallisés pour éviter les phénomènes de charge, limiter l'échauffement produit par le faisceau d'électrons au niveau de l'échantillon et produire des images.

Au préalable, l'échantillon est fixé sur un support avec une colle conductrice (colle



Figure 5 : Résumé de la technique pour le MEB conventionnel avec les étapes à suivre.

à l'argent ou au carbone). Il est nécessaire d'utiliser un support perméable aux électrons, évitant ainsi l'accumulation de charges électriques sur l'échantillon. La richesse en eau du matériel biologique rend les échantillons séchés au point critique, particulièrement fragiles. Il faut par conséquent, les manipuler avec beaucoup de précautions. L'évaporation d'un fin film de carbone à la surface de l'échantillon, le rendra plus résistant et sera bon conducteur d'électrons. Enfin, une métallisation sous vide, à partir d'une cathode en or ou en palladium, permettra de déposer une fine couche de métal (10 à 25 nm) qui épousera parfaitement la surface de l'échantillon et représente une importante source d'électrons secondaires potentiels. (7-16)

L'obtention de l'image :

Le signal électronique secondaire émis par chaque point balayé par le faisceau d'électrons doit être collecté, amplifié puis transmis sur un écran TV. Le balayage peut être si rapide qu'il est possible de suivre le déplacement mécanique de l'objet en temps réel, toutefois dans ces conditions,

la netteté de l'image est très insuffisante. En ralentissant le passage du faisceau ou en multipliant les passages dans un secteur donné, la qualité de l'image sera considérablement améliorée. L'image pourra alors être captée par une caméra CCD (Charge-Coupled Device) ou une prise de vue sur film argentique pour être effectuée (cas des anciens MEB).

LES DIFFERENTS TYPES D'ARTEFACTS RENCONTRES EN MET ET EN MEB :

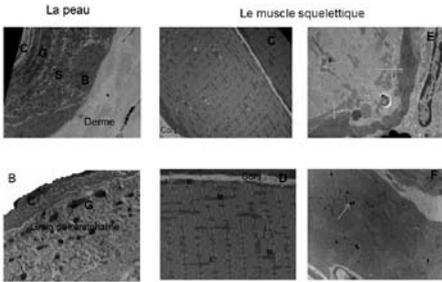
Des résultats de bonne qualité seront obtenus avec des images interprétables, si les différentes étapes de préparation sont respectées et si les caractéristiques physico-chimiques des solutions (la concentration molaire, ionique et le pH) sont pris en considération lors de la préparation des échantillons. En microscopie électronique à transmission, les images obtenues permettent d'identifier les différents composés cellulaires. (peau murine (Figures 6A et 6B)). Elles permettent également l'analyse d'anomalies ultra-structurales lors de pathologie, muscle normal (Figures 6C et 6D), muscle anormal (Figures 6E et 6F)). La microscopie électronique à balayage, nous permet d'observer les surfaces d'un objet à différents grossissements, comme cette tique sur les Figures 7A, 7B, 7C et 7D.

Citons ici quelques exemples d'artefacts rencontrés au moment de l'analyse :

a- Artefacts de fixation en MET :

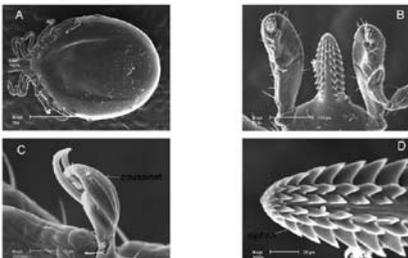
Ils se traduisent généralement par une dégradation de l'ultrastructure du matériel

Images de MET



Figures 6 : Peau de souris montrant l'épiderme, la couche basale (B), la couche spinieuse (S), la couche granuleuse (G), la couche cornée (C) et une partie de derme (A), (X4000). B est un fort grossissement de la couche granuleuse (G), avec les grains de kératohaline et la couche cornée (C X10000). C (X4000) et D (X10.000) montrent le muscle squelettique de souris avec les sarcomères, les mitochondries (M) et les gouttelettes lipidiques (L). E et F montrent des anomalies observées à l'intérieur de la fibre musculaire. Notez les agrégats des membranes à la périphérie de la membrane sarcoplasmique E (flèche, X10.000), F (X4000) présente des malformations de sarcomères, une hypertrophie des mitochondries, avec accumulation de fer (flèche).

Images de MEB de La tique

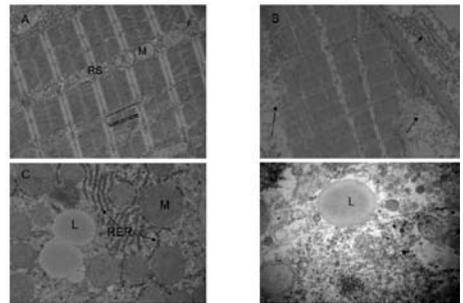


Figures 7 : Tique observée en MEB. A : ses 4 paires de pattes, ses pièces buccales et son corps gorgé de sang. (X36), B : pièces buccales (X300), C : la dernière partie de la patte, les griffes avec le coussinet (flèche X1000), D : le rostre avec le siphon (flèche X1000).

biologique (extraction, perte de continuité des membranes, gonflements, rétractions des cellules ou des organites cellulaires, conduisant à des structures cellulaires d'aspect éclairci ou anormalement sombre, voire trous dans le matériel...).

Par exemple, un muscle squelettique d'un embryon de poisson zèbre de 48 heures bien fixé par immersion (Figure 8A), qui est opposé à un autre embryon du même âge, mais mal fixé (Figure 8B). Foie de souris correctement fixé par perfusion, où l'on observe une partie du cytoplasme d'un hépatocyte (Figure 8C). Cette image est opposée à la Figure 8D, qui provient d'un foie de souris fixé par immersion, la seule structure identifiable est une gouttelette lipidique, le reste de l'image n'est pas interprétable.

Artefacts de fixation



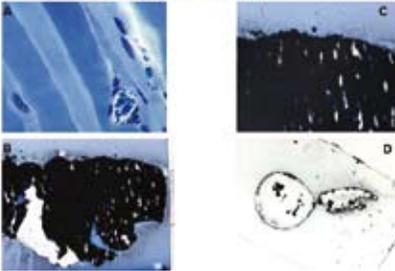
Figures 8 : Différence entre une fixation par immersion de bonne et une mauvaise qualité. A et B montrent le muscle squelettique d'un embryon de poisson zébra de 24h ; notez l'organisation des sarcomères, des mitochondries (M) et du réticulum sarcoplasmique (SR). C et D illustrent la différence entre une fixation par perfusion et par immersion, d'un foie de souris ; C : hépatocyte où l'on note tous les détails (gouttelettes lipidiques (L), réticulum endoplasmique rugueux (RER) et mitochondries (M)). A l'inverse, l'image D ne montre que la gouttelette lipidique (L) après fixation par immersion. (X10.000).

b- Artefacts d'inclusion pour la MET :

Les coupes semi-fines de $2\mu\text{m}$ d'épaisseur révèlent que l'échantillon n'a pas été déshydraté correctement et présente une mauvaise pénétration de la résine (Figures 9B, C et D), comparé au témoin (Figure 9A).

Artefacts d'inclusion; (déshydratation + inclusion)

Coupes semi-fines $2\mu\text{m}$



Figures 9 : A (X400) présente une préparation de bonne qualité, notez les fibres musculaires (flèches) avec un capillaire rempli de globules rouges (tête de flèche), B (X400), C (X800) et D (X200) illustrent une mauvaise pénétration du fixateur à l'intérieur de l'échantillon. Notez la masse noire avec les trous (flèche).

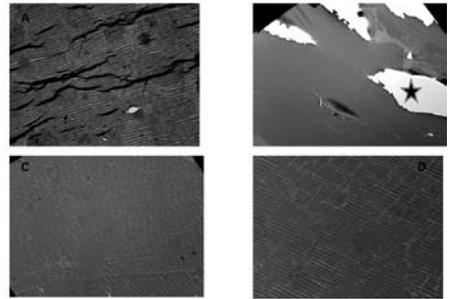
c- Artefact de coupe au MET :

Les vibrations de l'appareil de coupe, le bloc lui-même (mauvaise inclinaison, tramage,...etc.) ou l'instabilité du couteau peuvent donner des coupes ultrafines de mauvaise qualité avec des plis (Figure 10A), trous (Figure 10B) ou des stries plus ou moins importantes (Figures 10C et 10D). Ces images sont bien entendu inexploitable.

Artefact de la technique de contraste en MET :

Un contraste de mauvaise qualité ne permet pas l'analyse de la structure de l'échantillon. Des saletés, non visibles à

Artefacts de coupe

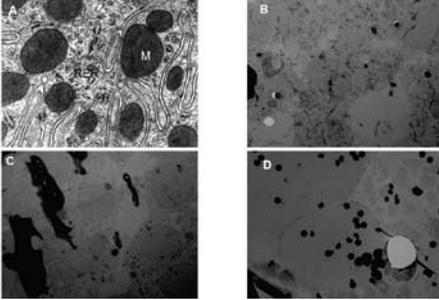


Figures 10 : Cette planche illustre les différents artefacts de coupe. A présente des replis (flèches) et des vibrations de la coupe. (X2000), B montre des grands trous au niveau de la coupe (astérisques, X2000), C (X2000) et D (X4000) illustrent les vibrations. En raison de la mauvaise qualité de la coupe, les détails ne sont pas visibles même après agrandissement de l'image.

l'œil, prennent des dimensions importantes au MET (Figures 11C et D). La présence d'impuretés dans l'eau utilisée dans le bac de diamant lors de la récupération des grilles peut donner des tâches grises sur toutes les coupes (Figure 11B). Il faut être très minutieux au moment du contraste des grilles. Une bonne approche consiste à réaliser la coloration à l'acétate d'uranyle, bien rincer puis à laisser sécher les coupes ultrafines dans leur boîte à l'abri de la poussière et de la lumière, toute une nuit à température ambiante et enfin effectuer le contraste au plomb le lendemain. Cette technique mise au point au laboratoire évite la formation de précipités sur les coupes (Figure 11A). Artefact de séchage ou problème de déshydratation au MEB :

Observé surtout pour les petits échantillons comme les œufs de poisson, ce qui aboutit à un objet rétracté (Figure 12B) par rapport au témoin (Figure 12A)

Artefacts de la coloration négative

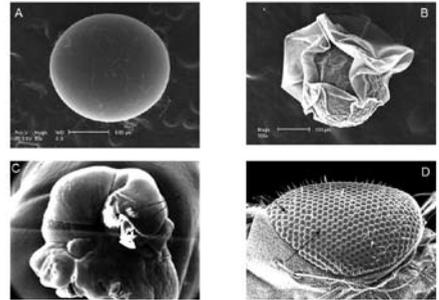


Figures 11 : A présente une coupe de rein de bonne qualité, avec des mitochondries (M), des citernes de RER et l'invagination de la membrane plasmique du tube rénal murin. (X20.000), B et C (X4000) et D (X10.000) montrent des précipités survenus lors du contraste.

Artefact de préparation et de métallisation pour le MEB :

Lorsqu'un échantillon n'est pas bien métallisé, c'est à dire une mauvaise pulvérisation de l'or ou du palladium sur toute la surface de l'échantillon, des problèmes peuvent être rencontrés lors de l'acquisition des images (phénomène de charges des électrons, Figure 12C). De même, lorsqu'un objet est déposé sur son support juste après le séchage au point critique. Il devient très fragile et sa manipulation demande beaucoup de soin pour ne pas perdre des informations comme le montre cette image d'œil de drosophile (Figure 12D) où la moitié des cils a disparu au niveau des ommatidies.

Artefacts en MEB



Figures 12 : Illustration de certains artefacts observés au moment de l'acquisition de l'image en MEB. A : un œuf normal de poisson. (X46), B : un œuf rétracté par la mauvaise déshydratation (X100), C : une tête d'embryon de souris mal formée avec un phénomène de charge, notez la brillance au niveau du cerveau (flèche, X50), D : œil de drosophile, disparition des cils au niveau des ommatidies lors de la manipulation de l'échantillon après séchage au point critique (X100).

CONCLUSION

Les champs d'application de la microscopie électronique sont nombreux et l'intérêt de ces techniques réside essentiellement en une meilleure résolution des images et une possibilité de grossissement beaucoup plus grande que le microscope photonique. Ces qualités ont permis l'observation de détails jamais accessibles aux chercheurs auparavant. Il est essentiel pour exploiter ces possibilités d'utiliser des préparations adaptées aux buts recherchés. Il convient donc de ne pas négliger la préparation de l'échantillon biologique pour permettre une optimisation maximale des performances exploratrices du MEB et du MET. Aujourd'hui la ME ne se réduit plus à son rôle descriptif initial, mais s'intègre dans un environnement de travail, de mesure, d'analyse dans lequel on pourra exercer sur l'échantillon des contraintes et des sollicitations diverses.

BIBLIOGRAPHIE

ROBINSON A.L. Electron Microscope Inventors Share Nobel Physics Prize: Ernst Ruska built the first electron microscope in 1931; Gerd Binnig and Heinrich Rohrer developed the scanning tunneling microscope 50 years later. *Science*, 1986, 234 : 821-822.

PEASE D.C., PORTER K.R. Electron microscopy and ultramicrotomy. *J Cell Biol.* 1981, **91** (3) : 287s-292s.

BUSCH, HP. *The metric system.* *Science* 1922, **14** : 400-1

ROBERTSON, I.D. Some aspects of the ultrastructure of double membranes. *Prog. Neurobiol* : 1957, 2 : 1-22.

MASCORRO J.A., BOZZOLA J.J. Processing Biological Tissues for Ultrastructural Study. *Methods in Molecular Medicine™ Electron Microscopy*, 2007, **1 (369)** : 19-34

BOZZOLA J.J. Conventional Specimen Preparation Techniques for Transmission *Electron Microscopy of Cultured Cells. Methods in Molecular Medicine™ Electron Microscopy*, 2007, **1 (369)** : 1-18

VERNI F., GABRIELLI S. Introduction to Transmission and Scanning Electron Microscopy. NATO Security through Science Series, 2005, Volume 3/2006, From Cells to Proteins: Imaging Nature across Dimensions, Pages 23-35

ELLIS E.A. Poststaining Grids for Transmission Electron Microscopy Conventional and Alternative Protocols. *Methods in Molecular Medicine™ Electron Microscopy*, 2007, **1 (369)** : 97-106

FORSSMANN W.G., SIEGRIST, G., ORCIT, L., GIRARDIER L., PICTET, R., ROUILLERC, C. : Fixation par perfusion pour la microscopie électronique. Essai de génération. *J. Microscopie*, 1967, **6**, 279-304.

HAYAT, M.A.: Fixation for electron microscopy. ACADEMIC PRESS, ING. 1981.

HAYAT, M.A.: Principles and technique of electron microscopy. Biological applications, third edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989.

ROBINSON, D.G, EHLERSU, U, HEKKE, R., HERRMANN, B., MAYER, F., and SCHURMANN, F.W.: Methods of preparation for electron microscopy. SPRINGER-VERLAG, 1987.

SCHWARZ H., HUMBEL B.M. Correlative Light and Electron Microscopy Using Immunolabeled Resin Sections. *Methods in Molecular Medicine™ Electron Microscopy*, 2007, **1 (369)** : 229-256

HAGLER H.K. Ultramicrotomy for Biological Electron Microscopy. *Methods in Molecular Medicine™ Electron Microscopy*, 2007, **1 (369)** : 67-96

GUILLAUMIN, D. La pratique de la Microscopie Electronique à Balayage en biologie. *Techniques de laboratoire*. N° 3. Ed. Masson, 1980.

BOZZOLA J.J. Conventional Specimen Preparation Techniques for Scanning Electron Microscopy of Biological Specimens. *Methods in Molecular Medicine™ Electron Microscopy*, 2007, **1 (369)** : 67-96

BRAY D.F., BAGU J., KOEGLER P. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microsc Res Tech.* 1993, **26** (6): 489-95.

QU'EST-CE QU'UNE IMAGE NUMÉRIQUE ?

*Nathalie ACCART, Ronald ROOKE
accart@transgene.fr

*TRANSGENE S.A., Laboratoire d'Histologie
Boulevard Gonthier d'Andernach, Parc d'Innovation
67405 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN CEDEX*

RESUME

Les données résultant de certaines expériences scientifiques ne peuvent être enregistrées que sous forme d'images. L'Histologie est une discipline qui peut être génératrice d'un grand nombre de ces données, aussi est-il important de préserver les images générées par des systèmes d'acquisition en constante évolution, allant des systèmes d'imagerie associés aux microscopes jusqu'aux plus récents scanners de lames. Le présent article traitera des caractéristiques des images numériques matricielles qui correspondent au support le plus utilisé. Ces caractéristiques sont la matrice, déterminant les dimensions de l'image ; la définition, donnée par le nombre d'éléments la composant ; la résolution, représentant le degré de détail de l'image ; l'échantillonnage ; le codage informatique, défini par le format d'acquisition de l'image et les couleurs. La connaissance de ces caractéristiques facilite l'intervention sur l'image et en permet une utilisation optimisée.

INTRODUCTION

L'image, du latin *imago* (représentation, portrait, fantôme, copie), est une catégorie de signes qu'on a coutume de distinguer des indices et des symboles. L'image est étroitement liée à la notion de ressemblance. Depuis le dessin rupestre de nos ancêtres jusqu'aux images numériques d'aujourd'hui, l'histoire de la représentation par l'image est longue et ses usages multiples. « Une image vaut mille mots » mais encore faut-il qu'elle soit le reflet strict de la situation réelle. Par le passé, la génération et les interventions sur les images photographiques ou cinématographiques étaient possibles mais difficiles et réservées à des spécialistes. Aujourd'hui, l'acquisition d'une image numérique, leur stockage sous forme informatique ainsi que le traitement de leur contenu sont accessibles à tous. Cependant, il est nécessaire de connaître les caractéristiques de ces images numériques afin d'éviter leur déformation ou transformation qui modifie l'interprétation de ces dernières.

LES CARACTERISTIQUES DE L'IMAGE NUMERIQUE

La matrice

Les images numériques « en carte de point » (*bitmap*) ou matricielles sont constituées d'un tableau ou matrice d'entiers, dont chaque élément correspond à un point de l'image (Figure 1). Chaque point est défini par des dimensions spatiales (hauteur, largeur, profondeur), temporelles (durée) et autres (comme par exemple, un niveau de résolution).

	120	122	119	127	116	
	113	121	124	122	121	
	119	119	123	122	123	
	115	109	117	119	120	
	114	115	118	120	122	

Figure 1 : Matrice de points constituant une image à 2 dimensions. Les chiffres dans les cases correspondent à des valeurs de codage de pixels.

Dans le cas des images spatiales à deux dimensions (2D) qui sont les plus couramment utilisées en histologie, les points sont appelés pixels (pour *picture element*) et ils adoptent deux dimensions spatiales définies par les coordonnées x, y. L'apport d'une dimension temporelle sur une image 2D crée une image 3D définie par x, y, t. Une image spatiale à trois dimensions (3D) a pour élément de base le voxel (pour *volume element*) qui adoptent les dimensions x, y, z. Il existe aussi des images à quatre dimensions (4D) alliant 3 dimensions spa-

tiales à une dimension temporelle, et représentées par les coordonnées x, y, z, t. Les images à cinq dimensions (5D) reprennent les coordonnées de l'image 4D auxquelles peut se rajouter une dimension de composante couleur.

La définition

La définition d'une image correspond au nombre de colonnes et de lignes de la matrice, c'est-à-dire aux nombres de pixels qui restituent au mieux l'objet de départ.

Exemple : 1024 pixels par 1280 pixels, abrégé en « 1024x1280 ». (Figures 2).

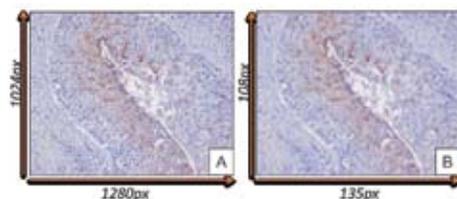


Figure 2 : Définition d'une image qui correspond au nombre de colonnes et de lignes de la matrice caractéristique de cette image. Ici on montre la même image avec une définition de 1024x1280 (A) ou une définition de 108x135 (B).

La résolution d'une image

Elle est définie pour une image 2D par le nombre de pixels par unité de longueur de la structure numérisée. On parle de point par pouce (ppp) ou *dot per inch* (dpi); pixel par cm;... Elle représente le degré de détail de l'image. Pour une même surface d'image, plus le nombre de pixels composant l'image est grand, plus la résolution est élevée et meilleure sera la restitution de l'image. Ce paramètre est défini lors de la numérisation et dépend principalement des caractéristiques du matériel utilisé pour la numérisation. Cependant la résolution ne

peut pas être augmentée à l'infini. Il existe une limite de résolution définissant la limite de séparation entre deux points (ou critère de Rayleigh), elle-même liée à la nature ondulatoire de la lumière et au phénomène de diffraction qui y est associé. La figure de diffraction générée est appelée tâche d'Airy ou disque de Airy (Figures 3). En se basant sur la formule élaborée par Abbe en 1874, on peut calculer la résolution latérale d'un microscope optique, c'est-à-dire la plus petite distance en dessous de laquelle deux points voisins ne sont plus distingués, comme égale à $0,61\lambda/NA$. Dans ce calcul, λ est la longueur d'onde de la lumière observée et NA est l'ouverture numérique du système optique, en liaison aussi avec l'indice de réfraction du milieu d'observation. Plus l'ouverture numérique sera grande, meilleure sera la résolution latérale (Figures 4). On peut ainsi calculer la taille optimale qu'un pixel peut adopter pour pouvoir résoudre deux points, correspondant à la moitié de la résolution latérale (Tableau I).

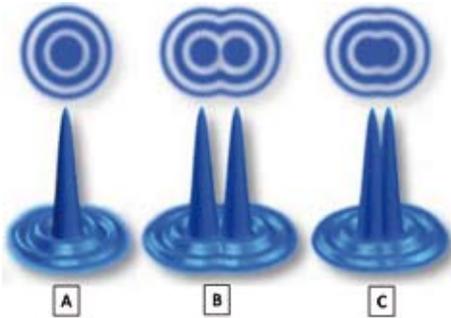


Figure 3 : Les tâches d'Airy sont définies par la diffraction de la lumière associée aux interférences. Disque d'Airy correspondant à l'image d'un point (A), à l'image de deux points en limite de résolution (B), ou à l'image de deux points non résolus (C).

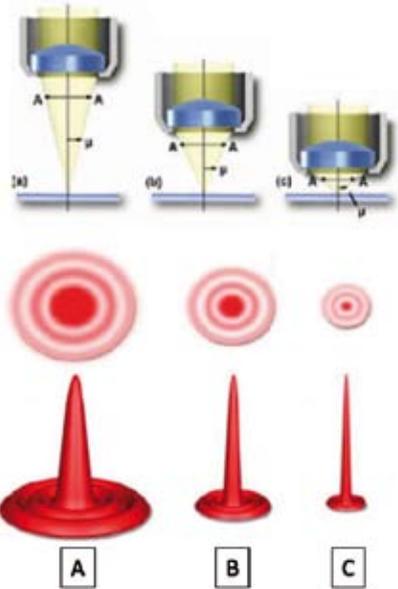


Figure 4 : Les tâches d'Airy sont fonction de l'ouverture numérique NA : plus NA est importante, plus la tâche d'Airy est étroite et meilleure est la résolution. Exemples donnés pour NA = 0,7 (A), NA = 1,25 (B) et NA = 1,4 (C).

L'échantillonnage

L'échantillonnage est le procédé par lequel un signal original (dit analogique) représenté par l'objet biologique est transformé en un signal numérique composé de pixels. Le théorème de Nyquist Shannon stipule que pour une acquisition correcte, la fréquence d'échantillonnage d'un signal doit être le double de la fréquence du signal analogique. Dans le cas de la microscopie photonique, la fréquence du signal analogique est donnée par la résolution latérale du système optique, soit la distance minimale entre deux objets pour pouvoir les distinguer au travers du microscope. Ainsi la définition de l'image acquise sera

Objectif	Caractéristiques des objectifs		Résolution en Fond clair					
	Distance de travail (WD) (mm)	Ouverture numérique (NA)	Résolution latérale (nm)			Taille optimale du pixel (nm)		
4x	30	0,10	2135	3050	3965	1067	1525	1982
Plan 10x	10,5	0,25	854	1220	1586	427	610	793
Plan Fluor 40x	0,66	0,75	285	407	529	142	203	264
Plan Fluor 100x (OIL)	0,2	1,30	164	235	305	82	117	152

Tableau I : La résolution latérale est définie par le microscope utilisé et est directement liée à la longueur d'ondes de la lumière observée (λ) et à l'ouverture numérique des objectifs (NA) selon la formule $0,61 \lambda/NA$. Elle est exprimée en nanomètre (nm). La taille optimale du pixel correspond à la résolution latérale divisée par 2 et est aussi exprimée en nanomètre (nm). Le tableau rassemble des exemples de calculs pour une λ égale à 350nm (bleu), à 500 nm (noir) ou à 650 nm (rouge).

WD = working distance = distance de travail entre l'objectif et l'objet observé.

NA = numerical aperture = ouverture numérique des objectifs.

choisie pour que la taille du pixel acquis soit la plus proche possible de la taille optimale du pixel calculée ci-dessus. Si la fréquence d'échantillonnage est plus petite, le signal est alors dit sous-échantillonné et de l'information risque d'être perdue. Si la

fréquence est supérieure, le signal est dit sur-échantillonné et l'information supplémentaire devient redondante, ce qui génère des fichiers informatiques de taille plus importante (Tableau II).

Microscope optique			Taille du pixel donnée par la caméra (nm) en fonction du choix de la définition de l'image		
Objectif	Résolution latérale (nm)	Taille optimale du pixel (nm)	640px par 512px	1280px par 1024px	2560px par 2048px
4x	3050	1525	3220	1610	540
10x	1220	610	1290	650	220
40x	407	203	320	160	50
100x	235	117	130	65	20

Tableau II : Ce tableau donne l'exemple des définitions optimales de la caméra (cellules grisées) choisies en fonction de la taille optimale du pixel calculée pour une λ égale à 500nm. Aux objectifs 4x et 10x, la définition optimale de la caméra est 1280x1024. A l'objectif 40x, on peut choisir les définitions 1280x1024 ou 640x512. A l'objectif 100x, on peut adopter la définition de la caméra à 640x512 sans perte d'information. Pour ce dernier cas, une définition de 1280x1024 entraînera un suréchantillonnage et n'apportera pas d'information supplémentaire.

Le codage informatique

Le codage informatique est défini par le format d'acquisition de l'image. L'échelle de codage des pixels est définie par le nombre de bits utilisés (n). Un codage sur n bits permet de coder 2^n valeurs. Un pixel codé par un seul bit, ne peut prendre que 2^1 valeurs soit 2 valeurs possibles : 0 (noir) ou 1 (blanc). On parle d'image binaire. Le plus souvent, les images sont codées en 8 bits (1 octet) soit 2^8 valeurs, c'est-à-dire 256 valeurs (soit comprise entre 0 et 255) pouvant être adoptées par chaque pixel. On voit maintenant apparaître des images codées en 16 bits, voire au-delà, codage qui n'est pas toujours compatible avec certains logiciels de traitement d'image.

Pour une image couleur, le codage informatique est réalisé pour chaque composante couleur. Pour chaque composante, chaque pixel est donc codé sur 8 bits. Pour 3 composantes couleurs, on obtient donc un codage final sur 3×8 bits soit 24 bits. Il est possible d'ajouter une autre composante comme la transparence, chaque pixel est alors codé sur 32 bits.

Les couleurs

Les couleurs peuvent être codées selon différents modes. Le plus couramment utilisé est le codage Rouge Vert Bleu (RVB) ou Red Green Blue (RGB). Ce mode de représentation des couleurs, appelé espace colorimétrique, est basé sur une synthèse additive des couleurs, à savoir que le mélange des trois composantes à leur valeur maximale donnera le blanc. Il existe d'autres modes de représentation des couleurs comme Cyan, Magenta, Jaune, Noir ou *Cyan Magenta Yellow black (CMYK)* utilisé

principalement pour l'impression, et basé sur une synthèse soustractive des couleurs. Un autre espace colorimétrique dénommé Teinte, Saturation, Luminance ou *Hue Saturation Brightness (HSB)* peut aussi être utilisé (Figures 5). Les images matricielles en couleurs peuvent être représentées soit par une image dans laquelle la valeur du pixel est une combinaison des valeurs des trois composantes couleurs, soit par trois images représentant chacune une composante couleur. Dans le premier cas, selon le nombre de bits alloués pour le stockage d'une couleur de pixel, on distingue généralement différents types d'images.

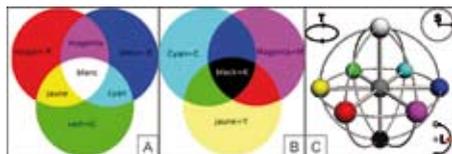


Figure 5 : Exemples de trois espaces colorimétriques de codage des couleurs.

Rouge Vert Bleu ou Red Green Blue (A), codage le plus couramment utilisé; Cyan Magenta Jaune Noir ou Cyan Magenta Yellow black (B); Teinte Saturation Luminance ou Hue Saturation Brightness (C).

Images en couleurs indexées ou images à palettes

Etant donné le volume informatique nécessaire pour le stockage d'images, on peut associer à chaque couleur vraie une valeur par l'intermédiaire d'une table de conversion (appelée aussi Look-Up-Table LUT). Ainsi la nouvelle valeur du pixel aussi appelée index, ne correspond plus à sa couleur effective mais renvoie à la case correspondant à cette couleur dans la table, case dans laquelle on retrouve la représentation complète de la couleur considérée. La table d'index étant limitée à 256 valeurs,

ceci réduit considérablement le volume de stockage de l'image (Figures 6).

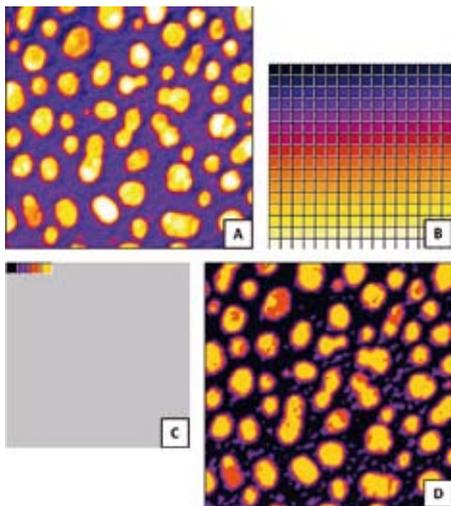


Figure 6 : L'image (A) est codée sur 8 bits et contient donc 256 valeurs de pixel résumées dans le tableau (B). On utilise une table de conversion dans laquelle les valeurs de pixel sont regroupées sur 4 index (C). On obtient alors une nouvelle image codée sur 4 valeurs de pixel (D).

Images 24 bits ou en « couleurs vraies »

Il s'agit d'une appellation trompeuse car le monde numérique est fini et limité et ne peut pas rendre compte intégralement d'une réalité infinie. Le codage de la couleur est réalisé sur trois octets, chaque octet représentant la valeur d'une composante couleur. Une image couleur RVB sur 24 bits où $R <0-255> + V <0-255> + B <0-255>$ reproduit à l'écran une grande partie du spectre visible. Le nombre de couleurs différentes pouvant être ainsi représenté est de $256 \times 256 \times 256$ possibilités, soit près de 16 millions de couleurs pouvant être attribuées à un pixel (Tableau III). Comme la différence de nuance entre deux couleurs

R	V	B	Couleur associée
0	0	0	noir
255	0	0	rouge
0	255	0	vert
0	0	255	bleu
128	128	128	gris
255	255	255	blanc

Tableau III : Exemples de valeurs de pixel d'une image couleur données selon le codage RVB en couleurs vraies.

très proches mais différentes dans ce mode de représentation est quasiment imperceptible pour l'œil humain, on considère commodément que ce système permet une restitution exacte des couleurs, c'est pourquoi on parle de « couleurs vraies ».

Images en niveaux de gris

Dans ce cas, il n'y a que l'intensité lumineuse de chaque composante de l'espace colorimétrique qui est acquise, habituellement sur un seul octet puisque $R = V = B$.

Conversion du codage des couleurs

Chaque type d'images peut être converti dans un autre type mais la conversion peut être irréversible, notamment dans le cas où elle n'est pas linéaire. Dans ce cas, la table de conversion est réduite à un nombre de cases très restreint, regroupant un grand nombre de pixels et donc de couleurs dans une même case. Un diagramme de conversion est représenté Figure 7.

Le stockage informatique des images : le format

Un format d'image est une représentation informatique de l'image, associée à des informations sur la façon dont l'image est codée et fournissant des indications sur la

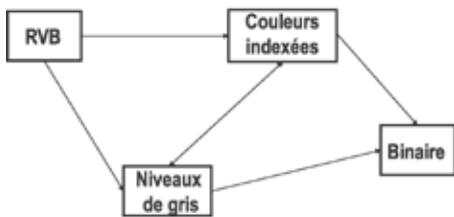


Figure 7 : Diagramme de conversion entre les différentes formes de codage des images couleurs. Les flèches unidirectionnelles mentionnent des conversions irréversibles alors que les flèches bidirectionnelles font référence à des conversions réversibles sans perte d'information sur l'image initiale.

manière de la décoder et de la manipuler. Le format d'image est défini au moment de l'acquisition et est lié au logiciel qui commande la caméra. La plupart des formats actuels intègrent un en-tête contenant des attributs (dimensions de l'image, type de codage, LUT, etc.), suivi des données (l'image proprement dite). La structuration des attributs et des données diffère pour chaque format d'image. D'autres données comme la date, l'heure et le lieu de la prise de vue, ainsi que les caractéristiques physiques de la photographie (sensibilité ISO, vitesse d'obturation, usage du flash...) peuvent aussi apparaître dans ces fichiers. Le Tableau IV résume les formats les plus couramment utilisés pour le stockage des images numériques matricielles. Parmi ces formats, il existe des formats dits « propriétaires » comme le format TIFF dont le brevet est contrôlé par la firme Aldus qui a fusionné avec Adobe en 1994. Le format GIF était soumis au brevet Unisys, contrôlé par la société CompuServe mais les brevets d'Unisys sont arrivés à expiration et ce format est donc devenu libre de droits. L'utilisation des images stockées nécessite le décodage et la manipulation

par des logiciels (comme par exemple Photoshop). Dans le cas des images stockées avec ces formats « propriétaires », le résultat obtenu peut être différent selon le logiciel utilisé et générer des aberrations par rapport à l'image initiale. De plus, la pérennité des logiciels de décodage de ces formats « propriétaires » n'est pas garantie et la réalisation de nouveaux programmes pour pouvoir les lire peut s'avérer difficile. Il faut aussi prêter attention aux différentes versions que peut recouvrir un format particulier. Notamment, le format TIFF varie selon les versions et certaines d'entre elles ne sont pas reconnues par certains logiciels.

Les manipulations d'une image numérique

Par le passé les interventions sur les images photographiques ou cinématographiques étaient possibles mais difficiles et donc réservées à des spécialistes. Aujourd'hui la numérisation de l'image et les nouvelles possibilités de transformation de l'image par des outils numériques rendent plus facile les interventions sur son contenu. Cependant, des pièges existent et la perte d'information peut être irréversible. Dans le cas de l'Histologie, les images générées doivent rendre compte des couleurs et contrastes obtenus après les colorations spéciales, l'immunohistochimie ou l'hybridation in situ que la révélation soit chromogénique ou fluorescente, le but étant la représentation exacte des données observées.

La réduction du nombre de pixels diminue le volume informatique de stockage associé et rend l'image plus facilement manipulable. Elle peut d'abord être réalisée par réduction de la définition originale, c'est-à-dire du

nombre de colonnes et de lignes de la matrice constituant l'image. Cette opération est possible après l'acquisition en couplant les pixels deux par deux (on parle de *binning*), voire plus et en moyennant leurs valeurs. Il est aussi possible de diminuer sur la résolution en fonction de l'utilisation ultérieure de l'image (document projeté ou document imprimé). La résolution d'une image doit être compatible avec la résolution du système de projection ou de l'imprimante afin d'éviter les phénomènes de pixellisation. L'affichage sur écran informatique d'une image de 96 ppp est parfaitement toléré puisque la résolution d'un écran informatique est généralement comprise entre 72 et 96 ppp. En revanche, cette résolution est peu adaptée pour l'impression, car la résolution atteinte par les imprimantes est en moyenne de 300 ppp. L'image imprimée sera plus ou moins floue ou laissera apparaître des pixels carrés visibles. Cependant, augmenter la résolution peut entraîner des temps de visualisation et d'impression plus longs, et conduire à un volume de stockage informatique très important. Il est aussi possible de réduire les couleurs. Comme nous l'avons dit précédemment, il est possible de passer en couleurs indexées à 256 couleurs. L'information couleur est alors

codée sur 1 octet et la taille du fichier image est alors divisée par 3. Une autre possibilité pour réduire la taille des fichiers est d'utiliser des opérations de compression. On distingue 2 catégories de compression. La compression non destructive qui conserve la totalité des informations numériques. Elle est employée, par exemple, pour les fichiers programmes « zippés ». Elle restitue tous les bits sans aucune perte. Les taux de compression sont généralement faibles (de 1 à 4). Elle n'est proposée que pour certains formats de stockage (Tableau IV). La compression destructive tient compte des caractéristiques des équipements et de l'oeil. On ne conserve pas les signaux qui sont peu ou pas perçus. On peut alors obtenir des taux de compression qui s'échelonnent de 10 à 1000 ou plus. Les logiciels qui permettent de comprimer (puis de décompresser) sont généralement appelés des codecs (pour *COmpression DECompression*).

L'image numérique est une entité manipulable mais le fait de connaître ses caractéristiques permet d'acquérir des images d'excellente qualité et d'éviter la perte irréversible de données essentielles pour la compréhension et l'interprétation de résultats scientifiques, tout en limitant le volume informatique de stockage.

Format	Nombre de bits codant un pixel	Compression des données
JPEG	8, 24 ou 32	CAP
JPEG200	16	CAP
GIF	1, 8 ou 256 maxi (palette)	CSP
PNG	8 ou 256 maxi (palette)	CSP
BMP	1, 8 ou 24	PCP
TIFF	1, 8, 16, 24 ou 32	CSP

Tableau IV : Formats informatiques les plus couramment utilisés pour le stockage d'images numériques matricielles. CSP (CAP) : compression sans (avec) perte d'informations; PCP : pas de compression possible.

METHODOLOGIE ETABLIE POUR LE RANGEMENT DES ANTICORPS DANS LE LABORATOIRE D'HISTOLOGIE

*Nadine KEHRER, Carine REYMANN, Ronald ROOKE, Nathalie ACCART

*nadine.kehrer@transgene.fr

TRANSGENE S.A
Laboratoire d'Histologie
Boulevard d'Andernach, Parc d'innovation
67405 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN

INTRODUCTION

L'utilisation d'un nombre important d'anticorps appliqués à des thématiques très diverses nous a imposé de mettre en place dans notre laboratoire d'histologie un système efficace pour les répertorier, les classer et les ranger tout en gardant la flexibilité à l'implémentation des nouvelles acquisitions. Nous décrivons ici la méthodologie que nous avons adoptée pour établir un système simple, compréhensible, complet et utilisé quotidiennement dans notre laboratoire.

METHODOLOGIE

Etape 1 : Attribution d'un code interne anticorps

Un numéro et un code couleur sont attribués à chaque anticorps.

- Vert pour les anticorps primaires dirigés contre les antigènes murins et les contrô-

les isotypiques associés,

- Rouge pour les anticorps primaires dirigés contre les antigènes humains et les contrôles isotypiques associés,
- Jaune pour tous les autres anticorps,
- Bleu pour les anticorps secondaires et systèmes d'amplification.

Le numéro sera précédé de la lettre « A » pour les anticorps primaires et la lettre « S » pour les anticorps secondaires et kits d'amplification. Le numéro est implémenté de manière indépendante entre les catégories « A » et « S » :

Réception d'un anticorps primaire dirigé contre un antigène murin, attribution du code interne A25 - vert.

Puis réception d'un anticorps primaire dirigé contre un antigène humain, attribution du code interne A26 rouge.

Puis A27 - jaune, A28 - vert, etc...

Les tubes commerciaux recevront le numéro inscrit sur une pastille de couleur correspondant au code, qui identifiera les aliquotes et les fiches techniques des anticorps. L'intérêt et l'utilisation du « code interne anticorps » permettent une identi-

fication et un repérage rapide des anticorps provenant de fournisseurs différents, évitant de confondre particulièrement les anticorps qui reconnaissent le même antigène. Un code est unique pour chaque produit.

Etape 2 : Analyse de la fiche technique (Figure 1)

Les éléments importants, cités ci-dessous, sont relevés sur la fiche technique associée aux différents produits.

- le nom de l'anticorps,
- son isotype,
- sa concentration (stipulée sur le tube de l'anticorps ou sur la fiche technique),
- le fournisseur et la référence-fournisseur,
- son mode de stockage,
- le code interne attribué précédemment et inscrit sur la pastille de couleur.

The figure shows a technical sheet for 'Rabbit Anti-Human CD71' from DakoCytomation. A red dot is placed on the sheet, and arrows point from it to boxes labeled 'Fournisseur + référence', 'Intitulé anticorps', 'Isotype', 'Code interne anticorps', 'Concentration', and 'Conservation'. The technical sheet contains various sections: 'Product name', 'Intended use', 'Safety and expiration', 'Reagent provided', 'Materials supplied', and 'Precautions'. Handwritten annotations include 'Lot n°: D063V', '2485 mg/L', and 'cc'.

Figure 1 Analyse de la fiche technique : Le nom de l'anticorps, son isotype, sa concentration, le fournisseur et la référence-fournisseur, le mode de stockage et le code interne sont relevés sur la fiche technique.

Etape 3 : Etablissement du listing général (Figure 2)

Le listing est établi sous forme de tableau sur le logiciel EXCEL dans lequel tous les éléments relevés sur la fiche technique sont rapportés (voir Etape 2). Un lien hypertexte entre ce listing et la fiche technique de l'anticorps est établi.

Anticorps	Classe	Epitope	Source	Concentration	Solubilité	Fonction	Référence	Fonctionnel	3 ^e Fiche technique	Température	
Adipocyte (Adipocytin)	polyclonal	Ratite	IgG	1mg/ml	1:100	FAAF	AMP008	Anti-Serum	Adip	-20°C Stable 3.0a	
Adipocyte (SGLT4)	polyclonal	Ratite	IgG	100µg	1:100	FAAF	4679-178	Anti-Serum	Adip	-20°C Stable 3.0a	
Caspase-3 (Csp3)		Ratite			1:100	FAAF	500	Cell signaling	Adip	-20°C Stable 3.0a	
CD1a		O12	3lines	IgD1aK	1:100mg/ml	1:10	FAAF	H071	Diako	Adip	+4°C
CD1a		O12	3lines	IgD1aK		A water	NS-100-D	Thermo scientific	Adip	+4°C	
CD1a		P11	3lines	IgD1a	lyophilise	in water	NCL-CD1-120	Novocarta	Adip	+4°C	
CD3		PT2.28	3lines	IgG1K	Ready to use	1:2	FAAF	NP-789	Diako	Adip	not characterized
CD3			Ratite		1:100 = 1:100	FAAF	NCL-CD3a	Novocarta	Adip	+4°C	
CD3			Ratite			1:1	TE	NP-580	Diako	Adip	+4°C
CD3e Ab-2		P11	3lines	IgD1a	TuL	var	NP-12010	Thermo scientific	Adip	+4°C	

Figure 2 Etablissement du listing général : Les éléments relevés sur la fiche technique sont rassemblés dans un listing général.

Etape 4 : Scan de la fiche technique

Le scan de la fiche technique est enregistré dans un dossier informatique et un lien hypertexte est créé entre le fichier EXCEL et la fiche technique correspondant à l'anticorps. L'accès direct à la fiche technique se fait par un simple clic dans la case correspondant à l'anticorps.

Etape 5 : Intégration des informations complémentaires (Figure 3)

Les mises au point effectuées avec l'anticorps répertorié ainsi que les résultats associés sont signalés dans cette rubrique. Toute autre information pertinente peut y être intégrée et être partagée par les utilisateurs.

Concentration	Anticorps	Epitope	Référence	Concentration	3 ^e Fiche technique	Température	Y	N	C	LLP	Commentaire
1mg/ml	1:100	FAAF	4679-178	Anti-Serum	Adip	-20°C Stable 1.24	Y				
100µg	1:100	FAAF	4679-178	Anti-Serum	Adip	-20°C Stable 4.11	X				
100µg	1:100	FAAF	500	Cell signaling	Adip	-20°C Stable 2.04	X				
100µg	1:100	FAAF	500	Cell signaling	Adip	-19°C	X				
	Adip		NS-100-D	Thermo scientific	Adip	-4°C					
Propriétés	A water		NCL-CD1-120	Novocarta	Adip	-4°C					not characterized
Ready to use	1:2	FAAF	NP-789	Diako	Adip	-20°C Stable 1.24	X	X			
	1:100 = 1:200	FAAF	NP-580	Novocarta	Adip	-4°C	X				
	1:1	TE	NP-12010	Thermo scientific	Adip	-19°C	X				
	var		NCL-CD3a	Novocarta	Adip	-4°C	Y				
TuL	1:100	FAAF	NP-12010	Thermo scientific	Adip	-4°C	X				
100µg	1:100	FAAF	NP-580	Novocarta	Adip	-4°C	X	X			
		D178	Immucytech		Adip	-4°C					Propriétés

Figure 3 Intégration des informations complémentaires : Toutes les informations complémentaires sont intégrées dans le listing général. Elles incluent les mises au point effectuées avec un anticorps, les résultats associés ou tout autre commentaire.

Etape 6 : Intégration des codes internes anticorps aux protocoles d'immunohistochimie associés (Figure 4)

Chaque protocole mentionne la référence de l'anticorps primaire utilisé. Cette référence commence par :

- « C » pour les protocoles utilisés sur les cryocoupes,
- « TZ » pour les protocoles utilisés sur les tissus fixés en Tris/Zinc,
- « P » pour les protocoles utilisés sur les tissus fixés en FA4%.

Ces lettres sont ensuite associées au code interne de l'anticorps primaire.

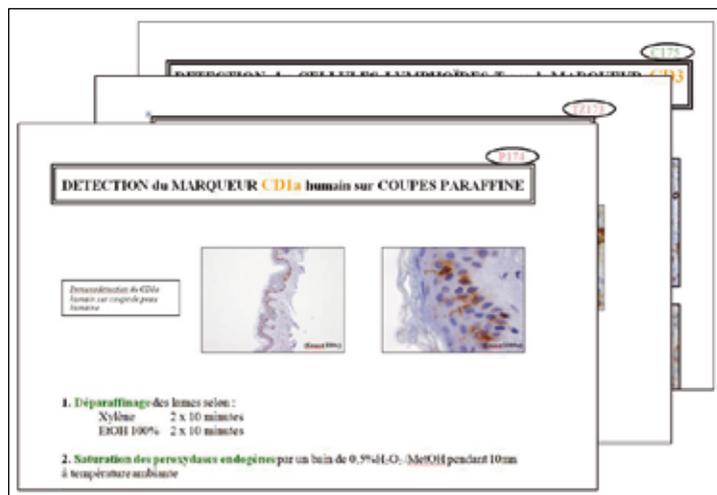


Figure 4 Intégration des codes internes anticorps aux protocoles d'immunohistochimie associés : Les protocoles font référence à l'anticorps primaire utilisé par l'association des lettres C, TZ ou P et du code interne de l'anticorps.

Etape 7 : Stockage

Les anticorps sont stockés à +4°C dans un module de 4 tiroirs aménagés pour les différents conditionnements d'anticorps (Figure 5a), ou dans des boîtes NUNC de 81 compartiments, pour les aliquotes ou les catégories particulières d'anticorps (code jaune). Ces boîtes supportent les basses températures (de -20°C à -80°C).

Pour les anticorps aliquotés, des tubes en verre de la marque Agilent (Flacon verre 2mL - 5183-2067) ; (Manchon conique verre 100µL - 5183-2085) ; (Bouchon - 5185-5820)] sont utilisés et stockés dans les boîtes NUNC.

On attribue un numéro (boîte 1, boîte 2, etc) pour les boîtes stockées à +4°C ou (boîte

3.01, boîte 3.02, etc) pour les boîtes stockées en -20°C. Dans ce cas, le chiffre avant le point correspond au numéro du tiroir du congélateur dans lequel la boîte se trouve et les chiffres derrière le point correspondent au numéro de la boîte proprement dite (Figure 5b). Une cartographie des boîtes a été établie afin de localiser rapidement les anticorps (Figure 6). Le lieu de stockage (+4°C ou -20°C) et le numéro de la boîte dans laquelle l'anticorps est rangé sont mentionnés dans le listing général (voir Etape 3) et placé sur un support mural dans le laboratoire (Figure 7a) ou sur le congélateur (Figure 7b) pour une plus grande accessibilité aux collaborateurs.



a

Figures 5 Stockage :
Les anticorps sont le plus souvent stockés à +4°C dans des tiroirs spécialement conçus (a) ou à -20°C. Les boîtes utilisées et leur identification sont illustrées ici (b).

• Distribution possible de l'anticorps commercial en aliquotes

• Boîte carton 81 compartiments (9 x 9)

- Nunc - 039500
- 130 X 130 X 50mm (L x l x h)
- Résistantes -20° C

• Etiquette

- +4° C **Boîte N°1**
- -20° C **BOÎTE 3.03**

N° tiroir

N° boîte

b

BOÎTE 3.01

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	A	A	A	A	B	B	B	B	B
3	B	B	B	B	B	B	B	B	B
4	C	C	C	C	C	C	C	C	C
5	D	D	D	D	D	D	D	D	D
6	E	E	E	E	E	E	E	E	E
7	F	F	F	F	F	F	F	F	F
8	F	F	F	F	F	F	F	F	F
9	F	F	F	F	F	G	H		

BOÎTE 3.02

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
2	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4	B	B	B	B	B	B	B	B	B
5	B	B	B	B	B	B	B	B	B
6	C	C	C	C	C	C	C	C	C
7	C	C	C	C	C	C	C	C	C
8	C	C	C	C	C	C	C	C	C
9	C	C	C	C	C	C	C	C	C

BOÎTE 3.03

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	A	A	A	A	A	A	A	B	B
2	B	B	B	B	B	B	B	B	B
3	C	C	C	C	C	C	C	D	D
4	D	D	D	D	D	D	D	E	E
5	E	E	E	E	E	E	E	F	F
6	F	F	F	F	F	F	F	G	G
7	G	G	G	G	G	G	G	H	H
8	H	H	H	H	H	H	H	H	H
9	I	I	I	I	I	I	I	I	I

BOÎTE 3.04

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	A	A	A	A	A				
2	B	B	B	B	B				
3									
4	C	C	C	C	C	C	C		
5	D	D	D	D	D	D	D	E	
6	F	F	F	F	F	F	F	F	
7	G	G	G	G	G	G	G	H	
8	I	I	I	J	J	K	L		
9	M	N	O	P	Q	R	S		

A) (A12) Mouse anti-human IgG2a polyclonal (anti-CD164)
 B) (A22) Mouse anti-human IgG2b polyclonal (anti-CD164)
 C) (A32) Mouse anti-human IgG2c polyclonal (anti-CD164)
 D) (A42) Mouse anti-human IgG1 polyclonal (anti-CD164)
 E) (A52) Mouse anti-human IgG polyclonal (anti-CD164)
 F) (A62) Mouse anti-human IgA polyclonal (anti-CD164)
 G) (A72) Mouse anti-human IgM polyclonal (anti-CD164)
 H) (A82) Mouse anti-human IgE polyclonal (anti-CD164)
 I) (A92) Mouse anti-human IgG2a polyclonal (anti-CD164)
 J) (A102) Mouse anti-human IgG2b polyclonal (anti-CD164)
 K) (A112) Mouse anti-human IgG2c polyclonal (anti-CD164)
 L) (A122) Mouse anti-human IgG1 polyclonal (anti-CD164)
 M) (A132) Mouse anti-human IgG polyclonal (anti-CD164)
 N) (A142) Mouse anti-human IgA polyclonal (anti-CD164)
 O) (A152) Mouse anti-human IgM polyclonal (anti-CD164)
 P) (A162) Mouse anti-human IgE polyclonal (anti-CD164)
 Q) (A172) Mouse anti-human IgG2a polyclonal (anti-CD164)
 R) (A182) Mouse anti-human IgG2b polyclonal (anti-CD164)
 S) (A192) Mouse anti-human IgG2c polyclonal (anti-CD164)

Figure 6. Cartographie des boîtes :
Les emplacements et les lieux de stockage des anticorps sont détaillés dans un document.



Figures 7. Affichage de la cartographie des boîtes : Il est proposé dans le laboratoire (a) ou directement sur les lieux de stockage des anticorps (b).

CONCLUSION

Ce système de rangement d'anticorps permet une centralisation des différents produits utilisés, évitant un stockage en double exemplaire, facilitant la consultation et la visualisation rapides des fichiers. Il garantit la qualité des expérimentations en évitant toute confusion entre deux anticorps. Toutefois, pour être totalement

efficace, ce procédé demande l'intégration de nombreuses données et des mises à jour régulières, par un système informatique approprié, identifié et accessible aux utilisateurs. Si possible, toutes ces données sont déposées sur l'intranet, ce qui permet une consultation rapide par les ayants-droits de la société.

SPECIFICITE DES CEPAGES ALSACIENS ET BIODIVERSITE DES LEVURES

*Francis KARST
*jfkarst@gmail.com

*UMR 1131 INRA Université de Strasbourg
28 rue de Herrlisheim 68000 Colmar*

On pensait il y a quelques années que les premières boissons fermentées, produites par les égyptiens étaient élaborées à partir de fruits (dattes, figes...) et que le raisin était intervenu plus tardivement, vers 2000 ans avant notre ère. Des données archéologiques récentes montrent que la production du vin à partir de la vigne est beaucoup plus ancienne. Les études ont montré que des amphores datant de -5400 ans (Iran) et de -3150 ans (Egypte) contenaient des traces d'acide tartrique (1), un acide qui n'est trouvé dans le règne végétal que chez la vigne et les sorbes. L'origine de la vigne, *Vitis vinifera*, à la base des vins actuels serait le Caucase, mais avec la participation de *Vitis sylvestris* trouvée en Espagne.

La culture de la vigne est amenée en Alsace au premier siècle de notre ère par les légions romaines qui ont occupé l'Alsace jusqu'au V^e siècle. Le vignoble a en bonne partie été protégé par les barbares lors de leurs invasions. Le vignoble s'est

développé sous les Mérovingiens et les Carolingiens qui font grande consommation de ce vin « tonique et qui rend gai » (www.vinalsace.com). Avant la fin du premier millénaire, 160 localités alsaciennes cultivent la vigne et, au Moyen Age, les vins d'Alsace comptent déjà parmi les plus prestigieux d'Europe. La viticulture alsacienne atteint son apogée au cours du XVI^e siècle. Il faut citer ici la part importante jouée par les monastères. Ainsi l'Eglise joue un rôle important jusqu'à la révolution, les princes-évêques de Strasbourg et de Bâle étant les plus gros propriétaires viticoles (www.alsace-accueil.fr).

Cette période de prospérité est brutalement interrompue par la guerre de 30 ans qui laisse la région livrée aux pillages, aux fléaux, au déclin démographique et dépourvue de toutes les activités marchandes. C'est un vignoble exsangue, comme l'Alsace, qui sera rattaché à la France en 1648. Le vignoble renaît difficilement au XVIII^e siècle. Avec la vente des biens de

l'Église par la révolution de 1789, le vignoble est morcelé et c'est pourquoi les parcelles sont encore restreintes à l'heure actuelle, un peu plus de 2 ha en moyenne. Lorsqu'en 1871 l'Alsace devient allemande, la production alsacienne augmente et les vins deviennent médiocres, car ils sont destinés au coupage avec des vins allemands pour augmenter leur degré alcoolique. Comme tous les vignobles, l'Alsace n'échappe pas au phylloxéra (puccolon) qui apparaît vers 1876. Pour l'obtention de vignes résistantes deux méthodes sont en débat, soit l'utilisation de plants hybrides issus de croisements avec les vignes américaines résistantes au phylloxéra, soit l'utilisation de plants greffés sur porte-greffe de vigne américaine. Les deux techniques sont utilisées, mais quoiqu'il en soit, la qualité des vins est au plus bas lors du rattachement de l'Alsace à la France en 1918.

A partir de cette période les professionnels décidèrent de la production de vins monocépages et de qualité. Dès 1945, cette politique est prolongée par la délimitation des aires du vignoble et la fixation de règles strictes de production et de vinification. La qualité s'est fortement accrue à partir du label « AOC Alsace » en 1962, puis « Alsace Grand Cru » en 1975 et « Crémant d'Alsace » en 1976 (www.CIVA.fr).

A l'heure actuelle, le vignoble s'étend sur toute l'Alsace, entre Thann au Sud et Wissembourg au Nord. La surface de production est de 15000 hectares répartis sur 119 communes. Long d'une centaine de kilomètres, et pratiquement sans discontinuité, le vignoble a une largeur allant de 1,5 à 3 kilomètres.

Le vignoble alsacien est représenté par des terroirs très différents selon les critères pé-

dologiques et climatiques ; les sols peuvent par exemple être calcaires, granitiques, gréseux, volcaniques. La délimitation stricte de ces terroirs a conduit à l'appellation Alsace Grand Cru. Ces vins sont produits avec un rendement limité, avec des règles spécifiques de conduite de la vigne, une richesse naturelle minimale et une dégustation d'agrément. Deux autres appellations, Vendanges Tardives (raisins en surmaturité) et Sélection Grains Nobles (sélection de grains botrytisés) ont trait à des vins liquoreux élaborés avec un cahier de charges parmi les plus sévères des AOC françaises. Aux sept cépages nobles des vins AOC le sylvaner, le riesling, le pinot blanc, le pinot noir, le pinot gris, le muscat et le gewurztraminer, s'ajoute le savagnin rose utilisé pour l'élaboration du Klevener de Heiligenstein. Les créments d'Alsace produits fréquemment à partir de l'assemblage de plusieurs cépages (pinot blanc, auxerrois, chardonnay, riesling, pinot noir et pinot gris), représentent 21% de la production alsacienne.

La vigne, *Vitis vinifera* est représentée par plus de 6000 variétés ou cultivars, multipliées par reproduction végétative et greffées sur porte-greffe adéquat conférant la résistance au phylloxera. Les différents phénotypes que l'on observe chez la vigne sont fréquemment la conséquence de mutations somatiques, ce qui exige ce type de multiplication. Ainsi, les généticiens de l'INRA de Colmar ont montré (2) que les différentes variétés de Pinot (pinot noir, pinot blanc, pinot gris, pinot moure, pinot meunier) dérivent d'un seul zygote et que les différences (couleur des baies, anatomie des feuilles, port de la vigne) sont liées à des mutations somatiques affectant

la couche L1 donnant naissance à la pellicule de la baie de raisin (Figure 1); ces mutations ne sont donc pas transmissibles par reproduction sexuée.

La composition aromatique d'un vin résulte en premier lieu de la richesse du raisin en composés aromatiques et précurseurs. Les terpénols, par exemple, sont des molécules aromatiques essentielles, dont la nature et les taux présents dans les raisins constituent une sorte de « signature » des différents cépages (3). Ce potentiel aromatique initial est cependant largement modifié lors de la vinification, sous l'effet conjugué de modifications physico-chimiques des molécules et de l'action des microorganismes,

qui sont capables de modifier les molécules présentes mais aussi d'en synthétiser de nouvelles (4). Concernant la nature des microorganismes, des informations importantes ont été apportées grâce aux techniques de biologie moléculaire qui ont permis leur caractérisation et le typage intra-espèce. Pour le typage des levures *Saccharomyces cerevisiae*, la technique des microsattellites (5) est une des plus performantes. A l'aide de cette technique nous avons analysé 650 levures d'origines géographique (Europe, Asie Amérique...) et technologique (vins, cidre, alcools...) différentes. L'arbre phénétique basé sur le coefficient de Dice a révélé que les souches sont principalement

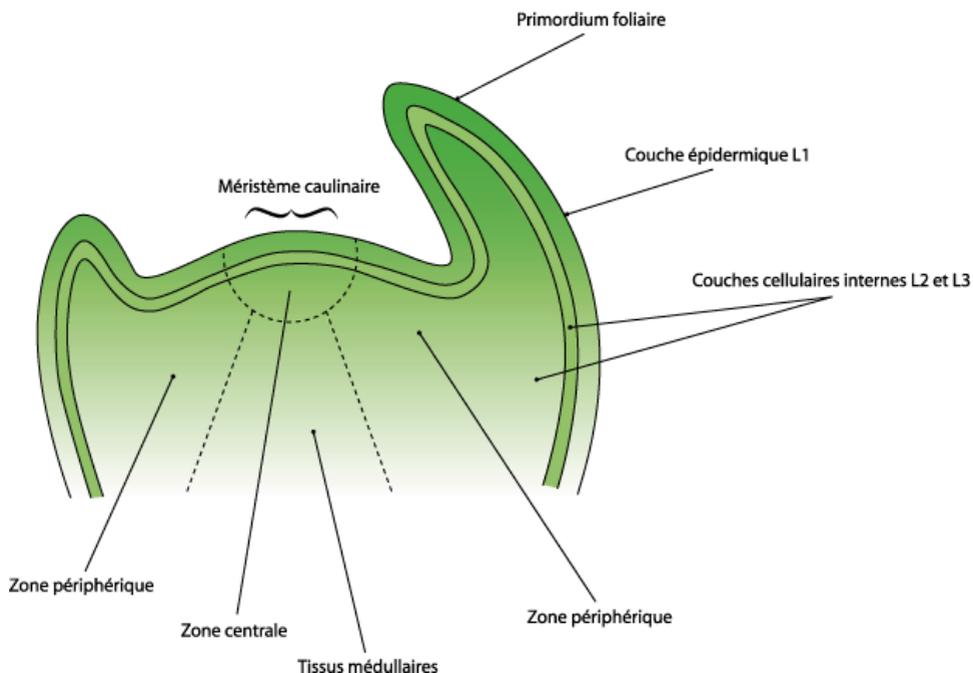


Figure 1 : Méristème caulinaire apical chez les végétaux

Les cellules L1 sont à la base des tissus épidermiques, les cellules L2 sont à la base des tissus reproducteurs, les cellules L3 donnent les tissus conducteurs. Chez la vigne les couches cellulaires L2 et L3 sont confondues

groupées selon leur origine technologique (6).

L'analyse génomique a également permis de montrer que plusieurs levures industrielles (œnologiques ou brassicoles) sont des hybrides inter-espèces (7),(8).

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence le rôle des microorganismes dans l'arôme final des vins, et la capacité des souches de levure à révéler ou produire des arômes, ce qui a été un critère important de sélection. Cependant, les mécanismes biochimiques à l'origine de cette capacité sont encore imparfaitement caractérisés. La compréhension de ces mécanismes permettra d'identifier des voies métaboliques encore inconnues, et d'envisager des moyens technologiques de contrôle de ces voies en vue de mieux maîtriser l'équilibre aromatique des vins produits (9).

Louis Pasteur, pionnier dans l'analyse des microorganismes des vins et des moûts en fermentation, a montré l'importance de la levure et il s'est particulièrement préoccupé de la conservation des vins, qui était un problème crucial à la fin du XIX^e siècle. A l'heure actuelle l'utilisation des sulfites, composés antioxydants et antibactériens facilite grandement la vinification et la conservation des vins. L'utilisation des sulfites est parfaitement contrôlée à l'heure actuelle par les œnologues et des quantités minimales sont trouvées dans les vins; leur quantité est généralement inférieure à 10 fois la dose légale tolérée pour la commercialisation.

Dans une fermentation spontanée d'un moût, (la prolifération des bactéries lactiques est limitée par l'addition de sulfites), la première étape de fermentation du glu-

cose et du fructose est effectuée par les levures apiculées (*Klockera*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*...) qui sont abondantes sur les baies de raisin (10). A partir de 3% d'alcool, la levure *Saccaromyces cerevisiae* (ou espèce apparentée) présente en faible nombre prolifère et prend la suite, car elle est capable de résister à plus de 16% d'éthanol. Les fermentations spontanées sont longues (>1an) et demandent beaucoup de soin et de savoir-faire de la part du viticulteur et du vinificateur. L'utilisation de levains s'est imposée comme en boulangerie et à l'heure actuelle plus de 70% des vins sont élaborés à l'aide de levures sèches actives (LSA). L'addition de LSA aux moûts permet d'obtenir une fermentation complète en 3 semaines environ, de pouvoir mettre le vin à l'abri et de libérer la cuverie, ce qui est un avantage considérable pour une cave coopérative. De plus, les levures œnologiques sont des levures sélectionnées pour leurs capacités fermentaires et œnologiques. En effet, la fermentation œnologique a des caractéristiques particulières: pH bas, vers 3,25, forte pression osmotique (plus de 200g/l de sucres), peu d'azote et une carence en oxygène qui s'établit rapidement (Figure 2). Ceci a donc exigé une sélection rigoureuse pour identifier des levures œnologiques capables de réaliser d'une part la fermentation et d'autre part de conduire à des vins sans défauts organoleptiques. Ces levures ont été sélectionnées à partir de vignobles, de chais ou de moûts en cours de fermentation. Les critères retenus pour la sélection ont été en général, 1. la capacité fermentaire, 2. le faible niveau de mousse, 3. la faible production d'acide acétique, 4.

% ergostérol

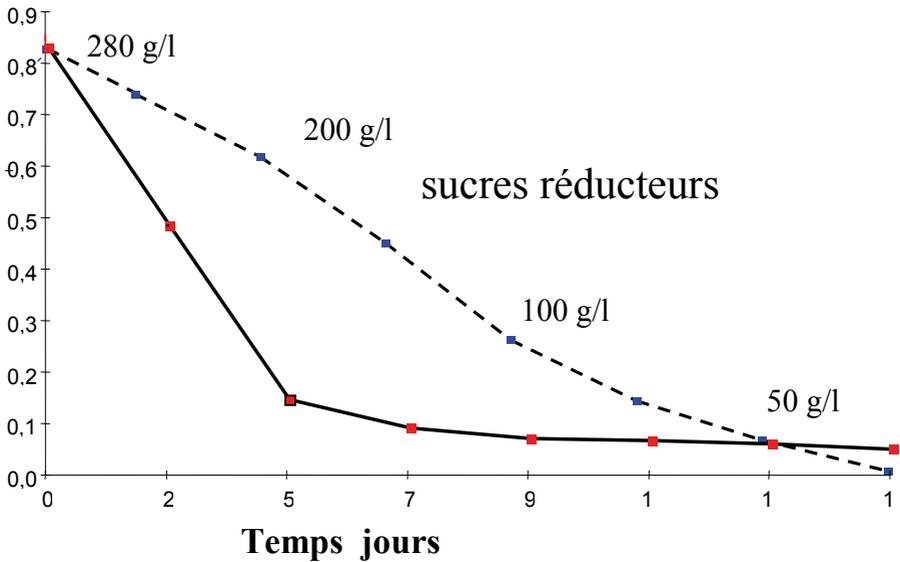


Figure 2 : Suivi de fermentation œnologique

La synthèse des stérols exige de l'oxygène moléculaire, la diminution de la teneur en ergostérol de levures est directement corrélée avec l'établissement de l'anaérobiose.

la faible production de H_2S et de SO_2 , 5. la qualité des vins obtenus après dégustation et en final 6. la capacité de la levure à la dessiccation. Ce dernier critère a éliminé toutes les levures de l'espèce *S. uvarum* qui pourtant a été isolée à partir de différents vins d'excellente qualité gustative (11). A titre d'exemple, l'INRA de Colmar a sélectionné entre autres, Levuline ALS, Levuline D24, Levuline C19, Ceres C2C, CeresB201, qui sont commercialisées depuis plusieurs années dans le monde entier (www.oenofrance.fr).

La question souvent débattue et sans réponse définitive à l'heure actuelle concerne la supériorité des fermentations spontanées par rapport aux fermentationsensemencées

avec des LSA. En effet, les fermentations spontanées impliquant plusieurs espèces de levures ont une durée de fermentation longue et les vins pourraient gagner en qualité gustative et en typicité. Si ceci n'est pas prouvé, on sait en revanche suite à plusieurs études qu'il n'existe pas de levure spécifique de terroirs ou de chais de manière durable. A l'heure actuelle, les études portent sur des cultures mixtes de levures sélectionnées (12) afin d'évaluer la qualité des vins obtenus par rapport à l'utilisation d'une LSA spécifique. Ces études sont sous-tendues par les progrès réalisés dans la connaissance des activités enzymatiques et des gènes impliquées dans la synthèse ou le métabolisme des composés aromatiques (13).

BIBLIOGRAPHIE

1. MC GOVERN P.E., MIRZOIAN A., HALL G.R.. Ancient Egyptian herbal wines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009, 106 (18) 7361-7366.
2. HOCQUIGNY S, PELS Y F, DUMAS V, KINDT S, HELOIR M-C, MERDINOGLU D. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. Genome 2004, 47(3):579-589.
3. DUCHÊNE E, BUTTERLIN G, CLAUDEL P, DUMAS V, JAEGLI N, MERDINOGLU D. A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-D: -xylulose synthase gene colocalizes with a major quantitative trait loci for terpenol content. Theor. Appl. Genet. 2009, 118(3):541-552
4. SWIEGERS JH, KIEVIT RL, SIEBERT T, LATTEY KA, BRAMLEY BR, FRANCIS IL, KING ES, PRETORIUS IS. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. Food Microbiol. 2009, 26(2):204-211
5. LEGRAS J-L, KARST F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiol. Lett 2003, 221(2):249-255
6. LEGRAS J-L, MERDINOGLU D., CORNUET J.M., KARST F. Bread, Beer and Wine : *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. Molecular Ecology 2007 16(10) 2091-2102.
7. LE JEUNE C, LOLLIER M, DEMUYTER C, ERNY C, LEGRAS J-L, AIGLE M, MASNEUF-POMARÈDE I. Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. FEMS Yeast Res. 2007, 7(4):540-549
8. CASAREGOLA S, NGUYEN HV, LAPATHITIS G, KOTYK A, GAILLARDIN C. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001, 51(4):1607-1618.
9. SWIEGERS JH, CAPONE DL, PARDON KH, ELSEY GM, SEFTON MA, FRANCIS IL, PRETORIUS IS. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. Yeast 2007, 24(7):561-574.

10. LE JEUNE C, ERNY C, DEMUYTER C, LOLLIER M. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiol.* 2006, 23(8):709-716.
11. MASNEUF-POMARÈDE I, LE JEUNE C, DURRENS P, LOLLIER M, AIGLE M, DUBOURDIEU D. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* using microsatellite markers. *Syst. Appl. Microbiol.* 2007, 30(1):75-82.
12. KINGES, SWIEGERS JH, TRAVIS B, FRANCIS IL, BASTIAN SEP, PRETORIUS IS. Coinoculated fermentations using *saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. sauvignon blanc wines. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56(22):10829-10837.
13. NEVOIGT E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, 72(3):379-412.

SOMMAIRE

EDITORIAL :**Hommage à notre collègue Sylvie TRASSARD**

Le bureau de L'AFH, B. ARBEILLE et l'équipe de Microscopie Electronique du CHU de TOURS page 11

ARTICLES :**Histopathologie testiculaire chez la souris**

M. TELETIN, C. DENNEFELD, M. KLOPFENSTEIN, B. FERET, N. B. GHYSELINCK et M. MARK page 13

Visualisation des coupes histologiques des follicules ovariens de *barbus callensis* variation de fixateurs et de colorants

H. DJOUDAD-KADJI, S. BENSLIMANE, C. CHEVALIER, B. KADJI, J.-M. EXBRAYAT, M. IGUER-OUADA page 21

Premières observations histologiques de l'oviducte de *boulengerula taitanus*, loveridge 1935, amphibien gymnophone

M. RAQUET, J. MEASEY, J.M. EXBRAYAT page 29

Étude histologique des ovaires d'un amphibien Gymnophone *boulengerula boulengeri* pendant le période de reproduction

H. SERCLERAT, J. MAESEY, J.-M. EXBRAYAT, C. CHEVALIER page 39

Une procédure dédiée au phénotypage de souris porteuses de mutations ciblées, létales *in utero* ou à la naissance

O. WENDLING, M. TELETIN, N. B. GHYSELINCK, M. MARK page 47

Effets de la metformine sur les aspects ultrastructuraux de la glande surrénale chez le rat des sables**(*Psammomys obesus*) soumis à un stress nutritionnel**

N. OMARI, F. HADJ BEKKOUCHE, F. LABROUSSE, A. MESSILI, Y. DAHMANI-AÏT AKLI page 59

Les encéphalopathies spongiformes humaines : Creutzfeldt, Jakob et les autres...

M. CHETAÏL, A. BENCSIK page 81

Le pet-blot épitopique dans l'étude des maladies à prions :**mise en évidence de différents fragments de protéine prion pathologique (prpres) *in situ***

M. CHETAÏL, A. BENCSIK page 85

Premières approches sur l'application de la détection moléculaire par RT-PCR**pour l'identification des hantavirus chez l'aulacode (*thyonomis swinderianus*)**

C. BLE YATANAN, S. KAKOU NGAZOA, S. KOUASSI KAN, M. DOSSO, A. FANTODJI page 99

Histomorphométrie du cartilage articulaire : développement d'un outil de mesure par analyse d'images

F.MARSAIS, M. SMADJA, D. MERCIRIS, F. GENDROT, L. PERRET, R. BRYIS, L. LEPESCHEUX page 107

Évaluation de différentes solutions de décalcification pour l'étude du cartilage :**compatibilité avec les techniques d'histologie, d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ***

É. VELOT, N. MESSADDEQ, J.-L. WEICKERT, A. BIANCHI, L. VENTEO page 115

Les différents systèmes d'amplification en immunohistochimie : avantages, inconvénients et optimisation

L. VENTEO, A. SUTTER page 129

Étude de l'organisation cellulaire d'un tissu de plante par coloration à l'iodure de propidium

M. BUREAU, J. MUTTERER, M. ERHARDT page 143

Un univers invisible à l'œil humain. Avantages et inconvénients de la microscopie électronique

N. MESSADDEQ page 149

Qu'est-ce qu'une image numérique ?

N. ACCART, R. ROOKE page 163

Méthodologie établie pour le rangement des anticorps dans le laboratoire d'histologie

N. KEHRER, C. REYMANN, R. ROOKE, N. ACCART page 171

Spécificité des cépages alsaciens et biodiversité des levures

F. KARST page 177

ILLUSTRATION DE LA COUVERTURE :

Immunofluorescence :

Co-localisation GFAP/iNOS sur des noyaux magnocellulaires d'hypothalamus de rat.

(Danièle Raison and *al.*)