

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Apport des techniques de cryofixation par impact et de cryosubstitution à la connaissance de la jonction épidermo-dermique

Valkenberg, Patrick

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

150690

Département d'Histologie-Embryologie
Promoteur : Prof. R. Leloup
Copromoteur : Dr. M. Leclercq-Smekens

Apport des techniques de cryofixation par
impact et de cryosubstitution à la connaissance
de la jonction épidermo-dermique

Valkenberg Patrick
1989-1990

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 Namur
Tél. 081/72.41.11 - Téléx 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Apport des techniques de cryofixation par impact et de cryosubstitution à la connaissance de la jonction épidermo-dermique

VALKENBERG Patrick

Résumé

Ce travail est une contribution à la connaissance morphologique et immunocytochimique de la jonction épidermo-dermique du mufle de Bovidés.

A la suite de différentes fixations chimiques et techniques de froid (cryofixation par impact sur surface métallique et cryosubstitution), il ressort que l'aspect de la jonction épidermo-dermique est intimement lié à la qualité de la fixation. Selon le traitement subi elle peut présenter un **aspect classique** trilaminaire comprenant une lamina lucida (transparente aux électrons), une lamina densa (dense aux électrons) et une lamina subsasale comprenant des nombreuses structures fibrillaires, ou au contraire, **aspect uniforme**, homogène dense et granuleux. Ce dernier aspect résulterait d'une meilleure conservation et d'une absence de déplacements de ses constituants lors des techniques histologiques et serait donc de ce fait le moins artéfactuel.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1990

Promoteur : R. Leloup

Copromoteur : M. Leclercq-Smekens

Remarque

Dans le cadre de ce travail, il était exclu d'illustrer chacun des exemplaires de ce mémoire par des photographies originales (prix de revient trop élevé). Chacune de nos planches a donc été photocopiée. Malheureusement, certains détails ultrastructuraux ont été atténués par ce procédé. Les originaux restent cependant à la disposition de toute personne désirant les consulter.

Je remercie le Professeur R.Leloup de m'avoir accueilli dans son département. Ses conseils me furent précieux.

J'exprime toute ma gratitude à Mme M.Leclercq-Smekens qui m'a particulièrement suivie et guidée au cours de mes recherches. Elle m'a prodigué aide et conseils avec une grande disponibilité.

Mes remerciements les plus sincères vont également à Mme F.de Bosch-Kemper-Herphelin et à M. R.Déom sans lesquels il n'aurait pas été possible de réaliser ce mémoire.

Ma gratitude s'adresse aussi à Mme. F.Zune-Mossoux et à Mme. M-P.Labbé-Peltgen pour leur aide dactylographique et autres. Je leur sais gré de l'intérêt qu'elles m'ont témoigné.

Je tiens également à remercier Mme A.Degen et M. Y.Poumay pour leur assistance amicale, Mme. N.Fiévet-Henry pour sa contribution au travail électronique, M. J.Collet et M. M.Lombet qui ont été fort précieux pour la réalisation du travail photographique, M. J-M.Pirson et M. Y.Houbion pour leur aide technique, ainsi que la clinique Ste Elisabeth (Salzennes), la clinique St Luc (Bouge) et l'abattoir de Lodelinsart (Charleroi) pour les prélèvements cutanées.

Merci à mes parents pour m'avoir permis de faire ces études, et à toute personne qui de loin ou de près m'a aidé à réaliser ce mémoire.

Table des matières

Introduction	1
1.1. Préparation des tissus pour la microscopie électronique	2
1.2. La cryofixation	4
1.2.1. Formation de cristaux	4
1.2.2. Congélation de matériel biologique	5
1.2.3. Relations structures cellulaires-vitesse de congélation	6
1.2.4. Méthodes de congélation	7
1.2.4.1. Liquides cryogènes	7
1.2.4.2. Congélation par des liquides cryogènes	8
1.2.4.3. Congélation par impact sur une surface froide	9
1.2.4.4. Comparaison des méthodes de congélation	9
1.2.5. Cryoprotection	10
1.3. La cryosubstitution	11
1.3.1. Introduction	11
1.3.2. Milieux de substitution	12
1.3.2.1. Généralités,	12
1.3.2.2. Milieux de substitution améliorés	13
1.4. Les intérêts de la cryofixation et cryosubstitution	15
1.5. La jonction épidermo-dermique	16
1.5.1. Introduction	16
1.5.2. Morphologie de la JED	17
1.5.2.1. En microscopie optique	17
1.5.2.2. En microscopie électronique	17
1.5.3. Biochimie de la JED	19
1.5.3.1. Composition biochimique	19
a) Composants collagéniques	20
1) Collagène de type IV	20
2) Collagène de type VII	20
b) Composants non collagéniques	21
1) Laminine	21
2) Protéoglycanes	21
3) Nidogène	22
4) Fibronectine	22
5) "Antigènes divers"	22
1.5.3.2. Localisation des constituants	23

1.5.3.3. Origine cellulaire des constituants.....	23
1.5.3.4. Durée de vie de la JED.....	24
1.5.4. Rôles de la JED.....	24
1.6. But du mémoire.....	25

Matériel et méthodes..... 26

2.1. Matériel.....	27
2.2. Techniques classiques(TC).....	27
2.1. Pour la microscopie optique.....	27
2.2.1.1. Coloration au trichrome vert.....	28
2.2.1.2. Marquage immunohistochimique à la fluorescéine.....	28
2.2.2. Pour la microscopie électronique.....	29
2.2.2.1. En vue d'une observation morphologique.....	29
2.2.2.2. En vue d'un marquage immunocytochimique.....	30
2.3. Techniques de cryofixation et de cryosubstitution.....	31
2.3.1. Technique de cryofixation (CF).....	31
2.3.2. Technique de cryosubstitution.(CS).....	32
2.3.2.1. Echantillons destinés à un examen morphologique.....	32
2.3.2.2. Echantillons destinés à un marquage immunocytochimique.....	33
2.4. Observation des coupes.....	34

Résultats et discussion..... 35

3.1. Choix du matériel.....	36
3.1.1. Peau humaine.....	36
3.1.2. Peau de rat.....	37
3.1.3. Peau de veau.....	37
3.2. Caractérisation morphologique de la JED du mufle de Bovidés.....	39
3.2.1. Aspects de la JED après techniques classiques.....	39
3.2.2. Aspects de la JED après CF et CS.....	43
3.2.2.1. Choix de la combinaison vitesse-force.....	43
3.2.2.2. Morphologie de la JED.....	47
3.2.2.3. Influence des cryoprotecteurs.....	51
3.2.2.4. Influence du temps de CS.....	55

3.2.2.5. Influence des différents milieux de substitution.....	57
3.3. Caractérisation immunocytochimique de la JED.....	60
3.3.1. Aspects après technique classique	62
3.2.2. Aspects après CF et CS	65
Conclusion et perspectives	69

Bibliographie

Annexe

Abbréviations non usuelles

Ac : anticorps

Ag : antigène

BHAS : Bouin Hollande Sublimé Acétifié

BSA : bovine serum albumine

caco : cacodylate de sodium

CEM : cryo electron microscope

CF : cryofixation

CS : cryosubstitution

EBA : épidermolyse bulleuse aqueuse

EM : electron microscope

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

fix : fixation

fig : figure

GAG : glycosaminoglycanes

glut : glutaraldéhyde

JED : jonction épidermo-dermique

LD : lamina densa

LL : lamina lucida

LSB : lamina subbasale

MET : microscope électronique à transmission

MO : microscopie optique

MP : membrane plasmique

PB : pemphigoïde bulleuse

PBS : phosphate buffer saline

PM : poids moléculaire

RR : rouge de ruthénium

TC : techniques classiques

t.conj. : tissu conjonctif

v : volume

ZG : zone granuleuse

INTRODUCTION

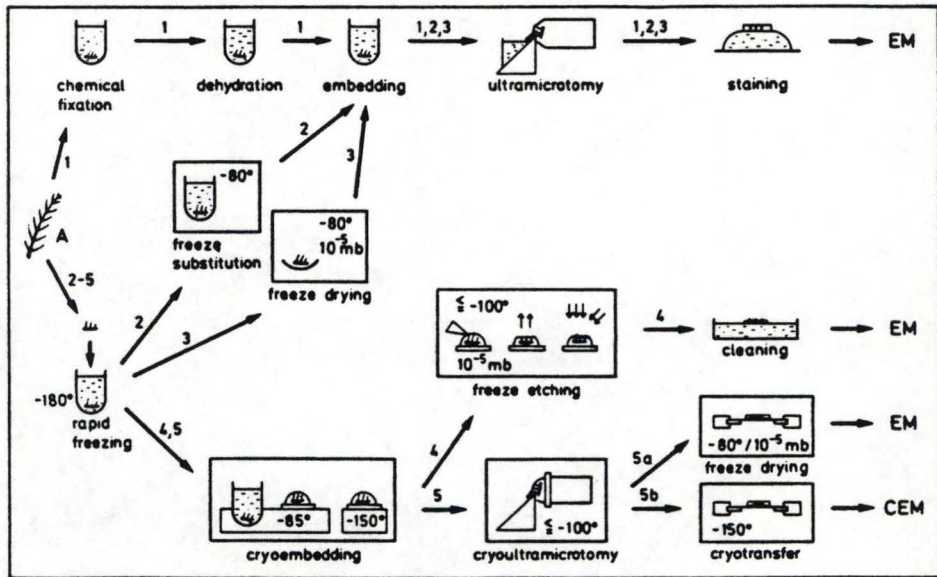


fig. 1 : schéma comparant les étapes principales d'une préparation de spécimen conventionnelle (1) pour la microscopie électronique à ceux d'une cryofixation et ses différentes suites possibles (2-5). La cryofixation est indiquée par l'immersion d'une petite antenne d'insecte (A) dans du propane liquide. La cryosubstitution (2) et la cryodesiccation (3) relie la cryofixation à l'inclusion et à l'ultramicrotomie à température ambiante. La "cryo-inclusion" avec du butyl benzène ou de l'heptane rend les petits spécimens aptes à subir respectivement la cryofracture (4) ou la cryo-ultramicrotomie (5). Un microscope électronique muni d'un système spécial de refroidissement (CEM) est nécessaire pour l'observation de coupes congelées (5b). Les températures autres qu'ambiantes sont données en °C, la pression en millibar (Steinbrecht, 1987).

1.1. Préparation des tissus pour la microscopie électronique

Pour pouvoir être débité en coupes minces observables au microscope électronique à transmission (MET) traditionnel, tout tissu doit subir préalablement un traitement qui comprend trois étapes : la fixation, la déshydratation et l'inclusion (fig.1, voies 1,2,3).

La fixation : elle a pour objectif d'immobiliser les principaux constituants cellulaires dans un état le plus proche possible de l'état vivant .

Elle agit essentiellement sur les molécules, principalement les protéines, responsables de l'architecture cellulaire. En les figeant, elle rend également les tissus aptes à supporter les étapes ultérieures (Gabe, 1968).

Les agents fixateurs les plus communément utilisés sont les fixateurs chimiques. Ils exercent leur action stabilisatrice en créant des liens plus ou moins complexes entre les différentes chaînes protéiques (cross-linkages). De ce fait, ils peuvent modifier la configuration spatiale originelle des molécules (artéfacts de fixation) et par conséquent l'antigénicité des tissus (masquage ou déformation des sites antigéniques) (Hayat, 1970).

La fixation peut aussi être réalisée par des agents physiques. En MET, ce sont les techniques faisant appel au froid (cryofixation) qui se sont les plus développées. Le froid agit par immobilisation physique des constituants cellulaires, il ne se crée pas de liens entre les molécules. Il respecte donc davantage l'architecture et l'antigénicité tissulaire. Cette technique se heurte cependant à un autre problème majeur : la transformation de l'eau tissulaire en cristaux de glace (Robards, 1985). Ces derniers bouleversent toute organisation cellulaire et provoquent la déchirure des membranes (Storey, 1989). Seules les cryofixations ultra-rapides ont permis de minimiser les artéfacts causés par les cristaux (Nicolas, 1989).

La déshydratation : une fois fixés, les tissus destinés à être observés au MET traditionnel (c-à-d non équipé d'un dispositif spécial de refroidissement, fig.1,voie 5b) doivent être déshydratés. Cette étape est rendue nécessaire à cause du

vide régnant dans la colonne du microscope : toute molécule d'eau non fixée s'y évaporerait brutalement en créant des dégâts ultrastructuraux importants (Robards, 1985)

Pour les tissus fixés par agents chimiques (voie 1, fig.1), la déshydratation se fait par une série de bains d'alcool. Cette étape est extrêmement préjudiciable pour les cellules car elle entraîne une perte importante de petits constituants peu ou mal fixés, solubles ou dépolymérisables (Nicolas, 1989).

Pour les tissus cryofixés, l'eau est éliminée soit par cryodessiccation (fig.1, voie 3) soit par cryosubstitution (fig.1, voie 2). Dans la technique de cryodessiccation, les tissus congelés perdent leur eau par sublimation sous vide. Cette technique élimine tout passage par un solvant (Robards, 1985). Lors d'une cryosubstitution, l'eau sous forme de glace dans les tissus, est substituée à basse température par un solvant pur ou contenant un fixateur chimique. Dans ces conditions, les pertes en constituants solubles sont minimisées (Nicolas, 1989).

L'inclusion : après déshydratation les échantillons ne sont généralement pas assez rigidifiés que pour être débités en coupes. Il convient alors de renforcer leur architecture par une inclusion. Il s'agit de faire pénétrer dans l'échantillon une substance semi-fluide, qui, en se polymérisant durcit le tissu (Hayat, 1970).

Les milieux d'inclusion les plus utilisés en MET sont généralement des résines époxy hydrophobes comme l'Epon 812 (Hayat, 1970) et des résines acryliques souvent légèrement hydrophiles comme le LR White (Newmann, 1982) et le Lowicryl K4M (Altman, 1984). Les résines époxy diffèrent également des résines acryliques par leur plus grande stabilité sous les électrons car ces polymères possèdent beaucoup de groupements aromatiques (Bance, 1982). Ils forment aussi de nombreux liens entre eux et avec les constituants cellulaires. Cette particularité accentue encore la déformation de l'architecture primitive (Hayat, 1970). Les résines acryliques par contre ne créent que peu de liens avec le tissu, respectant ainsi davantage l'organisation moléculaire et surtout l'antigénicité tissulaire. Elles conviennent donc particulièrement pour les études immunocytochimiques (Timms, 1986; Bendayan, 1987). En plus, certaines d'entre elles (les

Lowicryl, LR Gold) polymérisent à basse température (sous rayons U.V.), et sont dès lors particulièrement intéressantes dans le traitement de tissu congelé (Acetarin, 1986; Carlemalm, 1982; Humbel, 1986).

1.2. La cryofixation

Le processus fondamental de la cryofixation est la congélation c'est-à-dire la conversion de l'eau intra- et extracellulaire de l'état liquide à l'état solide. Cette phase de transition, débutant à une température (t°) appelée t° de fusion, est régie par des facteurs tels que la vitesse de refroidissement, la présence de solutés et la pression.

Dans les systèmes biologiques aussi complexes que les cellules, les changements physico-chimiques survenant durant la congélation ne sont encore qu'incomplètement compris à l'heure actuelle. On se contente avec les méthodes de congélation de limiter les dégâts tissulaires provoqués par la formation des cristaux (Robards, 1985).

1.2.1. Formation de cristaux

Dans le cas de l'eau pure, la formation des cristaux ou cristallisation n'est pas immédiate à 273 K (0°C). L'eau passe d'abord par un état métastable de surfusion où les cristaux aussitôt formés se redissocient. Mais plus on diminue la température, plus ces petits cristaux deviennent stables et la cristallisation proprement dite finit par démarrer autour de ces structures appelées pour cette raison "centres de nucléation". En s'agrandissant les cristaux finissent par remplir tout le volume (Robards, 1985). La congélation d'un liquide se fait ainsi en deux étapes à savoir la nucléation (formation des centres de nucléation) et la croissance des cristaux. Dans le cas de l'eau pure, la nucléation est dite de type homogène (Bachmann, 1987).

La vitesse de cristallisation dépend de la température et devient nulle à une température déterminée appelée " t° de

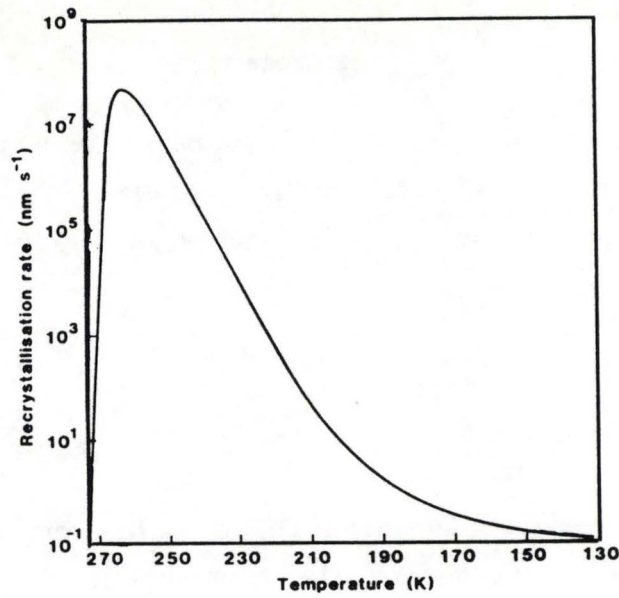


fig.2 : variation de la vitesse de la cristallisation de l'eau pure en fonction de la température. La vitesse de la cristallisation est dépendante de la t° avec un maximum à 260 K (-13 °C) (d'après Robards, 1985)

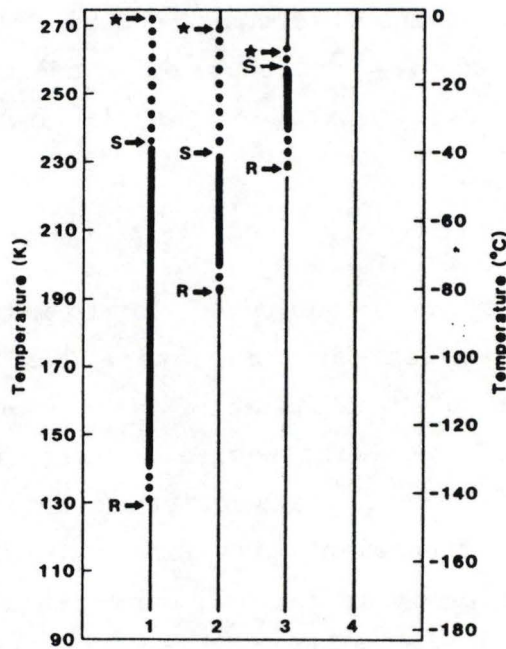


fig.3 : comparaison des t° de nucléation (S) et de recristallisation (R) de l'eau pure et de différents états cellulaires (d'après Robards, 1985).

- (1) eau pure
- (2) cellule active
- (3) cellule cryoprotégée
- (4) cellule déshydratée
- * = t° de fusion

recristallisation¹". Dans le cas de l'eau pure elle est maximale à 260 K (-13°C) et s'arrête à une t° de 130 K (-143°C) (fig.2). La croissance des cristaux se fait donc exclusivement à l'intérieur de l'intervalle défini par la t° de nucléation (t° à laquelle débute la cristallisation proprement dite) et la t° de recristallisation (Robards, 1985).

La taille des cristaux est inversement proportionnelle à la vitesse de refroidissement (plus lente est la vitesse de refroidissement plus grands seront les cristaux formés) (Bald, 1986).

Sachant ceci, on comprend que pour éviter la formation des cristaux, il faut refroidir le plus vite possible en dessous de la t° de recristallisation. L'absence totale de cristaux (état de vitrification) est un idéal recherché. Dubochet (1981) a montré qu'une vitrification d'eau pure est possible, elle requiert cependant une vitesse de refroidissement estimée à $3 \cdot 10^6 \text{ Ks}^{-1}$ (Bald, 1986).

1.2.2. Congélation de matériel biologique

Lorsqu'on se trouve en présence de solutés, la t° de nucléation est abaissée tandis que la t° de recristallisation est augmentée. La cellule contenant environ 80% d'eau, la t° de nucléation ne se retrouve diminuée que de 2 K par rapport à celle de l'eau pure tandis que sa t° de recristallisation est augmentée de 50 K (Robards, 1985). Pour la majorité des systèmes biologiques, la t° de recristallisation se situe entre 193 K (-80°C) et 178 K (-95 °C) (Müller, 1980). Ainsi l'intervalle critique à traverser le plus rapidement possible se trouve diminué (diminution qui sera encore accentuée dans le cas de l'emploi de cryoprotecteurs; fig.3) (Robards, 1985).

Dans un tel système, les cristaux de glace croissent en s'associant avec les solutés sans jamais cependant les

¹ t° de recristallisation : lorsqu'un échantillon se trouve à une t° inférieure à la t° de recristallisation et que l'on remonte sa t° une cristallisation spontanée (même à partir d'un état non cristallin) s'installe dès que la t° atteint la valeur de la t° de recristallisation. D'où le nom de celle-ci.

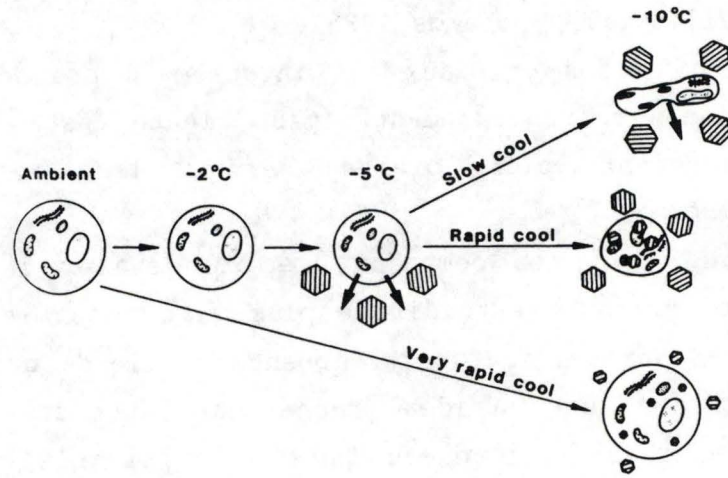


fig.4 : diagramme illustrant les effets de différentes vitesses de congélation sur les cellules. Les vitesses de congélation lentes conduisent à une sortie d'eau à travers la membrane plasmique et une formation de cristaux dans le milieu extérieur. Les vitesses intermédiaires provoquent la formation de cristaux dans le milieu intra- et extracellulaire. Les vitesses élevées ne conduisent qu'à la formation de petits cristaux (Robards, 1985).

incorporer. La nucléation est de type hétérogène. Comme les cristaux de glace n'acceptent que les molécules d'eau, les solutés du milieu cellulaire deviennent plus concentrés au cours de la cristallisation. Ce fait est inévitable, indépendamment de la taille des cristaux et s'accompagne d'un changement de pH et d'osmolarité de la solution résultante (Bachmann, 1987). Ainsi au fur et à mesure que la cristallisation avance, la concentration des solutés augmente jusqu'à atteindre le point de solubilité auquel il y a précipitation. C'est cette précipitation qui donne lieu aux compartiments de ségrégation observés lors des artéfacts de congélation (Robards, 1985).

Il est intéressant de noter que dans la cellule il existe deux compartiments d'eau : - l'eau dite "libre", qui est congelée lors d'une cryofixation ou déplacée lors d'une déshydratation et

- l'eau dite "liée" appelée aussi l'eau de constitution qui entoure toute macromolécule biologique et qui participe à sa configuration spatiale. Elle ne peut être congelée ni déplacée par des solvants organiques ou par le vide (Kellenberger, 1987).

D'après Kellenberger (1987) les molécules organiques deviennent plus hydrophiles quand la t° diminue. Il s'ensuit que les basses t° favorisent la formation des couches d'eau de constitution et celles-ci permettraient une bonne intégration du matériel biologique dans la glace. Ainsi la congélation ne devrait pas avoir un effet aussi dramatique sur la conformation moléculaire que le déplacement de l'eau par un solvant. Cantor (cité par Kellenberger, 1987) avance cependant l'idée d'une certaine dénaturation froide : l'hydrophilie des molécules étant augmentée à basse t° , les acides aminés primitivement hydrophobes devenant plus hydrophiles auraient tendance à se tourner vers l'extérieur de la protéine modifiant ainsi sa configuration.

1.2.3. Relations structures cellulaires-vitesse de congélation

La vitesse de congélation peut varier de $0,1 \text{ Ks}^{-1}$ à 10^4 Ks^{-1} (fig.4) : - à vitesse lente ($< 1.0 \text{ Ks}^{-1}$) la cristallisation commence dans l'espace extracellulaire ce qui provoque un appel

commence dans l'espace extracellulaire ce qui provoque un appel d'eau de l'intérieur de la cellule vers le milieu extérieur et entraîne donc une rétraction et déformation des cellules. Après décongélation, ces cellules restent viables car les organites n'ont pas été détruits par les cristaux extracellulaires.

- une vitesse intermédiaire (1 à 1000 Ks⁻¹) est trop rapide pour que l'eau puisse sortir des cellules mais trop lente pour traverser l'intervalle critique sans dommager la cellule. Il y a ainsi formation de cristaux de 4-5µm qui détruisent toutes les structures cytoplasmiques et rendent les cellules non viables.

- à vitesse rapide (> 1000 Ks⁻¹) par contre il n'y a que formation de petits cristaux (1-2µm). On estime généralement qu'il faut une vitesse supérieure à 10 000 Ks⁻¹ (vitesse ultra-rapide), pour garantir une bonne préservation ultrastructurale et une viabilité optimale pour des cellules non cryoprotégées.

A ces vitesses ultra-rapides les cristaux formés sont généralement d'une taille inférieure à 10 nm. Les dégâts qu'ils occasionnent dans les cellules sont minimisés et ne sont plus détectables lors d'un examen au microscope électronique (du moins en tenant compte du pouvoir de résolution des microscopes actuels) (Robards, 1985).

1.2.4. Méthodes de congélation

Pour limiter les dommages causés par les cristaux de glace c-à-d pour obtenir des cristaux aussi petits que possible, de nombreuses méthodes de congélation ont été développées. On peut les classer en deux groupes:

- congélation par un liquide dit cryogène
- congélation par une surface solide.

1.2.4.1. Liquides cryogènes

Les liquides cryogènes doivent répondre à plusieurs impératifs. Ils doivent d'abord avoir une t° de fusion suffisamment basse que pour être liquides aux t° de congélation et une t° d'ébullition suffisamment haute pour éviter le

phénomène de "Leidenfrost". Ce phénomène s'observe lorsqu'un échantillon d'une t° plus élevée que la t° d'ébullition du liquide cryogène est plongé dans ce liquide : la trop grande différence de t° entre les deux provoque un échange de chaleur qui entraîne la formation d'un film de gaz isolant autour de l'objet et en retarde de ce fait le refroidissement. C'est à cause de ce phénomène que l'azote liquide n'est pratiquement plus employé à l'heure actuelle que pour refroidir un autre cryogène (dans ce cas-ci c'est le plus souvent l'isopentane) qui, lui, servira à cryofixer l'échantillon. Enfin les liquides cryogènes doivent aussi être de bons conducteurs de chaleur et avoir une capacité calorifique élevée (Robards, 1985).

1.2.4.2. Congélation par des liquides cryogènes

Quatre procédés de congélation par liquides cryogènes sont principalement utilisés actuellement (Robards, 1985) :

- a) *par immersion* : l'échantillon est plongé rapidement dans le liquide cryogène. Cette technique simple (et peu onéreuse) convient pour des spécimens de petite taille, mais des vitesses de congélation élevées ne sont pas atteintes.
- b) *le jet-freezing* : le spécimen est coincé entre deux plaques de métal, sa congélation se fait par l'envoi d'un jet de liquide cryogène (le propane est le plus souvent utilisé). Cette technique complexe (et chère) est utilisable pour des spécimens plats (culture monolayer) et est idéale pour toute préparation destinée à une cryofracture.
- c) *le spray-freezing* : des petites gouttes de suspensions cellulaires ou émulsions sont atomisées dans le liquide cryogène. Cette technique ne s'applique donc qu'à des suspensions ou des solutions de faible viscosité.
- d) *congélation sous haute pression* : on congèle sous une pression d'environ 2000 bars. A cette pression le point de fusion de l'eau est descendu à 251 K (-22°C) et une vitesse de 10^2 Ks^{-1} suffit pour cryofixer un échantillon biologique. C'est la seule technique pour obtenir une bonne préservation structurale de la totalité de blocs de tissus de grande

	0 (273)	- 100 (173)	- 196 (77)	- 253 (20)	- 269 (4)
Plastic (PTFE)	2.5	2.5	2.4	1.4	0.5
Sapphire	46	82	960	15,700	410
Aluminium	210	210	410		15,000
Copper (crude)	400	400	460	1,200	380
Copper (ultra-pure)	398	413	570	10,500	11,300
Silver	427	430	471	5,100	14,700
Gold	315	327	352	1,500	1,710
Titanium	22	25	34	28	5.76
Stainless steel	15	13	9.4	2.0	0.3
Glass (Pyrex)	1.0	0.9	0.55	0.15	0.1
Quartz	1.38				

fig. 5 : comparaison de la conductivité thermique à différentes t° de certains solides employés lors de la cryofixation par impact (Robards, 1985).

dimension non cryoprotégés .Cependant elle demande un appareillage complexe et coûteux.

1.2.4.3. Congélation par impact sur une surface froide

L'échantillon est plaqué rapidement contre une plaque métallique refroidie préalablement par un liquide cryogène. Un des premiers à développer cette méthode fut Van Harreveld (1964) qui utilisa un bloc d'argent refroidi par azote liquide.

Les métaux conduisent mieux la chaleur que les liquides et présentent une capacité calorifique plus grande. Leur conductivité thermique augmentant quand la t° diminue, l'idéal selon Robards (1985) (fig.5, flèche) serait de cryofixer sur un bloc d'aluminium refroidi par de l'hélium (liquide qui permet d'atteindre des t° suffisamment basses - 4K (-269 °C) - que pour permettre à l'aluminium une conductivité optimale. D'excellents résultats peuvent cependant aussi être obtenus avec du cuivre brut refroidi à l'aide d'azote liquide (Verna, 1983) (fig.5, encadré).

1.2.4.4. Comparaison des méthodes de congélation

La cryofixation sur surface métallique présente quelques inconvénients. Ainsi le spécimen n'est congelé que du côté de l'impact sur une large surface plate. Du fait de cet unilatéralité, une congélation par liquide sera donc à préférer dans le cas où une congélation totale est souhaitée.

L'impact sur bloc métallique peut aussi provoquer certaines déformations mécaniques du tissu congelé.

Cependant à cause des meilleurs propriétés thermiques des solides employés, la cryofixation par impact permet d'atteindre plus vite des basses t° au sein des tissus et par conséquent de limiter la taille des cristaux formés (Robards, 1985).

Dempsey (1976) a montré que la zone correctement congelée après cryofixation sur bloc était épaisse d'environ 12 μm . Au-delà, la taille des cristaux augmente exponentiellement.

Il est à signaler que les autres méthodes de congélation ne donnent pas de meilleurs résultats. Au contraire, la couche

correctement congelée est souvent inférieure à 12 μm . Cette limitation est due au mauvais transfert de chaleur à travers tout matériel biologique (Robards, 1985). Seule la cryofixation sous haute pression permet d'observer une zone bien préservée, d'une épaisseur de plus ou moins 300 μm (Sitte, 1987).

Ainsi en définitive, le choix d'une méthode de cryofixation dépendra plus de la nature du spécimen et du but recherché que de l'efficacité réelle de la méthode même (Robards, 1985).

1.2.5. Cryoprotection

Les limites des zones préservées peuvent être dépassées en utilisant des agents cryoprotecteurs. Il s'agit de substances dont les modes d'action sont multiples : diminution du point de congélation, augmentation de la t° de recristallisation... (Skaer, 1982). Souvent une préfixation chimique est recommandée. Elle rend les membranes perméables aux cryoprotecteurs tout en diminuant souvent les effets nuisibles (gonflement des mitochondries, vésicularisation du reticulum endoplasmique,...) (Sitte, 1987).

Ainsi si les cryoprotecteurs permettent d'éviter les artéfacts de congélation, ils altèrent cependant l'état du spécimen par rapport à sa condition in vivo (Sitte, 1987).

Les agents cryoprotecteurs peuvent être classés en deux groupes, ceux qui pénètrent à l'intérieur de la cellule et ceux qui restent dans le milieu extracellulaire (Skaer, 1982) :

a) *les cryoprotecteurs pénétrants* : éthanol, méthanol, diméthyl sulphoxide... Ils ne peuvent être utilisés lorsqu'il s'agit de préserver la distribution des électrolytes car ils altèrent les propriétés de perméabilité membranaire. Ils se lieraient à l'eau intracytoplasmique, diminuant ainsi la quantité d'eau disponible pour la cristallisation.

b) *les cryoprotecteurs non pénétrants* : saccharose, polyéthylène glycol, polyvinylpyrrolidone... Ils induisent une différence de pression osmotique provoquant une perte d'eau cellulaire, une rétraction cellulaire et une concentration du cytoplasme.

Le glycérol est un cryoprotecteur particulier dans le sens qu'il pénètre dans la cellule si la température d'équilibration (t° à laquelle le cryoprotecteur s'équilibre entre le milieu intra- et extracellulaire) est supérieure à 293 K (20°C). Par contre si la t° d'équilibration est voisine de 273 K (0°C), le glycérol fonctionne comme un cryoprotecteur non pénétrant (Dupiereux, 1989).

1.3. La cryosubstitution

1.3.1. Introduction

La cryosubstitution (CS) est une technique de déshydratation s'appliquant à basse t° sur des tissus congelés. L'eau que le tissu contient sous forme de glace est substituée par un solvant organique à une t° inférieure à la t° de recristallisation (Robards, 1985).

Cette technique fut décrite pour la première fois par Simpson en 1941 (cité par Feder, 1958) comme méthode de préparation pour la microscopie optique. En 1957, Fernandez-Moran (cité par Feder, 1958) l'introduisit en microscopie électronique.

Mais c'est seulement depuis une douzaine d'années qu'elle fut appliquée plus systématiquement grâce aux améliorations apportées aux techniques de cryofixation (Steinbrecht, 1987).

Suivant le protocole expérimental utilisé, on peut classer les partisans de la CS en deux groupes : l'école de Van Harreveld (Van Harreveld, 1965) et l'école de Müller (Steinbrecht, 1987). Tous s'appliquent à améliorer la technique et à rechercher les meilleurs milieux de substitution afin de maintenir les acquis de la CS jusqu'au niveau de la coupe observable en MET (Robards, 1985).

Si généralement les spécimens cryosubstitués sont ensuite infiltrés avec une résine et coupés après polymérisation en vue d'une observation en MET, ils peuvent aussi être traités pour d'autres techniques comme la cryofracture ou la microscopie à balayage (Steinbrecht, 1987).

Solvant	Formule	Point de fusion	
		°C	K
Ethanol (alcohol, ethyl alcohol)	C_2H_5OH	- 117.3	155.7
Methanol (methyl alcohol)	CH_3OH	- 93.9	179.1
Acetone (2-propanone, dimethyl ketone)	CH_3COCH_3	- 95.4	177.6
Diethyl ether (ether, ethyl ether)	$CH_3CH_2OCH_2CH_3$	- 116.2	156.8
1-Propanol (<i>n</i> -propyl alcohol)	$CH_3CH_2CH_2OH$	- 126.5	146.5
1-Butanol	$CH_3CH_2CH_2CH_2OH$	- 89.5	183.5
1-Hexanol (<i>n</i> -hexyl alcohol)	$CH_3(CH_2)_5OH$	- 46.7	226.3
Hexane	$CH_3(CH_2)_4CH_3$	- 95.0	178.0
Propylene oxide (1,2 epoxy propane)	C_3H_6O	- 112.1	160.8
Tetrahydrofuran	C_4H_8O	- 108.5	164.5
Acrolein (Propenal, acrylaldehyde)	$CH_2=CHCHO$	- 87.0	186
Ethylene glycol ^b	$HOCH_2CH_2OH$	- 11.5	261.5

fig. 6 : comparaison de la t° de fusion de différents milieux de substitution utilisés (Robards, 1985)

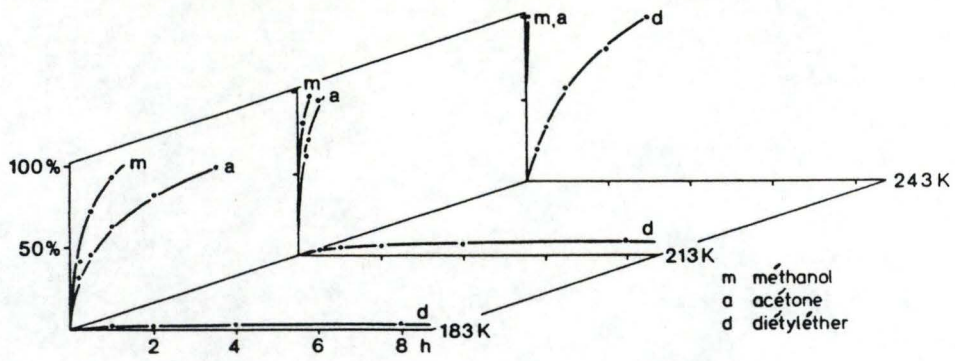


fig.7 : taux de déshydratation de trois milieux de substitution différents (méthanol, acétone et diéthyléther) à trois t° différentes : 183 K (-90°C), 213 K (-60°C) et 243 K (-30°C) (Steinbrecht, 1987)

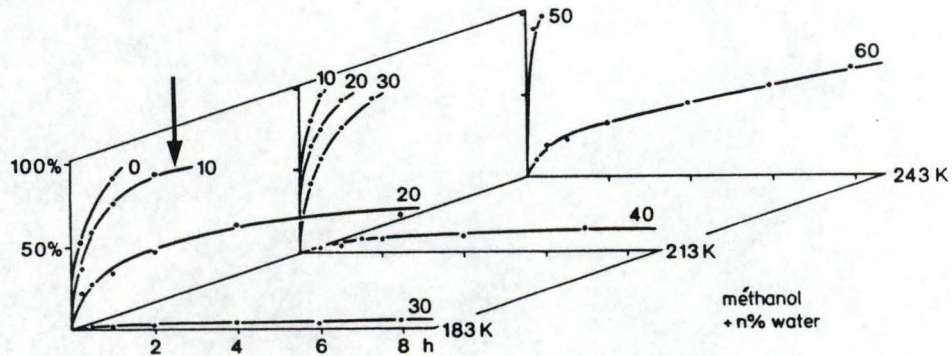


fig.8 : substitution de la glace par le méthanol contenant différents pourcentages en eau à différentes t° (Steinbrecht, 1987)

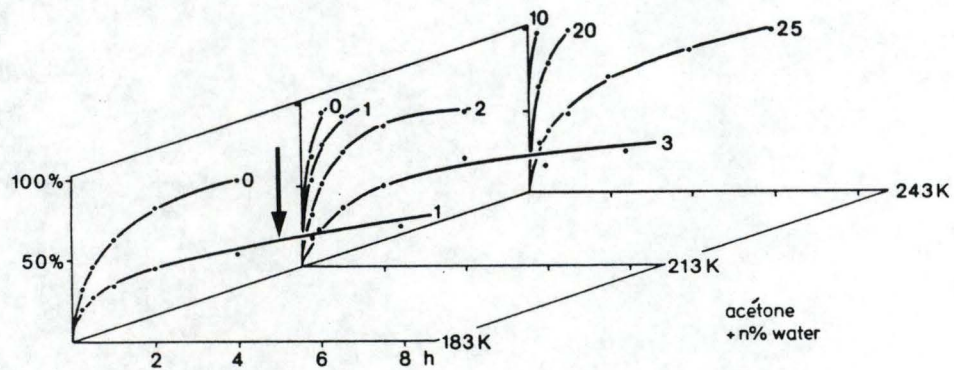


fig.9 : substitution de la glace par l'acétone contenant différents pourcentages en eau à différentes t° (Steinbrecht, 1987).

1.3.2. Milieux de substitution

1.3.2.1. Généralités,

On appelle milieux de substitution, les solvants organiques utilisés en CS. Les méthanol, acétone et diéthyléther sont à l'heure actuelle, les liquides les plus employés (Robards, 1985).

Un milieu de substitution doit satisfaire à plusieurs exigences. Il doit d'abord être capable de dissoudre la glace à une t° en dessous de la t° de recristallisation de celle-ci. Il lui faut donc une t° de fusion assez basse que pour être liquide à cette t° (ainsi la t° de fusion du milieu utilisé détermine la t° à laquelle on substitue un spécimen, fig.6). Il doit aussi être un solvant de différents composants utilisés pour stabiliser les structures cytoplasmiques (fixateurs) ou pour augmenter le contraste des tissus (staining) (Robards, 1985; Steinbrecht, 1987). En outre, sa capacité de déshydratation doit être suffisamment importante que pour permettre aux tissus traités de subir la suite des étapes histologiques (Steinbrecht, 1987).

Humbel (1986) montre que le taux de déshydratation obtenu dans le tissu dépend de la t° et de la capacité de déshydratation du milieu de substitution à cette t° . En comparant le comportement de l'acétone, du méthanol et du diéthyléther (fig.7), il observe, quelle que soit la t° considérée, que le méthanol est meilleur déshydratant que l'acétone, tandis que le diéthyléther est le moins bon des trois milieux de substitution étudiés. Il constate aussi (fig.8, flèche) que du méthanol contenant 10% d'eau est encore capable de se substituer complètement à la glace en trois heures, à 183 K (-90°C). Par contre, à la même t° il faut 8 heures à l'acétone quasi pure (1% d'eau) pour se substituer à seulement 75% de glace (fig.9, flèche).

Malgré ces observations, l'acétone est le milieu de substitution le plus utilisé actuellement (Steinbrecht, 1987).

Ceci peut s'expliquer par la complexité du phénomène de CS. La capacité de déshydratation du milieu n'est qu'un des nombreux paramètres influençant le processus de CS (Robards, 1985) comme

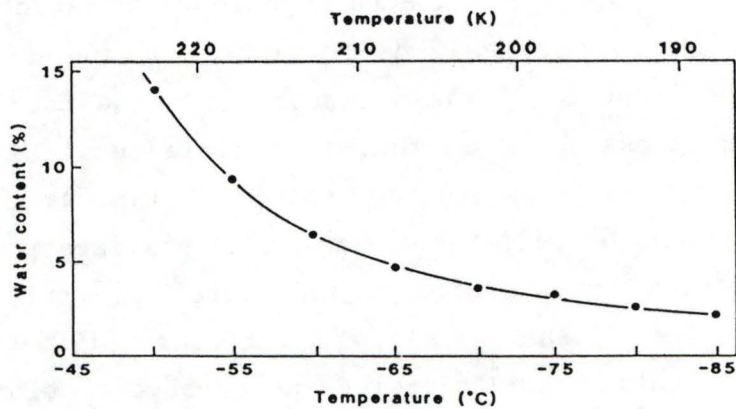


fig.10 : variation du pouvoir de déshydratation de l'acétone en fonction de la t° (le contenu en eau dans l'acétone est exprimé en % de volume) (Robards, 1985)

par exemple : a) la contenance en eau du milieu de substitution au départ, pendant et à la fin du processus de substitution

b) la présence d'un piège moléculaire à eau dans le milieu de substitution. Robards (1985) suggère de mettre un tel piège moléculaire dans le solvant. Mais à part Humbel (1984, cité par Robards, 1985) qui a rapporté l'efficacité de ce piège dans un milieu de diéthyléther, aucune étude systématique n'a été faite à ce sujet.

c) la durée de la CS et la vitesse de réchauffement de la préparation. Comme nous l'avons déjà signalé, il est par exemple très important de respecter à basse t° des temps de CS suffisamment longs pour permettre un degré de déshydratation maximum de l'échantillon (Steinbrecht, 1982; Humbel, 1986). Le pouvoir de déshydratation de l'acétone (et celui de tous les milieux de substitution en général) augmentant avec la t° (fig. 10), on obtient, en réchauffant lentement la préparation, une déshydratation plus complète (Steinbrecht, 1987).

1.3.2.2. Milieux de substitution améliorés

Lorsque les échantillons sont destinés à être inclus dans une résine polymérisant à froid, il ne semble pas nécessaire de rajouter une substance fixatrice dans le milieu de substitution pour autant que l'on reste en dessous de la t° d'effondrement (collapse t° ; Robards, 1985). Cette t° se définit comme la t° en dessous de laquelle il n'y a pas de modifications configurationnelles dans les structures observées. Elle dépend des constituants cellulaires et du solvant (Mac Kenzie, 1967).

Pour les échantillons destinés à une inclusion dans une résine polymérisant à chaud, il est généralement bon d'un point de vue morphologique de renforcer les structures cytoplasmiques par un fixateur chimique ajouté au milieu de substitution (bien que certains solvants comme le méthanol ont eux-mêmes une certaine action stabilisatrice) (Robards, 1985).

L'état congelé du tissu minimise les modifications structurales, les pertes et déplacements de matériel cytoplasmique généralement observés lors de la pénétration des

fixateurs dans les cellules au cours d'une fixation classique à 277 K (4 °C) ou à t° ambiante (Robards, 1985).

Il est à noter que si les fixateurs entrent bien dans les tissus en même temps que le solvant, ils y sont quasi inactifs aux basses t° utilisées au début d'une CS (Steinbrecht, 1987). Humbel (1986) montre qu'il faut 24 heures à 223 K (-50°C) pour fixer seulement 50% des protéines d'un échantillon avec une solution de 3% de glutaraldéhyde. En comparaison, lors d'une fixation chimique classique à 277 K (4 °C), la même solution de glutaraldéhyde conduit à une fixation considérée comme plus ou moins complète après trois heures. De même, le tétr oxyde d'osmium (OsO_4) ne noircit qu'à des t° supérieures à 243 K (-30 °C) et ne réagit avec les lipides insaturés qu'à partir de 248 K (-25 °C) (Robards, 1985).

C'est pour cette raison que les schémas de CS incluent toujours une remontée de t° étape par étape. Ce réchauffement lent de la préparation se fait soit régulièrement en quelques heures après un séjour de 3 à 10 jours à 193 K (-80 °C) (modèle de Van Harreveld), soit par palliers comme le propose le modèle de Müller : 8 heures à 183 K (-90°C), 8 heures à 213 K (-60°C) et 8 heures à 243 K (-30 °C) (Steinbrecht, 1987).

Outre l' OsO_4 et le glutaraldéhyde, d'autres produits utilisés en microscopie traditionnelle ont été testés avec satisfaction en CS. C'est le cas de l'acroléine, de l'acétate d'uranyle (utilisé à la fois comme fixateur et contrastant) (Zalokar, 1966).

Le choix des fixateurs employés en CS est fonction de la nature du spécimen et de l'objectif visé. Mais ce choix dépend avant tout du solvant utilisé. Ainsi, l'acétate d'uranyle se montre insoluble dans l'acétone (Robards, 1985). De même, l'utilisation du glutaraldéhyde en association avec l'acétone n'est pas recommandée car ce fixateur (habituellement vendu dans le commerce en solution aqueuse) introduit trop d'eau dans le milieu (Steinbrecht, 1987).

Lorsque le but à atteindre est l'amélioration de la qualité morphologique du tissu, l'emploi d'un milieu de substitution composé de OsO_4 (2-4%) dissout dans de l'acétone donne des résultats satisfaisants (Steinbrecht, 1987). Humbel (1986) recommande l'utilisation simultanée de plusieurs fixateurs : un

complexe formé de glutaraldéhyde (3%), d'OsO₄ (1%) et d'acétate d'uranyle (0,5%) dissout dans du méthanol ("complexe de Müller").

Quand le but souhaité est une étude immunocytochimique ou histochimique, le choix est fonction de l'antigène ou de l'enzyme à révéler. Ainsi Nagele (1985) utilise 3-5% de glutaraldéhyde dissout dans de l'éthanol pour localiser l'actine et la myosine dans des cellules gliales de culture, tandis que Carlemalm (1986, cité par Steinbrecht, 1987) marque la protéine groE chez *Escherichia coli* après passage dans de l'acétone contenant du formaldéhyde. D'autres auteurs utilisent avec succès le solvant pur (méthanol pur ou acétone pure) (Steinbrecht, 1987).

Il est à noter qu'on ne peut éviter en CS une certaine perte de matériel tissulaire comme par exemple de lipides ou de petits composants solubles dans l'eau. Ces pertes sont cependant toujours moindres qu'en microscopie traditionnelle (Steinbrecht, 1987). Ici aussi le choix du bon milieu de substitution est décisif. Ainsi la conservation des lipides est davantage garantie par l'utilisation de méthanol plutôt que d'acétone (Robards, 1985). Le complexe de Müller (à base de méthanol) s'avère particulièrement efficace (Steinbrecht, 1987). Quant aux autres composants diffusibles (sucres, acides aminés, ions,...) l'utilisation de milieux de substitution non polaires, donc non miscibles à l'eau, tel que le diéthyléther permet d'éviter leur disparition (Harvey, 1982).

1.4. Les intérêts de la cryofixation et cryosubstitution

Ainsi, comme nous l'avons déjà signalé, la cryofixation ne crée pas de liens (cross-linkages) entre les composants des tissus contrairement à toute fixation chimique (Kellenberger, 1987). Agissant par immobilisation physique, elle constitue donc une meilleure approche pour préserver la composition originale des spécimens (Zierold, 1987). Elle permet également de figer et de préserver les tissus dans un état physiologique donné (Knoll, 1987). C'est là le principal intérêt de cette technique.

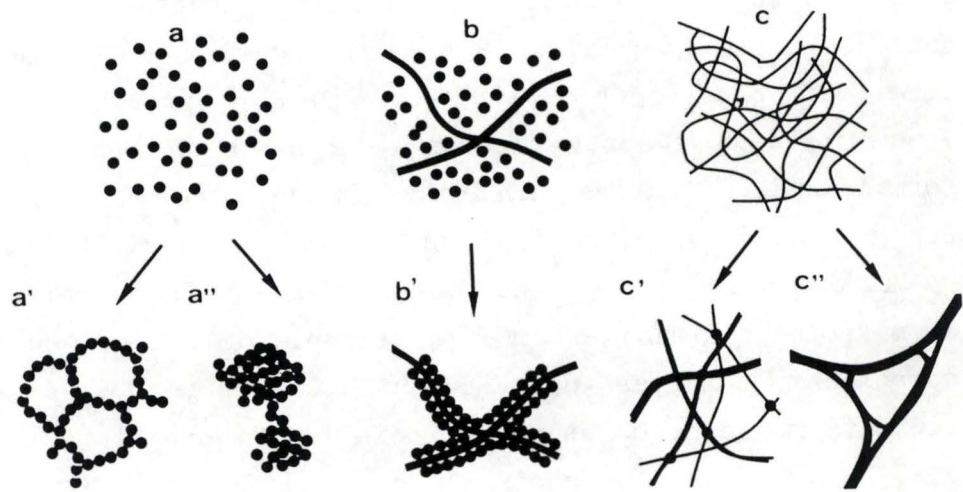


fig.11 : réponse du matériel cellulaire à un remplacement de l'eau par un solvant organique.
 (a) plasma biologique formé de macromolécules globulaires. Agrégations obtenues lors d'une faible (a') ou forte (a'') concentration en macromolécules
 (b) plasma biologique formé de macromolécules globulaires et fibreuses
 (c) plasma biologique formé de macromolécules fibreuses. Agrégations obtenues lors d'une faible (c') ou forte (c'') concentration en macromolécules (Kellenberger, 1987)

Quant à la cryosubstitution, elle garantit avant tout les acquis de la cryofixation : respect de la configuration spatiale des molécules et par conséquent de l'antigénicité.

Un deuxième avantage de cette technique est la préservation de certains constituants tissulaires (lipides, ions, ...) perdus lors des manipulations classiques. La CS paraît être une technique particulièrement indiquée pour la détection de ces substances (Harvey, 1982).

Un autre intérêt non négligeable de la CS réside dans le fait qu'elle permet de minimiser la taille des agrégats moléculaires qui se forment inévitablement lors de toute déshydratation par solvant. En effet, lorsqu'on remplace l'eau tissulaire par un solvant organique, les molécules biologiques (essentiellement hydrophiles et non solubles dans les solvants organiques) se rassemblent obligatoirement (fig. 11). Or il a été démontré (Kellenberger, 1987) que la taille des agrégats formés est fonction de la t° à laquelle se fait la déshydratation : plus basse est cette t° , plus la taille des agrégats est petite. Les basses t° utilisées lors d'une CS garantissent par conséquent une formation réduite de ces agrégats et de ce fait une préservation fine de structures tissulaires.

1.5. La jonction épidermo-dermique

1.5.1. Introduction

En dessous de tout épithélium, à la base des cellules endothéliales, autour de cellules comme les cellules musculaires, les cellules de Schwann ou les adipocytes, la matrice extracellulaire se spécialise sur une mince bande appelée membrane basale (Alberts, 1989).

Dans la peau, l'épithélium (épiderme) est séparé du tissu conjonctif sous-jacent (derme) par une membrane basale particulièrement développée appelée jonction épidermo-dermique (JED). Celle-ci est plus qu'une zone de transition : il s'agit en fait d'une véritable unité fonctionnelle anatomique essentielle pour l'organe peau (Leloup, 1982).

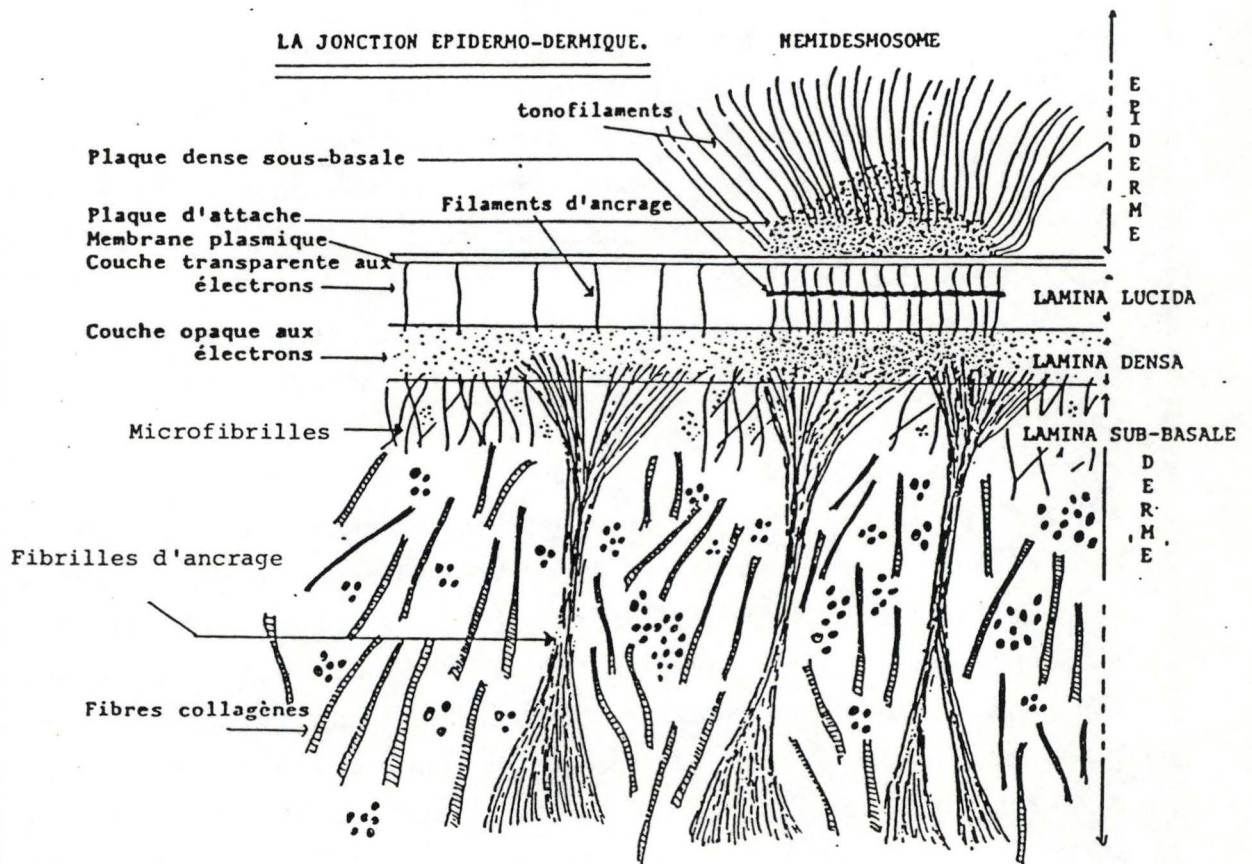


fig.12 : ultrastructure de la jonction épidermo-dermique. On y distingue quatre zones bien distinctes :
 - la membrane plasmique des kératinocytes (cellules majoritaires de l'épiderme) basaux portant des structures d'attache, les hémidesmosomes
 - la lamina lucida, couche transparente aux électrons, parcourue par des filaments d'ancrage
 - la lamina densa, couche dense aux électrons
 - la lamina subbasale, occupée par des éléments fibrillaires formant un réseau en continuité avec le tissu conjonctif sous-jacent (d'après Leloup, 1982)

1.5.2. Morphologie de la JED

1.5.2.1. En microscopie optique

Dans les colorations topographiques de routine (trichromes, ...), la JED apparaît comme une simple zone anhyste, continue, soulignant la limite basale de l'épiderme. Elle suit toutes les invaginations de celui-ci et se retrouve autour des annexes cutanés (follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares).

Des colorations spécifiques révèlent certains de ses constituants. Ainsi la coloration au Periodic Acid Schiff indique un contenu riche en glycosaminoglycanes, la coloration de Wilder l'existence de fibres réticuliniques et l'Orcéine celle de fibres élastiques (Gabe, 1968).

1.5.2.2. En microscopie électronique (fig.12)

L'étude ultrastructurale révèle une structure complexe. Selon Briggaman (1982), on y décrit quatre zones : de l'épiderme vers le derme :

- la membrane plasmique des cellules épidermiques

- basales (MP)

- la lamina lucida (LL)

- la lamina densa (LD)

- la lamina subbasale (LSB)

a) la membrane plasmique

Il s'agit de la membrane plasmique du pôle basal des cellules de l'assise germinative de l'épithélium. D'aspect trilaminaire classique, elle présente une épaisseur approximative de 7 à 9 nm.

Des épaisissements marquent périodiquement cette membrane plasmique. Ce sont des structures d'attache, appelées hémidesmosomes.

Chaque hémidesmosome est formé du côté cytoplasmique d'une plaque d'attache dense en forme de pyramide dont la base est située côté membrane. Des tonofilaments de kératine convergent vers la pointe de la plaque d'attache où ils s'implantent en une formation dense.

b) la lamina lucida (ou lamina rara)

Cette zone transparente aux électrons est épaisse de 20 à 40 nm et paraît le plus souvent amorphe.

De fins filaments issus du feuillet externe de la membrane plasmique traversent perpendiculairement la lamina lucida pour s'unir à la lamina densa : ce sont les filaments d'ancrage. Ils sont plus nombreux dans les régions sous-jacentes aux hémidesmosomes. Il existe également dans ces zones sous-jacentes aux hémidesmosomes des structures linéaires denses et parallèles à la membrane plasmique appelées plaques denses sous-basales.

c) la lamina densa (ou lamina basale)

C'est une zone dense aux électrons d'aspect granulo-filamenteux. Son épaisseur non constante varie de 30 à 50 nm.

Un dédoublement de cette lamina densa résultant d'un remodelage local de la JED peut parfois s'observer.

d) la lamina subbasale (ou lamina fibro-reticularis)

Cette zone contient trois types de structures fibreuses :

- les fibrilles d'ancrage : associées en faisceaux présentant une zone centrale striée et des extrémités étalées en éventail, elles s'unissent avec la LD coté épidermique et s'étendent dans le derme à l'autre côté.

- les microfibrilles : disposées perpendiculairement par rapport à la JED, elles sont arrimées via leurs extrémités épidermiques à la LD et réalisent un pontage avec les fibres élastiques du derme (ce serait ces fibres que la coloration Orcéine met en évidence)

- les fibres de collagène : le plus souvent isolées ou parfois groupées en faisceaux, elles présentent une situation périodique caractéristique (elles correspondraient aux filaments réticuliniques décrits en microscopie optique)

Cette description de Briggaman de la JED est communément admise à l'heure actuelle et se retrouve avec quelques variantes minimales au niveau de toutes les membranes basales décrites (Bernfield, 1984; Alberts, 1989).

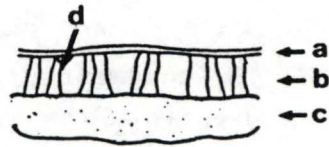


fig.13 : schéma d'une membrane basale après fixation à l'acide tannique (Gordon, 1980)
 (a) membrane plasmique des kératinocytes
 (b) lamina lucida
 (c) lamina densa
 (d) filament d'ancrage

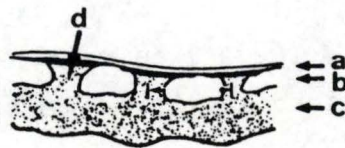


fig.14 : schéma d'une membrane basale après fixation au rouge de ruthénium (Gordon, 1982)
 (a) membrane plasmique des kératinocytes
 (b) lamina lucida
 (c) lamina densa
 (d) plaque dense ("pied")

Mais à côté de cette description classique, certains auteurs en présentent une autre.

Ainsi, après avoir utilisé l'acide tannique comme fixateur, Gordon (1980) constate une LD beaucoup plus régulière en épaisseur que dans le schéma classique, reliée à la membrane plasmique des kératinocytes basaux par de très nombreux filaments passant à travers la LL (fig.13). En employant le rouge de ruthénium comme fixateur, il observe un matériel dense à la fois dans la LD et LL et des plaques denses ("pieds") émanant de la LD pour rejoindre l'épiderme (fig.14).

Goldberg (1986) lui, en travaillant avec du matériel cryofixé et cryosubstitué, obtient sous la membrane plasmique l'image d'une zone homogène dense, unique, non séparée en LL et LD. Pour cet auteur, la LL décrite dans les schémas classiques serait artéfactuelle : elle résulterait de la précipitation de glycosaminoglycanes lors de toute fixation aldéhydique classique

1.5.3. Biochimie de la JED

1.5.3.1. Composition biochimique

On soupçonne dans la JED, la présence d'une quarantaine de composants (Bernfield, 1984). Mais actuellement, seuls quelques-uns ont été identifiés avec certitude (Uitto, 1989).

On les divise classiquement en composants collagéniques et non collagéniques (Kefalides, 1979):

composants collagéniques :

collagène de type IV
collagène de type VII

composants non collagéniques :

laminine
protéoglycanes
fibronectine
nidogène
"antigènes divers"

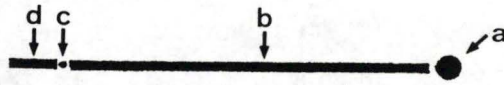


fig.15 : schéma d'une molécule de collagène IV (d'après Burgeson, 1988)
 (a) région globulaire NC₁
 (b) triple hélice majeure
 (c) segment non collagénique NC₂
 (d) triple hélice 7S

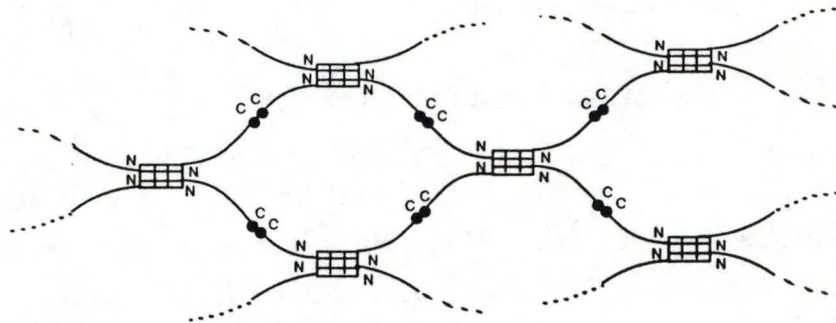


fig.16 : modèle du réseau de collagène IV : association extrémité à extrémité : les molécules forment des dimères avec leur extrémité NC₁ et des tétramères avec leur extrémité 7S
 (Borel, 1984)

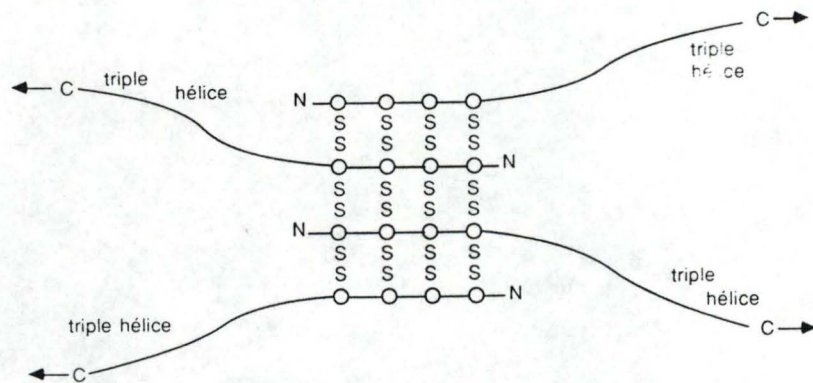


fig.17 : association de quatre molécules de collagène IV par leurs extrémités 7S, réalisant un aspect en araignée : le "collagène 7S" (Borel, 1987)

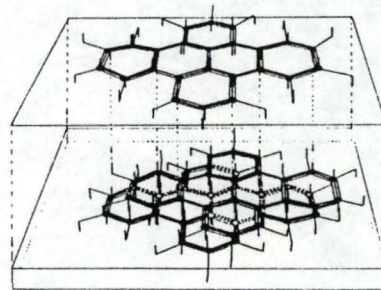


fig.18 : modèle du réseau de collagène IV : le modèle polygonal les molécules s'associent par leurs régions terminales et latérales (Timpl, 1984))

a) Composants collagéniques

1) Collagène de type IV

La molécule de collagène IV d'un poids moléculaire (PM) de 550 000 d, résulte de l'association de trois chaînes polypeptidiques auxquelles sont associés des glucides.

Il existerait deux types de chaînes à différentes (α_1 et α_2) de sorte que la molécule de collagène IV est probablement un hétérotrimère de composition $[\alpha_1(\text{IV})]_2 \alpha_2(\text{IV})$ bien que l'existence d'un homotrimère composé de trois chaînes identiques ne doit pas être exclue (Timpl, 1984).

La molécule de collagène IV se présente comme une baguette flexible, dans laquelle les chaînes polypeptidiques sont associées en deux domaines de triple hélice (triple hélice 7S et triple hélice majeure) séparés par un segment non collagénique¹ appelé NC₂. Les extrémités de la molécule sont constituées d'une part par la triple hélice 7S et d'autre part par une région globulaire également non collagénique NC₁ (fig.15) (Timpl, 1984).

Le collagène IV se disposerait en réseau dans la JED. Deux modèles ont été avancés pour expliquer son arrangement (Laurie, 1986) :

a) association extrémité à extrémité (open network model) : les molécules de collagène forment des dimères avec leur extrémité NC₁ et des tétramères avec leur extrémité 7S (l'association de quatre molécules en ce tétramère est connu sous l'appellation "collagène 7S") (fig.16 et fig.17)

b) modèle polygonal : les molécules de collagène s'associent par leurs extrémités et par leurs régions latérales (fig.18)

2) Collagène de type VII

Glycoprotéine d'un PM de 510 000 d (Uitto, 1989), ce collagène est formé d'un homotrimère de trois chaînes

¹ un segment non collagénique dans la molécule de collagène est un segment qui ne présente pas la séquence répétitive en acides aminés GLY-X-Y caractéristique des collagènes

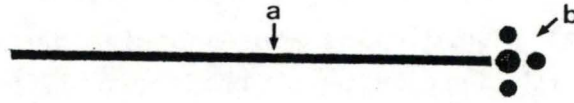


fig.19 : schéma de la molécule de collagène VII
 (a) triple hélice
 (b) région globulaire
 (Burgeson, 1988)

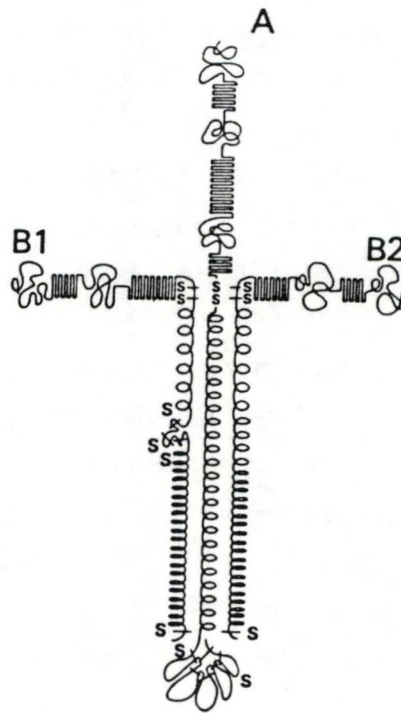


fig.20 : schéma de la molécule de laminine.
 La laminine est organisée en trois chaînes liées par des ponts disulfures (deux bras courts B1 et B2 et un bras long A). Ces chaînes ont un arrangement cruciforme avec des segments linéaires et globuleux (Sasaki, 1988)

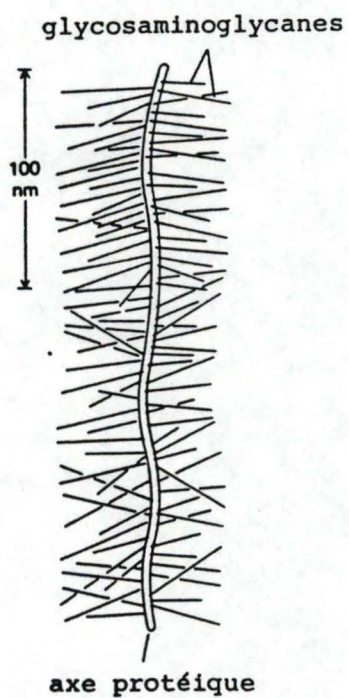


fig.21 : structure d'une molécule de protéoglycane
Elle est formée d'un axe protéique sur lequel des glycosaminoglycans sont liés de façon covalente (Alberts, 1989)

polypeptidiques α ($[\alpha(\text{VII})]_3$) en triple hélice. Cette molécule présente un domaine globulaire à une de ses extrémités (fig.19).

Les molécules de collagène VII s'associeraient en dimères antiparallèles (Burgeson, 1988).

b) Composants non collagéniques

1) Laminine

La laminine est une glycoprotéine d'un PM de 800 000 d. Elle est constituée de trois chaînes polypeptidiques liées par des ponts disulfures et arrangées en une structure cruciforme comprenant un bras long et trois bras courts (fig.20) (Sasaki, 1988). Différentes régions ont pu être définies sur cette molécule : par sa portion centrale (point de réunion des quatre bras), la laminine pourrait se lier avec la membrane cytoplasmique des kératinocytes tandis qu'au niveau des régions terminales des bras courts, elle se lierait au collagène (Claudy, 1987). Laurie (1986) montre que la laminine est aussi capable de se lier à l'héparane sulfate par l'intermédiaire de son bras long.

2) Protéoglycanes

Tout protéoglycane est formé d'un axe protéinique ("core") sur lequel se lient par liaison covalente une ou plusieurs chaînes de polysaccharides sulfatés. Ces polysaccharides appelés glycosaminoglycanes sont constitués d'une répétition de disaccharides, unités composées chacune d'une hexosamine sulfatée et d'un acide uronique (ou de galactose) (fig.21).

Sur base de l'hexosamine, les glycosaminoglycanes sont classifiés en galactosaminoglycanes et glucosaminoglycanes.

Les protéoglycanes majoritaires de la JED sont la chondroïtine sulfate (de type galactosaminoglycane) et l'héparane sulfate (de type glucosaminoglycane) (Höök, 1984).

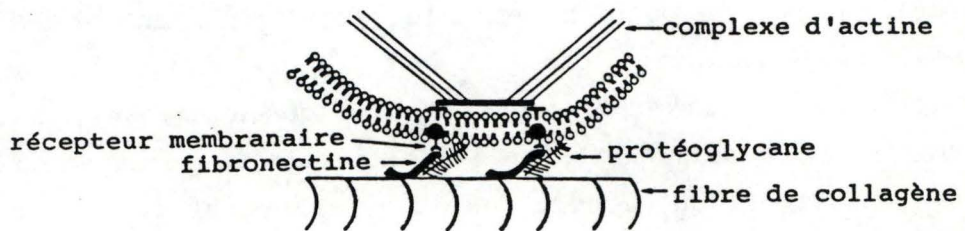


fig.22 : modèle d'un site d'adhésion cellulaire : la molécule de fibronectine contient une région qui reconnaît le collagène et une autre qui reconnaît la surface cellulaire (Kleinman, 1981)

3) Nidogène

C'est une glycoprotéine de PM 150 000 d présentant une affinité pour la laminine (Uitto, 1989).

4) Fibronectine

Cette glycoprotéine d'un PM de 440 000 d est formée de deux polypeptides non identiques porteurs de chaînes oligosaccharidiques qui s'associent par des ponts disulfures en une molécule en forme de V (Timpl, 1984).

La fibronectine existe sous deux formes : soluble et insoluble. Du fait de sa concentration élevée dans le plasma sanguin, certains auteurs ont été amenés à considérer que la fibronectine ne serait qu'un composant du plasma piégé dans la JED plutôt qu'un composant propre de la JED. En tous cas, composant transitoire ou non, de par sa grande potentialité à former des interactions entre le collagène et les surfaces cellulaires, la fibronectine apparaît comme un constituant essentiel de la JED (fig.22) (Katz, 1984).

5) "Antigènes divers"

a) Antigène de la pemphigoïde bulleuse (antigène PB)

Cette glycoprotéine de PM 220 000 d a été découverte par la mise en évidence dans le sérum de patients atteints de PB (maladie auto-immune se caractérisant par l'apparition de bulles cutanées dues à des séparations locales entre l'épiderme et le derme) d'anticorps dirigés contre cet antigène (Katz, 1984).

b) Antigène de l'épidermolyse bulleuse acquise (antigène EBA)

Mise en évidence par des anticorps provenant de sérum de patients atteints d'EBA (maladie auto-immune se caractérisant également par l'apparition de bulles cutanées), cet antigène ne serait en fait que le domaine carboxy terminal du collagène de type VII (Uitto, 1989).

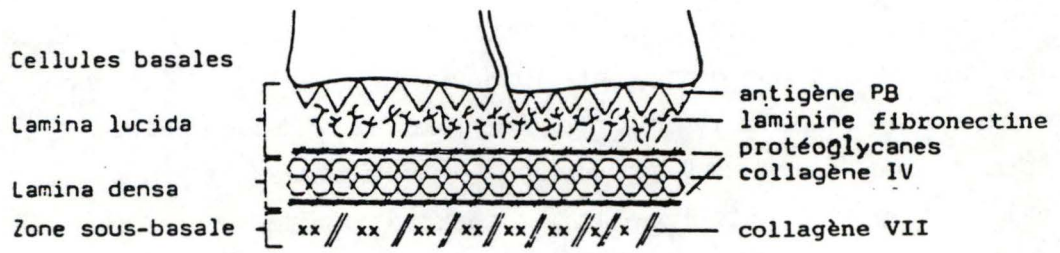


fig.23 : schéma reprenant la localisation des constituants de la jonction épidermo-dermique (d'après Claudy, 1987)

1.5.3.2. Localisation des constituants

La distribution précise des constituants décrits plus haut n'est pas encore complètement élucidée actuellement.

La fig. 23 illustre le schéma classiquement proposé (Courtoy, 1982; Claudy, 1987) :

- l'antigène de la PB au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes basaux
- la laminine dans la lamina lucida
- la fibronectine dans la lamina lucida
- le collagène IV dans la lamina densa
- les protéoglycanes bordant les deux côtés de la lamina densa
- le collagène VII constituant les fibrilles d'ancrage de la lamina subbasale

Si les positions des collagènes IV et VII ne semblent pas contestées, il ne va pas de même pour celle des autres constituants. Ainsi, Laurie (1982), décrit suite à des marquages immunocytochimiques, une localisation de la laminine, du collagène IV, de l'héparane sulfate et de la fibronectine dans la lamina densa. Il conclut à l'existence dans cette zone d'un complexe formé par les quatre composants. Si l'antigène de la PB est souvent associé aux membranes plasmiques des kératinocytes et plus particulièrement aux hémidesmosomes (Westgate, 1985), Woodley (1987) le situe lui dans la lamina lucida. Le nidogène toujours associé à la laminine, sa distribution reste incertaine (Uitto, 1989).

1.5.3.3. Origine cellulaire des constituants

L'origine des constituants de la JED, comme leur localisation est également très controversée, même si des cultures de kératinocytes et de fibroblastes ont permis d'éclaircir certaines idées .

Ainsi, le collagène IV initialement considéré comme produit spécifique des kératinocytes, serait aussi synthétisé par les fibroblastes. Cette double origine a été également prouvée pour la laminine, la fibronectine et le collagène VII. Le lieu de

synthèse de l'antigène de la PB semble être spécifique des kératinocytes basaux. Celui du nidogène n'a pas encore été identifié (Uitto, 1989).

1.5.3.4. Durée de vie de la JED

Une fois constituée, la membrane basale est une structure très stable, le collagène IV a une demi-vie de plus de 100 jours et la laminine résiste pendant plusieurs mois. Certaines études ont montré qu'il faut une année pour obtenir un turn-over complet (Kefalides, 1979).

1.5.4. Rôles de la JED

La JED assure deux fonctions principales au sein de l'organe peau : un rôle de support actif et celui d'une barrière.

a) Rôle de support actif

La JED exerce avant tout un rôle de soutien assuré essentiellement par le réseau de collagène IV renforçant ainsi l'action du derme. Mais elle est bien plus qu'un simple support. Elle renforce l'adhésion de l'épiderme au derme grâce aux nombreuses interactions existantes entre les kératinocytes et ses différents composants (Timpl, 1984).

Le rôle de support se double d'un rôle d'une matrice informationnelle. En effet, la contribution de la JED dans la morphogenèse se manifeste d'une part lors de la restauration de l'intégralité épidermique après une blessure (la JED constitue alors le support de la migration kératinocytaire, étape fondamentale de la cicatrisation cutanée) et d'autre part dans l'organogenèse embryonnaire (rôle suggéré par la présence précoce des constituants de la JED lors du développement embryonnaire) (Madri, 1984).

b) Rôle de barrière

La JED limite le territoire épithélial du stroma conjonctif et empêche la plupart du temps tout mouvement cellulaire entre les deux tissus. Cette fonction de barrière ne s'exercerait pas

pour tous les types de cellules : ainsi des lymphocytes et des fibres nerveuses pourraient la traverser (Alberts, 1989).

Elle assure également une fonction de filtration. En formant des agrégats, les protéoglycanes constituent un véritable tamis qui, suivant le degré de polymérisation, empêcherait ou faciliterait les échanges. Leurs charges négatives empêcheraient d'autres molécules chargées négativement de passer (Timpl, 1984).

1.6. But du mémoire

Notre travail s'inscrit dans le contexte général de recherche du département à savoir la *connaissance fondamentale de l'organe peau*.

Il nous a ainsi été demandé de mettre au point des techniques de froid, techniques de *cryofixation par impact* et de *cryosubstitution* susceptibles d'améliorer nos connaissances tant morphologiques qu'immunocytochimiques de cet organe.

Nous nous limiterons, dans le cadre de ce mémoire, à déterminer l'influence de ces techniques sur la conservation de l'intégralité tant architecturale qu'antigénique de la *jonction épidermo-dermique* par des observations *ultrastructurales*.

Notre travail sera purement qualitatif : c'est en effet une toute nouvelle recherche qu'entreprend le département. Il devra servir de base pour la planification d'expériences ultérieures.

MATERIEL
ET
METHODES

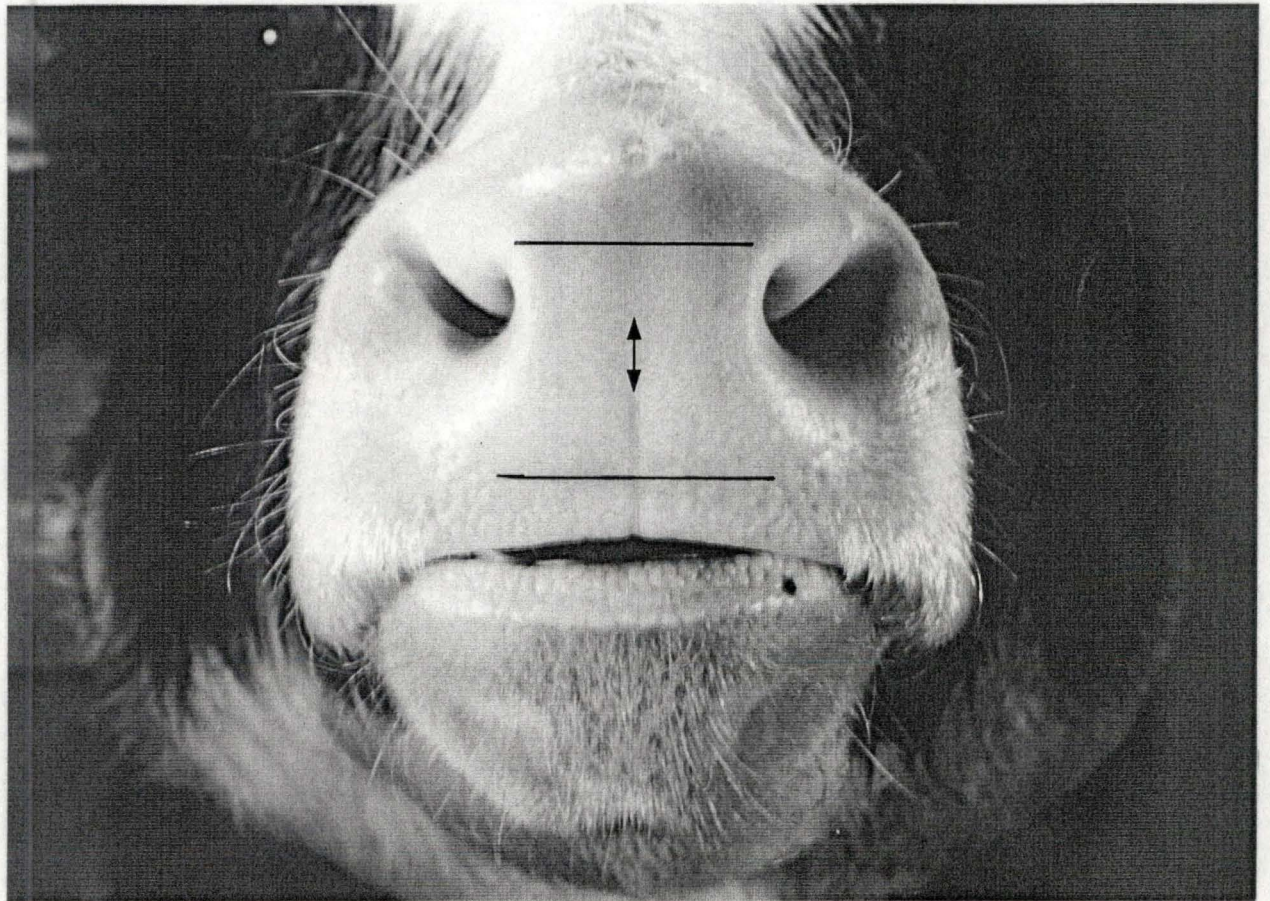


fig.24 : zone du rhinarium au niveau du mufle de Bovidés

Remarque : la composition des substances marquées d'un astérisque (*) est détaillée en annexe.

2.1. Matériel

Nous avons étudié la JED sur des prélèvements de plusieurs origines :

1) 10 biopsies cutanées d'origine humaine dont 5 fournies par le Service de Chirurgie de la Clinique Ste Elisabeth de Salzinnes (prélèvements de la région mammaire de femmes âgées de 31 à 56 ans).

Les 5 autres nous ont été fournies par le Service de Chirurgie Esthétique de la Clinique St Luc de Bouge (un prélèvement rétroauriculaire, quatre abdominaux, âge moyen de 40 ans)

2) 2 biopsies cutanées de rat : il s'agit de prélèvements de la région abdominale de rats mâles de race Wistar

3) 9 prélèvements cutanés de mufle de Bovidés. Ces prélèvements ont été faits au niveau du rhinarium de jeunes taureaux (fig.24) Ils nous ont été fournis par l'abattoir de Lodelinsart (Charleroi).

Tous les échantillons ont été transportés soit dans de l'eau physiologique soit directement dans de la glace et techniques dès leur arrivée au laboratoire.

2.2. Techniques classiques(TC)

2.2.1. Pour la microscopie optique.

Les biopsies cutanées ont été découpées en fragments d'environ 1 cm² de surface pour 2 à 3 mm d'épaisseur. Elles sont ensuite techniquées comme suit :

- fixation de 24 heures dans du liquide de Bouin Hollande Acétifié Sublimé (BHAS*) (t° ambiante)
- déshydratation par 3 bains successifs d' 1/2 heure dans du méthanol absolu (t° ambiante)

DEPARAFFINAGE	2 x 3 min toluol
RÉHYDRATATION	2 x 3 min méthanol absolu 3 min. méthanol 70%
BLANCHISSEMENT	10 min eau courante
1 ^{ier} COLORANT	5 min bleu Célestin (Merck) rincer à l'eau courante Hémalun (Merck) 12 min rincer à l'eau courante
DIFFÉRENCIATION	2 min dans HCl 4 % dans éthanol dénaturé 10 min eau courante
2 ^{ième} COLORANT	5 min de Ponceau-fuchsine (Edward Gurr)
DIFFÉRENCIATION	rincer 3 fois eau acétifiée à 1 % 2 min dans acide phosphotungstique 5 % dans eau
3 ^{ième} COLORANT	4 min Vert Lumière (National Aniline Division)
DIFFÉRENCIATION	rincer 3 fois ds eau acétifiée à 1 %
PRÉPARATION AU MONTAGE	3 bains d'alcool isopropylique absolu 1 bain de toluol
MONTAGE	montage au DPX (BDH Chemicals)

tableau 1 : coloration au trichrome vert de coupes enrobées en Surgipath

DEPARAFFINAGE	2 x 10 min toluol
RÉHYDRATATION	2 x 2 min méthanol absolu 2 min méthanol 70 % 5 min méthanol iodé à 1 %
BLANCHISSEMENT	10 secondes disulfite de sodium 5% dans l'eau
PRÉPARATION A L'ETCHING	3 min méthanol 50 % 2 min celloïdine (Fluka) 10 % dans un mélange éthanol-éther 1/1
ETCHING	2 heures pepsine (Sigma) à 0,4 % dans HCl 0,01N à t° ambiante rincage dans PBS* 30 min dans mélange éther-éthanol 1/1
RÉHYDRATATION	méthanol 70 % (un passage) méthanol 50 % (un passage) eau distillée (un passage)
RINÇAGE	PBS (un passage)
1 ^{ier} ANTICORPS 0	2 heures à 310K (37°C.)
RINÇAGE 0	2 x 5 min PBS
2 ^{ième} ANTICORPS 0	1 heure F.I.T.C. (dilution 1/15 dans PBS) 310K (37°C).
RINÇAGE 0	2 x 5 min PBS
MONTAGE 0	au glycérogel (Dakopatts)

tableau 2 : mode opératoire des marquages immunohistochimiques à la fluorescéine (TC)

- inclusion :
 - 3 x 1/2 heure dans du toluol (t° ambiante)
 - 2 x 1 heure dans du Surgipath (Labonord) à 333K (60 °C)
 - 1 nuit dans du Surgipath à 333 K (60 °C)
- polymérisation sur platine réfrigérante

Les coupes (épaisses de 6 µm) ont été soit colorées par la méthode du trichrome de Masson au vert lumière (trichrome vert) soit techniquées en vue d'un marquage immunohistochimique à la fluorescéine.

2.2.1.1. Coloration au trichrome vert

Le tableau 1 résume le protocole de cette coloration.

2.2.1.2. Marquage immunohistochimique à la fluorescéine

Anticorps (Ac) utilisés :

- anti-laminine (Organon) : Ac polyclonal de lapin (dilution 1/50 dans tampon PBS)
- anti-collagène IV (Organon) : Ac polyclonal de lapin (dilution 1/50 dans tampon PBS)
- anti-héparane sulfate (Chemicon) : Ac monoclonal de souris (dilution 1/50 dans du tampon PBS).

Nous avons réalisé les marquages selon une méthode indirecte : le complexe antigène-anticorps (Ag-Ac) est révélé par un couplage à un deuxième Ac lié à l'isothiocyanate de fluorescéine (F.I.T.C.).

Nous avons utilisé deux types de F.I.T.C.

- F.I.T.C. F205 (Prosan) : Ac polyclonal de cochon anti-lapin (utilisé pour la révélation des complexes Ag-Ac anti-laminine et anti-collagène IV)
- F.I.T.C. F313 (Prosan) : Ac polyclonal de lapin anti-souris (utilisé pour la révélation des complexes Ag-Ac anti-héparane sulfate).

Les marquages ont été effectués soit sur coupes de tissus fixés au BHAS et inclus en Surgipath soit directement sur coupes

	(1)	(2)	(3)	(4)
FIXATION	glutaraldéhyde 2,5% dans caco 2h30 à 277K (4°C.)	OsO ₄ 2,5% dans tampon caco 2h30 à 277K (4°C.)	glutaraldéhyde 2,5% et ruthenium red 0,05% dans tampon caco 2h30 à 277K (4°C.)	glutaraldéhyde 2,5% dans tampon caco 2h30 à 277K (4°C.)
RINÇAGE	3 X 10 min dans tampon caco à 277K (4 °c)			
POSTFIXATION	OsO ₄ 1% dans tampon caco 1 h à 277K (4°C)		OsO ₄ 1% et ruthenium red 0,05% dans tampon caco 3 h t° ambiante à l'obscurité	OsO ₄ 1% dans tampon caco 1h à 277K (4°C)
RINÇAGE	3 x 10 min dans tampon caco à 277K (4°C.)		3 x 10 min tampon caco à t° ambiante	3 x 10 min tampon caco à 277K (4°C.)
POSTFIXATION				ac. tannique 1% dans caco 1 h à t° ambiante
RINÇAGE				3 x 10 min ds tampon caco à t° ambiante
DESHYDRATA- TION	à 277K (4°C.) 2 x 10 min éthanol 25% 2 x 10 min éthanol 50% 2 x 10 min éthanol 70% 2 x 10 min éthanol 94% t° ambiante 3 x 20 min éthanol 100%		t° ambiante 2 x 10 min éthanol 25% 2 x 10 min éthanol 50% 2 x 10 min éthanol 70% 2 x 10 min éthanol 94% 3 x 20 min éthanol 100%	
PREINFILTRA- TION	3 x 10 min oxyde de propylène (Fluka), t° ambiante 1 nuit oxyde de propylène/Epon 812 (2/3v-1/3v) 12 heures oxyde de propylène/Epon 812 (1v-1v) 1 nuit oxyde de propylène/Epon 812 (1/3v-2/3v)			
INFILTRATION	2 x 1 heure Epon 812 dans rotor à 310K (37°C.)			
INCLUSION ET POLYMERISA- TION	dans des moules plats ("flat") (Balzers) 1 jour 310K (37°C.) 1 jour 318K (45°C.) 2 jours 333K (60°C.)			

Tableau 3 : modes opératoires des étapes histologiques en vue d'une observation morphologique au MET (TC)

à congélation (coupées au cryostat Reichert).

Le tableau 2 résume le mode opératoire. Les coupes à congélation n'ont subi que les étapes marquées d'un 0.

Pour chaque marquage un contrôle a été fait en omettant le 1^{ier} anticorps et en le remplaçant soit par du tampon PBS soit par du sérum normal de la même espèce que le deuxième anticorps (sérum de cochon ou de lapin normal, dilué à 1/20 dans du tampon PBS). Ce contrôle vérifie l'absence de liaisons non spécifiques entre le 2^{ième} anticorps et les composants tissulaires.

2.2.2. Pour la microscopie électronique.

Nous avons découpé les biopsies en blocs de 1 mm³ et les avons ensuite techniquées soit en vue d'une observation morphologique soit en vue d'un contrôle immunocytochimique.

2.2.2.1. En vue d'une observation morphologique

Le tableau 3 reprend les étapes successives du mode opératoire. Quatre fixations ont été réalisées :

- (1) fixation par le glutaraldéhyde (Fluka) et postfixation par le tétroxyde d'osmium OsO₄ (Johnson Matthey Chemicals Limited)
- (2) fixation par l'OsO₄ seul
- (3) fixation par le glutaraldéhyde additionné de rouge de ruthénium (Sigma) suivie d'une postfixation à l'OsO₄ additionné de rouge de ruthénium
- (4) fixation par le glutaraldéhyde suivie de deux postfixations l'une à l'OsO₄, l'autre à l'acide tannique (Mallinckrodt)

Les fixateurs ont été préparés dans du tampon "caco" : cacodylate de sodium-HCl (Merck), 0,1 M, ph 7,4 et CaCl₂ 0,1 %.

Les coupes semi-fines (2µm d'épaisseur) ont été colorées au bleu de toluidine (Merck). Les coupes ultra-fines (40nm) recueillies sur grilles de cuivre recouvertes de formvar, ont été contrastées à l'acétate d'uranyle (2% dans l'eau ; 20 min) puis

FIXATION	Paraformaldéhyde 4 % dans tampon caco 2h à 277K (4°C)	
RINÇAGE	3 X 10 min dans tampon caco à 277K (4°C)	
DESHYDRATATION	2 x 15 min méthanol 30% à 277K (4°C) 2 x 15 min méthanol 50% à 277K (4°C) 2 x 15 min méthanol 70% à 253K (-20°C) 2 x 15 min méthanol 90% à 253K (-20°C)	
PREINFILTRATION	2 x 30 min à 253K (-20°C) dans méthanol 90%/LR Gold (1v-1v) 2 x 30 min à 253K (-20°C) dans méthanol 90%/LR Gold (1/3v-2/3v)	2 x 30 min à 253K (-20°C) dans méthanol 90%/K4M (1v-1v) 2 x 30 min à 253K (-20°C) dans méthanol 90%/K4M (1/3v-2/3v)
INFILTRATION	1 nuit LR Gold + benzoïn méthyl éther (0,5%) (Poly-science, Inc.) à 253K (-20°C)	1 nuit K4M à 253K (-20°C)
INCLUSION ET POLYMERISATION	dans LR Gold + benzoïn méthyl éther (0,5 %) 24 h sous U.V. à 253K (-20°C) 3 jours sous U.V. t° ambiante	dans K4M 24 h sous U.V. à 253K (-20°C) 3 jours sous U.V. à t° ambiante

tableau 4 : protocole opératoire des biopsies destinées à un marquage immunocytochimique (TC)

SATURATION	sérum de mouton normal 10 % dans tampon Tris 20mM, ovalbumine (Sigma) 0,1%, NaCl 20 mM, NaNO ₃ 0,01% pH 8,2, 15 min.
1 ^{ier} ANTICORPS	dilué dans le même milieu que celui de la saturation 1 heure à t° ambiante
RINÇAGE	tampon Tris ,ovalbumine 0,1 %, 12 x 1 min. (sur goutte)
RESATURATION	dans le même tampon que pour la 1 ^{ière} saturation, 5 min.
2 ^{ième} ANTICORPS (Janssen)	1/10 dans tampon de saturation 1 heure, t° ambiante
RINÇAGE	dans tampon Tris ovalbumine 0,1 % (par jet)
POSTFIXATION	glutaraldéhyde 1 % dans TRIS, 10 min. t° ambiante
RINÇAGE	tampon Tris (par jet)
RINÇAGE	eau distillée (par jet)

tableau 5 : protocole d'un marquage immunocytochimique après inclusion en résine acrylique (TC)

au citrate de plomb (solution de Reynolds ; 5 min).

2.2.2.2. En vue d'un marquage immunocytochimique

Le tableau 4 résume les étapes préparatoires subies par les échantillons destinés à ce traitement.

Deux résines différentes ont été testées : d'une part le LR Gold (London Resin Company) et d'autre part le K4M (Chemische Werke Lowi). Il s'agit de deux résines acryliques dont la polymérisation a été réalisée par rayons UV dans l'appareil FSU 010 de Balzers.

Les coupes ultra-fines recueillies sur grilles de nickel couvertes de formvar ont ensuite subi un marquage immunocytochimique résumé dans le tableau 5.

Nous n'avons dans le cadre de ce mémoire utilisé que l'anti-laminine précédemment cité. Le marquage a été réalisé par méthode indirecte : le complexe Ag-Ac a été révélé par un second anticorps (polyclonal chèvre anti-lapin) couplé à de l'or colloïdal (particules d'or de 15 nm de diamètre) (Janssen).

Comme pour les marquages en microscopie optique, les témoins ont été établis en remplaçant le premier anticorps par du sérum de chèvre normal.

Différents tests ont été réalisés :

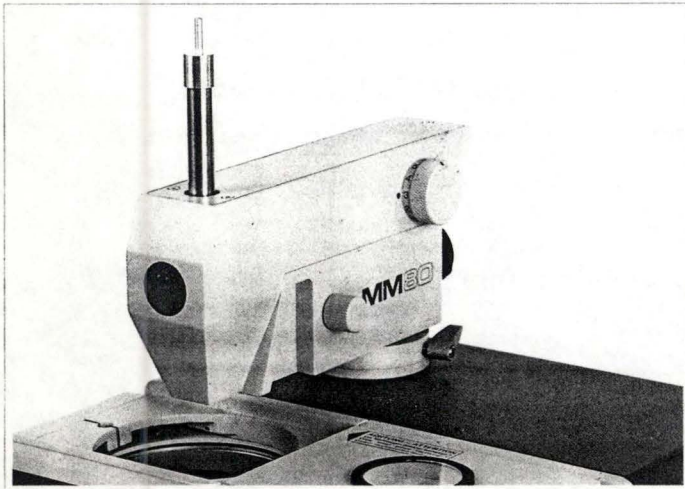
- 1) recherche de la bonne dilution de l'anticorps primaire
Nous avons testé les dilutions de 1/10 , 1/20 , 1/50 de l'anti-laminine dans le tampon de saturation
- 2) essais de renforcement du marquage
 - par "etching" : les coupes ont été préalablement attaquées pendant 30 min à t° ambiante soit
 - par de la pepsine (0,4 % dans du TRIS-HCl 0,01 N)
 - par de l'HCl 0,01 N
 - par de l'HCl 0,1 N

Après l'attaque, les coupes ont été rincées à l'eau distillée puis ont été traitées selon le protocole du tableau 5

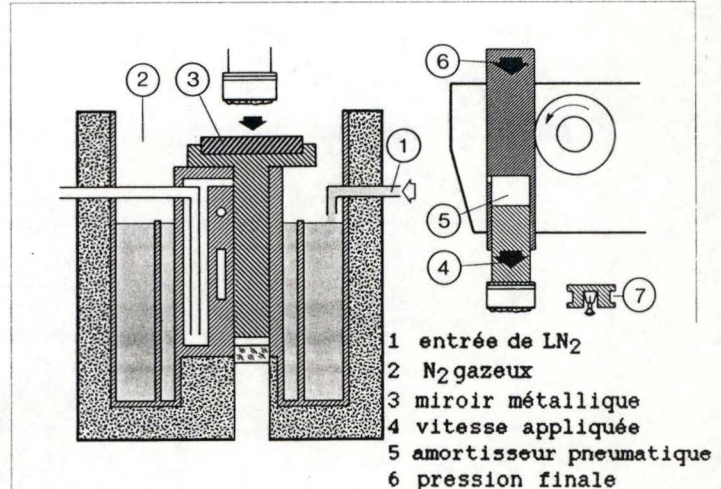
- par marquage à chaud : les anticorps anti-laminine sont mis en contact avec les coupes pendant 2 heures à 310 K (37 °C)

TISSUS NON TRAITES	TISSUS CRYOPROTEGES	TISSUS CRYOPROTEGES
	glycérol 25 % ds tampon caco, 30 min. t° ambiante	glutaraldéhyde 2,5 % dans tampon caco 277K (4°C.) 30 min
		rincer 2 x 5 min. dans tampon caco
		glycérol 25 % dans tampon caco, 30 min. t° ambiante
Cryofixation au KF80	Cryofixation au KF80	Cryofixation au KF80

tableau 6 : traitement des échantillons destinés à la cryofixation



MM 80 Metal Mirror System



MM 80 function schematic / specimen holders

fig.25 : appareil de cryofixation (KF 80 muni d'un système MM 80, système à cryofixation par impact sur surface froide)

- au lieu d'1 heure à t° ambiante
- par marquage à froid : les Ac anti-laminine sont mis en contact avec les coupes pendant une nuit à 277K (4°C).

Après marquage les ultra-fines ont été contrastées à l'acétate d'uranyle (4% dans de l'eau, 10 min) et au citrate de plomb (solution de Reynolds, 1 min).

2.3. Techniques de cryofixation et de cryosubstitution.

2.3.1. Technique de cryofixation (CF)

Les biopsies destinées à la cryofixation ont été découpées au coupe-cors en lamelles de 0,5 mm d'épaisseur. Chaque lamelle a été resectionnée au scalpel en parallélépipèdes rectangles d'environ 1 mm de large et 3 mm de long.

Les échantillons ainsi obtenus ont été ensuite cryofixés individuellement soit directement (état frais) soit après avoir été traités par un cryoprotecteur (glycérol) selon le protocole du tableau 6.

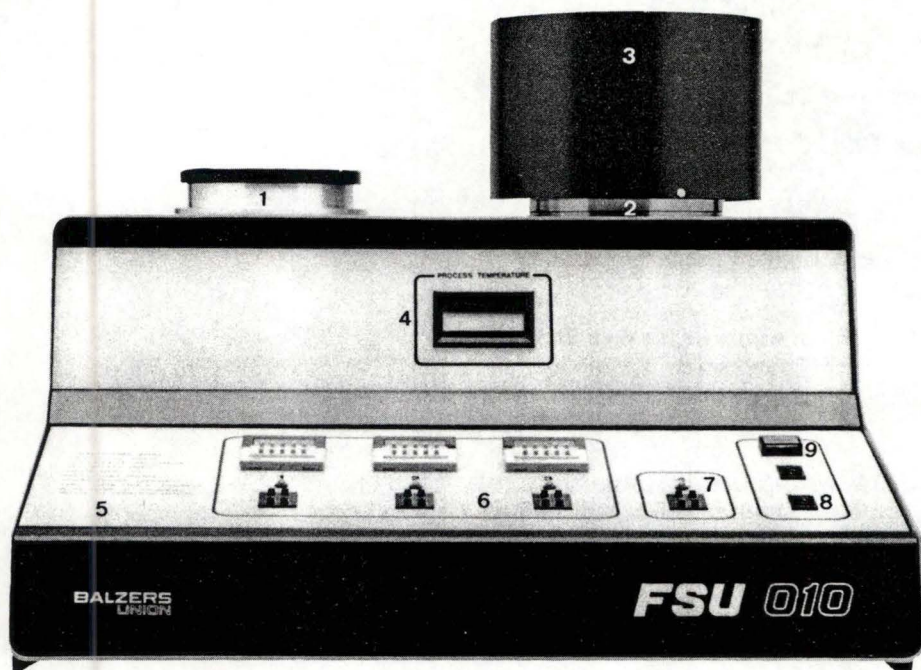
La cryofixation a été réalisée à l'aide de l'appareil KF80 muni d'un système MM80, système conçu pour des cryofixations par impact sur surface métallique (Reichert-Jung) (fig.25).

Dans ce but, chaque prélèvement a été collé sur un porte-échantillon à l'aide d'un morceau ($\pm 1 \text{ cm}^2$) de papier collant double face. Le porte-échantillon est lui-même constitué d'une rondelle de mousse de texture particulière (très molle) adhérant à un support métallique et est fixé par attraction magnétique (échantillon dirigé vers le bas) au piston de l'unité MM80.

Le piston garni de son porte-échantillon est alors précipité sur une plaque ("miroir") métallique de cuivre refroidie à 77K (-196°C.) par de l'azote liquide.

Nous avons testé plusieurs paramètres.

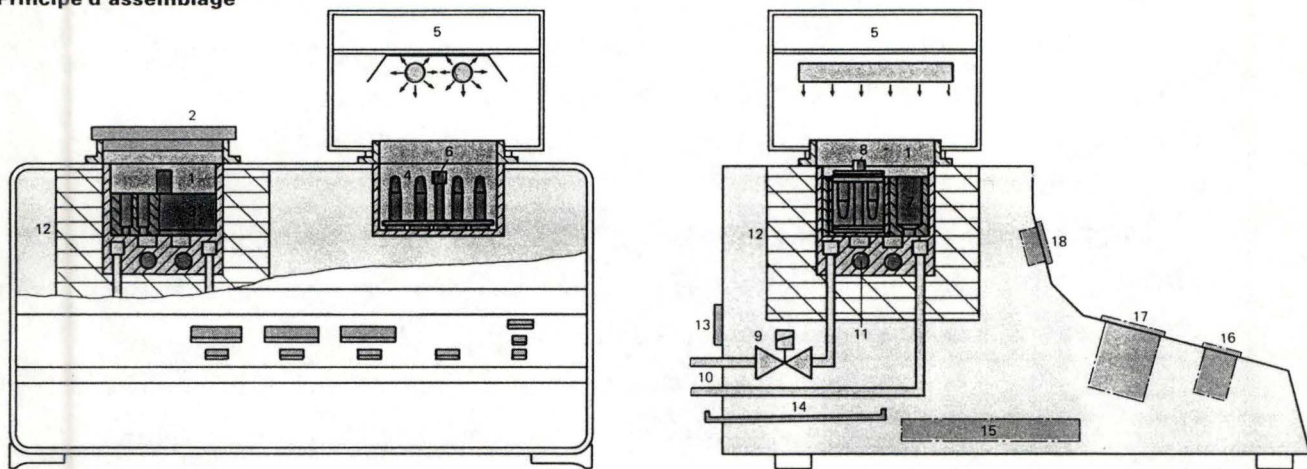
- a) la vitesse du piston (réglable de 1 à 11)
 - V 1 correspondant à 1,5 m/s
 - V 10 correspondant à 2,5 m/s
- b) la force exercée sur l'échantillon (réglable de 1 à 11)
 - P 1 correspondant à 400 gr



Vue frontale de l'appareil

- 1 Enceinte de préparation à basse température
- 2 Enceinte de préparation à température ambiante
- 3 Coffret de polymérisation UV (accessoire)
- 4 Panneau de contrôle avec affichage de la température de travail
- 5 Impression des instructions d'emploi
- 6 Présélection de températures
- 7 Commutateur présélection de la température
- 8 Lampe-témoin du stade du procédé
- 9 Interrupteur principal

Principe d'assemblage



Cryosubstitution

- 1 Enceinte de préparation à température basse
- 2 Couvercle de protection contre la contamination
- 3 Support de cryosubstitution

Polymérisation finale aux UV

- 4 Enceinte de préparation à température ambiante
- 5 Coffret de polymérisation UV (accessoire)
- 6 Support de polymérisation UV finale (accessoire)

Enrobage à basse température - Polymérisation UV

- 7 Support combiné (accessoire)
- 8 Dispositif de polymérisation UV à basse température (accessoire)
- 9 Vanne d'azote liquide
- 10 Raccords d'entrée et de sortie d'azote liquide
- 11 Chauffage
- 12 Isolation
- 13 Prises électriques pour le secteur et pour le câble de la lampe UV de polymérisation
- 14 Récipient d'eau de condensation
- 15 Commande électronique
- 16 Présélection de la température
- 17 Présélection du temps
- 18 Affichage de la température de travail

fig.26 : appareil de cryosubstitution (FSU 010 de Balzers)

P 6 correspondant à 800 gr

P 11 correspondant à 1100 gr

Nous avons maintenu constant le 3^{ième} paramètre modifiable sur cet appareil à savoir le temps d'application de la pression finale sur l'échantillon (réglage conseillé par la firme sur le position 2)

Les échantillons cryofixés sont alors dans l'enceinte de l'appareil c'est-à-dire à ± 77 K (-196°C), détachés de leur support à l'aide d'un scalpel refroidi et transférés toujours à basse t° dans un Eppendorf contenant 1,5 ml de milieu de substitution préalablement refroidi.

2.3.2. Technique de cryosubstitution (CS)

La cryosubstitution a été réalisée grâce à l'appareil FSU 010 de Balzers (fig.26).

Cet appareil peut garantir à la fois une t° de 174 K (-99°C .) grâce à un refroidissement par l'azote liquide et un réchauffement par paliers. Il possède également une chambre à U.V. permettant de polymériser des résines acryliques.

Les échantillons cryofixés ont été cryosubstitués différemment selon qu'il étaient destinés à un examen morphologique ou à un marquage immunocytochimique.

2.3.2.1. Echantillons destinés à un examen morphologique

Nous avons testé plusieurs paramètres, d'une part différents milieux de substitution et d'autre part les deux protocoles de CS cités dans la littérature.

a) Milieux de substitution

- OsO_4 2,5 % dans de l'acétone avec piège moléculaire
deux billes par Eppendorf de 1,5 ml (Molekularsieb, 0,4 nm de Merck)
- OsO_4 2,5 % dans de l'acétone (sans piège moléculaire)
- OsO_4 2,5 % dans du méthanol
- OsO_4 2,5 % et acétate d'uranyle 0,5 % dans du méthanol

MODELE DE VAN HARREVELD	MODELE DE MÜLLER
3 jours à 183 K (-90°C.)	8 heures à 183K (-90°C.) 8 heures à 213K (-60°C.) 8 heures à 243K (-30°C.)
remontée de 10°/heure jusqu'à 243K (-30 °C)	remontée de 10°/heure jusqu'à 273 K (0°C.)
2 heures à 243K (-30°C.)	
remontée de la t° jusqu'à 273K (0°C)	
lavage de 2 X 10 min. dans l'acétone pure ou méthanol pur (selon le milieu de substitution utilisé)	
infiltration et inclusion classique à l'Epon 812	

tableau 7 : protocoles des cryosubstitutions

	LR GOLD	K4M
PRÉINFILTRATION	2 x 30 min à 253K (-20°C) dans méthanol/LR Gold (1v-1v) 2 x 30 min à 253K (-20°C) dans méthanol/LR Gold (1/3v-2/3v)	2 x 30 min à 243K (-30°C) dans méthanol/K4M (1v-1v)) 2 x 30 min à 243K (-30°C) dans méthanol/K4M (1/3v-2/3v)
INFILTRATION	1 nuit LR Gold + benzoïn méthyl éther (0,5%) (Poly- sciences, Inc.) à 253K (-20°C)	1 nuit K4M à 243K (-30°C)
INCLUSION ET POLYMERISATION	dans LR Gold + benzoïn méthyl éther (0,5 %) 24 h sous U.V. à 253K (-20°C) 3 jours sous U.V. t° ambiante	dans K4M 24 h sous U.V. à 243K (-30°C) 3 jours sous U.V. à t° ambiante

tableau 7' : protocole de l'infiltration et de la polymérisation pour les échantillons cryofixés et cryosubstitués

- OsO₄ 1 %, acétate d'uranyle 0,5 % et glutaraldéhyde 3 % dans du méthanol ("complexe de Müller")

Préparation du "complexe de Müller" : une solution A est préparée à partir de 9 ml de glutaraldéhyde (à 50% en solution aqueuse) et 60 ml de méthanol. Ce mélange est alors refroidi à 220 K (-53 °C). Ensuite on y rajoute 3 ml d'une solution d'acétate d'uranyle 20 % dans du méthanol. Une solution B est préparée en dissolvant 1,5 g d'OsO₄ dans 75 ml de méthanol. Cette solution B est également refroidie à environ 220 K (-53 °C). Les solutions A et B sont alors mélangées ensemble. Cette solution finale n'est stable que pour quelques heures même à 240 K (-33 °C) (Steinbrecht, 1987)

b) Les protocoles de cryosubstitution

Le tableau 7 résume les étapes suivies lors de chacun des deux protocoles testés.

Les coupes ultra-fines obtenues ont été recueillies et contrastées de la même manière qu'en microscopie classique (§ 2.2.2.1.)

2.3.2.2. Echantillons destinés à un marquage immunocytochimique

Les échantillons cryofixés (à l'état frais ou cryoprotégé, cfr. tableau 6) ont tous été cryosubstitués dans du méthanol pur. Le mode opératoire suivi a été celui de Müller adapté aux résines employées (K4M, LR Gold) :

K4M 8 heures à 183 K (-90 °C)

8 heures à 213 K (-60 °C)

8 heures à 243 K (-30 °C)

infiltration et polymérisation cfr. tableau 7'

LR Gold 8 heures à 183 K (-90 °C)

8 heures à 213 K (-60 °C)

8 heures à 243 K (-30 °C)

remontée de la t° à 253 K (-20 °C) en 1 heure

infiltration et polymérisation cfr. tableau 7'

Nous avons marqué et contrasté les coupes ultra-fines suivant

le même protocole qu'en microscopie classique (§ 2.2.2.2.).

2.4. Observation des coupes

Les coupes pour la microscopie optique ainsi que les semi-fines ont été observées et photographiées au photomicroscope Zeiss nr.3, les coupes à fluorescence sur le photomicroscope Zeiss nr. 1 (équipé d'un système à épifluorescence Zeiss II RS muni d'un filtre et d'un miroir dichroïque, adaptés à la fluorescéine), les ultra-fines aux microscopes électroniques Phillips EM 301 ou EM 201 sous 60 kV.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

3.1. Choix du matériel

Ainsi que nous l'avons déjà signalé précédemment, nous nous sommes limités dans le cadre de ce mémoire à étudier la JED qui constitue au sein de l'organe peau une véritable unité fonctionnelle anatomique mais dont la structure exacte (morphologique et biochimique) n'est pas encore complètement élucidée à l'heure actuelle (cfr. § 1.5.2.2.)

3.1.1. Peau humaine

Le département travaillant sur de la peau humaine, nous avons commencé par techniquer de tels échantillons. Si nous n'avons pas rencontré de problèmes majeurs lors du traitement classique (figures non représentées) ce ne fut pas le cas pour les techniques à froid. Très vite nous avons dû rechercher des peaux d'origine différente car nous nous sommes heurtés à de nombreuses difficultés en travaillant avec du matériel humain :

a) Irrégularité de l'approvisionnement

Nous avons pu disposer de deux "sources d'approvisionnement" de biopsies cutanées (cliniques Ste Elisabeth et St Luc). Malgré cela nous n'avons pas pu réaliser les différents tests prévus : les biopsies nous étaient souvent fournies à l'improviste (donc pas d'expériences programmables) et le laps de temps entre le prélèvement et l'arrivée au laboratoire était souvent trop long.

b) Origine hétérogène du matériel obtenu

Les biopsies fournies provenaient de prélèvements de régions corporelles différentes (région mammaire, région abdominale, ...). Ce problème cependant peut être considéré comme mineur puisqu'il est généralement admis dans la littérature (Montagna, 1979) que seules les peaux des faces palmaires et plantaires diffèrent considérablement des autres de par leur épaisseur.

c) Obtention difficile d'une JED correctement cryofixée

Ainsi que nous l'avons signalé dans "matériel et méthodes", les biopsies ont été débitées en parallélépipèdes rectangles que

- fig.27 :** A : lamelle de peau à obtenir idéalement lors de la découpe de la biopsie cutanée
d : derme
e : épiderme
z : zone dans la limite d'une cryofixation correcte
- B : lamelle de peau réellement obtenue lors de la découpe de la biopsie cutanée
- C : échantillon cryofixé contre le miroir de cuivre. L'épiderme s'est rabattu sur le derme (flèches) (Gross.: 50x)
- D : détail de 27C, côté bord d'impact. L'impact sur la plaque de cuivre conduit à une déchirure entre le derme et l'épiderme (flèche) (Gross.: 530x)
- E : détail de 27D. Zone de JED montrant des compartiments de ségrégation (flèche) (Gross.: 15 600x)

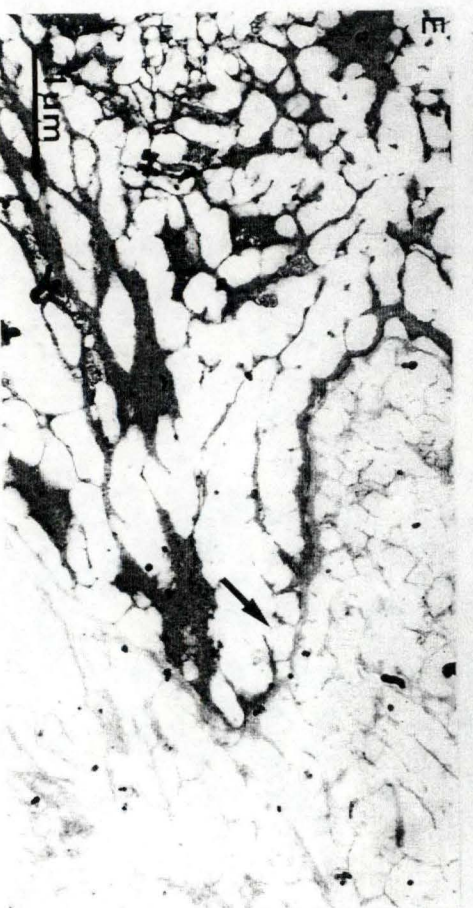
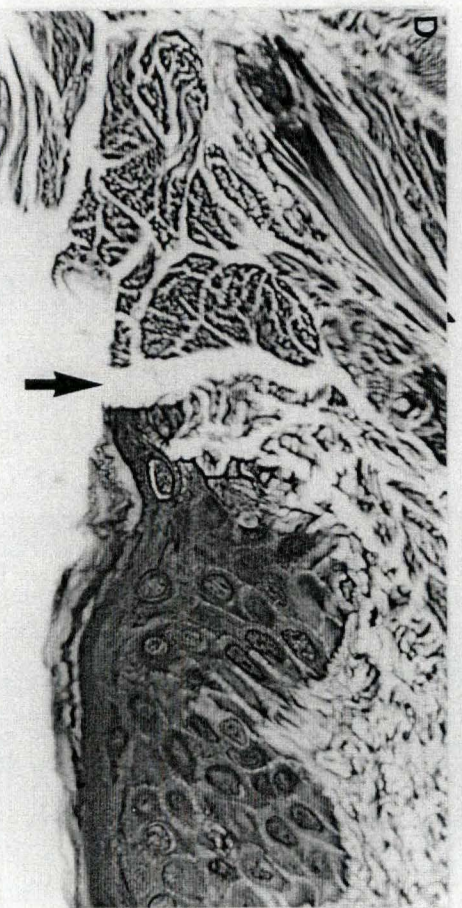
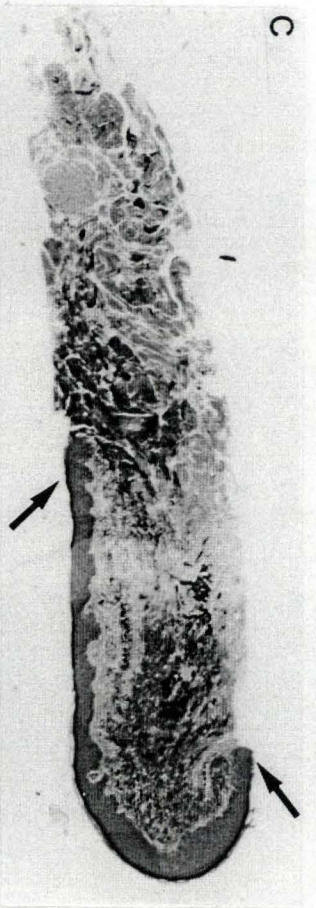
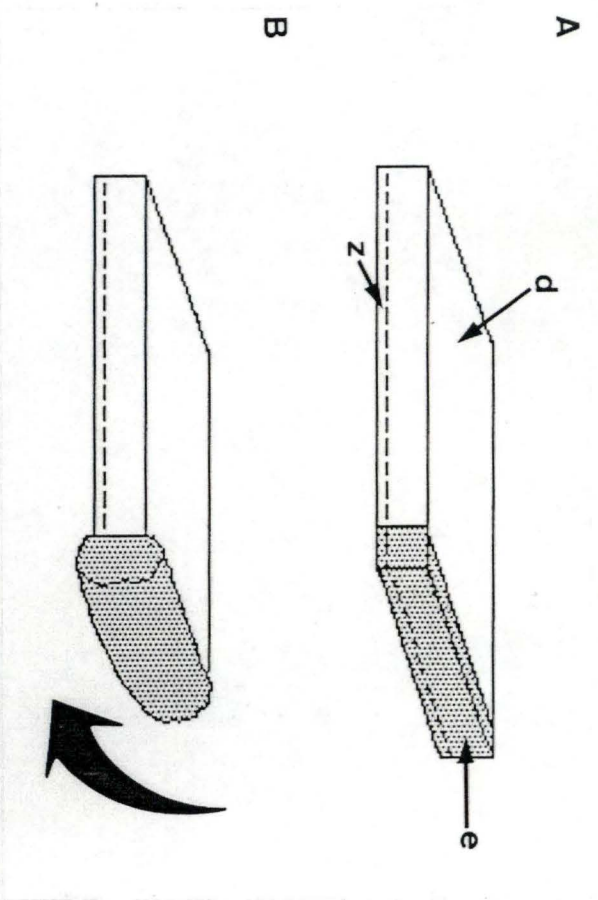


fig.28 : comparaison histologique de peaux d'origine
différente

A : peau humaine (région abdominale) (Gross.: 130x)

B : peau de rat (région abdominale) (Gross.:330x)

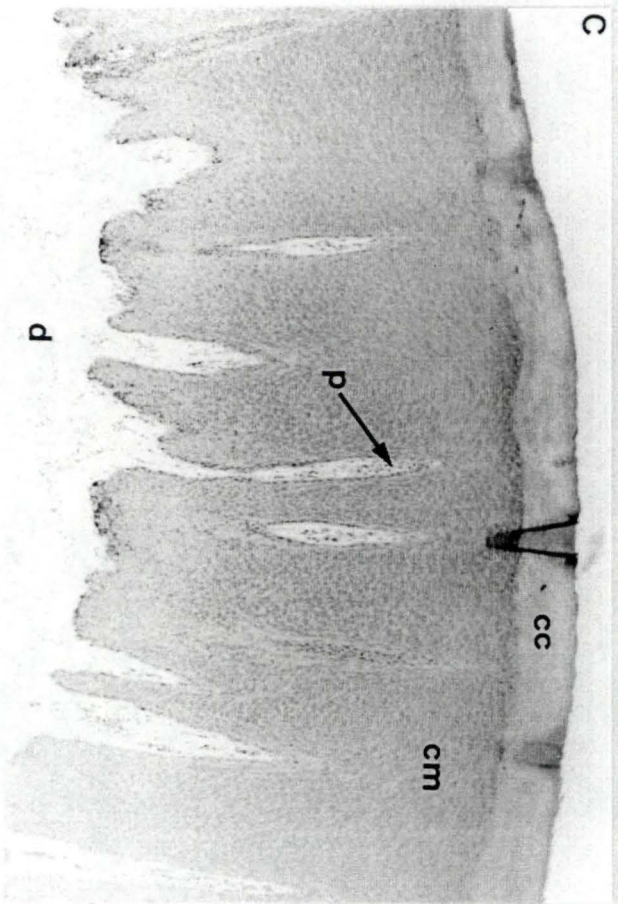
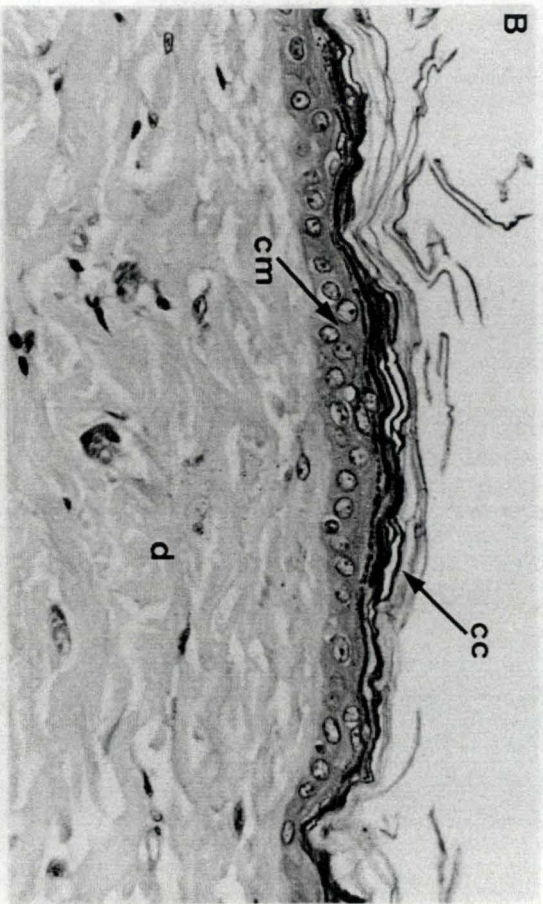
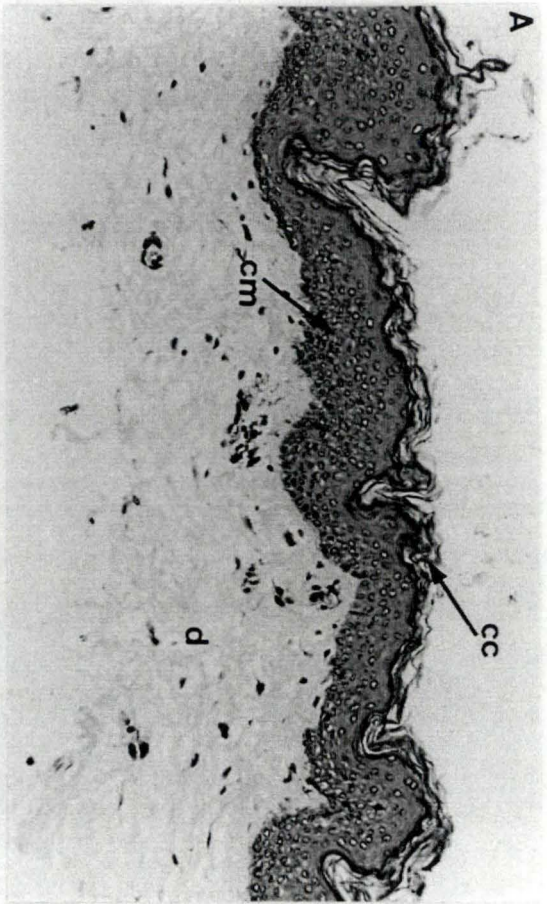
C : peau de Bovidés (rhinarium) (Gross.:50x)

cc : couche cornée

cm : couche de Malpighi

d : derme

p : papille dermique



nous avons essayé de cryofixer à plat, de façon à obtenir une couche correctement fixée de toute la hauteur de l'organe peau (derme, JED, épiderme, fig.27A).

Malgré de nombreux essais (coupes aux scalpel, lame Schick, macrotome,...) nous n'avons jamais pu obtenir de parfaits parallélépipèdes rectangles, semblables à celui de la fig.27A. En effet la peau est un organe très hétérogène car constitué de tissus de texture et dureté différentes (épiderme très dure, derme mou). Les lamelles que nous avons obtenues ont toujours présenté une couche épidermique plus épaisse que la couche dermique (fig.27B). Aussi, lors de l'aplatissement de l'échantillon sur le miroir de cryofixation, l'épiderme (plus important en surface) se rabattait sur le derme (fig.27C flèches). De plus, la différence de densité entre le derme et l'épiderme à chaque fois conduit à une déchirure entre les deux tissus (fig.27D flèche), de sorte que la JED s'est toujours trouvée séparée du miroir d'impact par une épaisseur trop importante que pour être fixée correctement (épaisseur de toute la hauteur de l'épiderme). Elle présentait dès lors les artéfacts typiques de congélation : des compartiments de ségrégations (fig.27E, flèche).

3.1.2. Peau de rat

Pour résoudre les problèmes approvisionnement et permettre une meilleure programmation des expériences, nous avons alors pensé à la peau de rat. Nous avons cependant dû très vite abandonner ce modèle car outre le fait d'avoir une texture assez comparable à la peau humaine (fig.28A et 28B) et donc de poser les mêmes problèmes de découpe et de cryofixation, la peau de rat est abondamment fournie en poils qui gênent lors de la cryofixation.

3.1.3. Peau de veau

Notre choix s'est ensuite porté sur la peau de Bovidés. Celle-ci présente une organisation particulière au niveau du rhinarium (fig.24), zone du museau comprise entre les deux narines et dépourvue de poils.

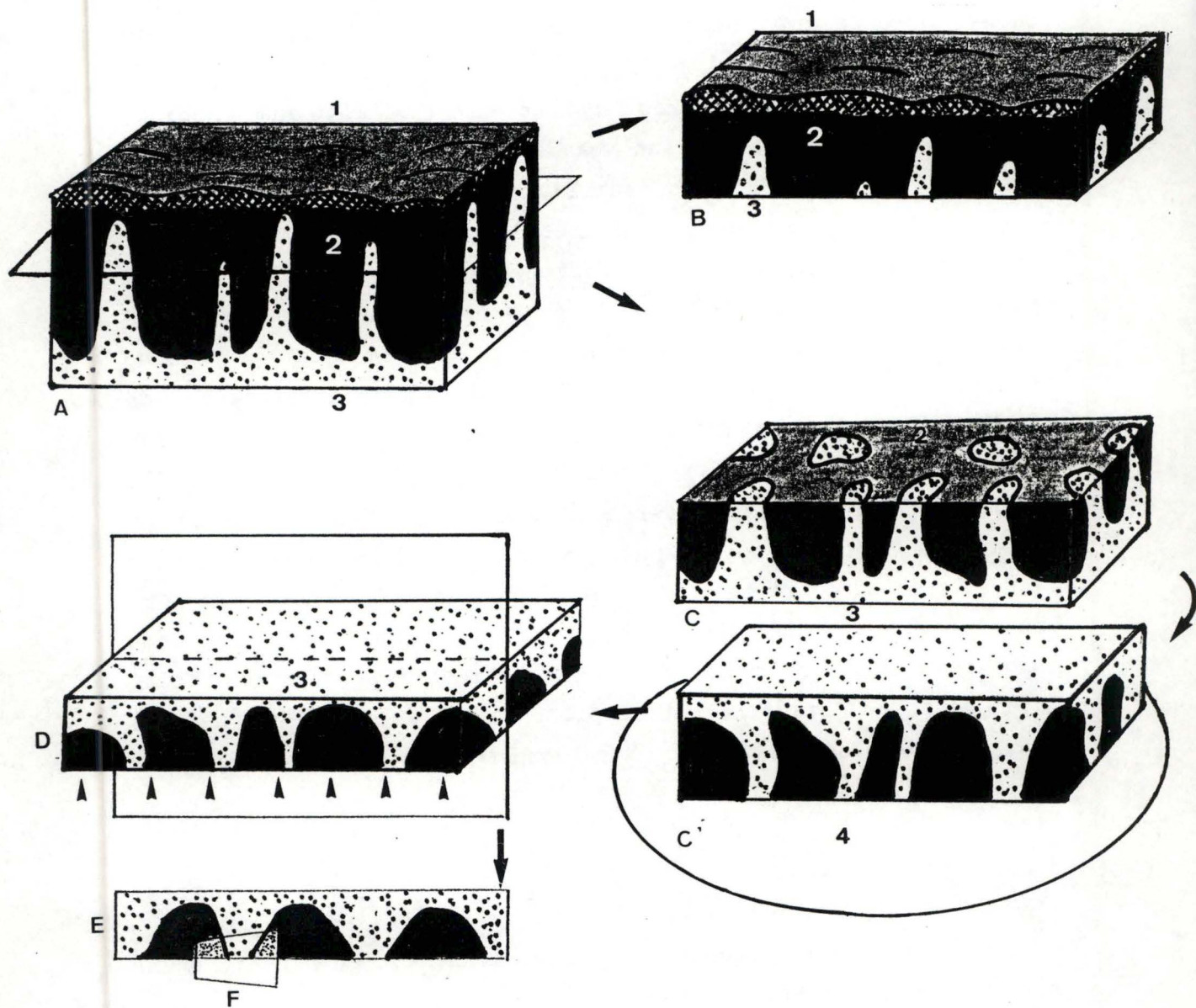


fig.29 : preparation des échantillons de peau de Bovidés

- A : prélèvement total
- B : tranche supérieure réalisée au coupe-cors
- C : tranche inférieure réalisée au coupe-cors
- C' : tranche inférieure retournée contre le miroir de cuivre
- D : tranche congelée
- E : coupe semi-fine
- F : coupe ultra-fine

- 1 : couche cornée
- 2 : couche de Malpighi
- 3 : derme
- 4 : miroir de cuivre

L'épiderme y est particulièrement épais (2 à 3 mm), sa couche vivante, couche de Malpighi, y est très développée par rapport à la couche cornée (fig.28C). Le derme supérieur s'enfonce dans cet épiderme par de très fines et hautes papilles dermiques richement vascularisées qui peuvent presque atteindre la couche cornée. Une telle disposition est caractéristique des épithélia épais : elle assure une meilleure cohésion entre le derme et épiderme ainsi qu'une meilleure oxygénation des kératinocytes.

Nous avons découpé nos prélèvements au coupe-cors en tranches de 0,5 mm d'épaisseur (fig.29). Après élimination des couches les plus superficielles (fig.29B), on obtient alors un échantillon où les papilles dermiques arrivent jusqu'au bord libre (fig.29C). Le tissu ainsi dégagé est de consistance relativement homogène, les fines papilles coupées transversalement étant réparties d'une manière régulière au sein de l'épiderme. Nous disposons dès lors d'une surface où la JED (qui entoure chaque papille) est observable à de nombreux endroits. Lors de la congélation de cette surface (fig.29C') nous n'avons plus les déformations observées lors de la cryofixation de la peau humaine et dans chaque échantillon cryofixé, il est possible de détecter (fig.29E et 29F) des zones de JED correctement cryofixées.

3.2. Caractérisation morphologique de la JED du mufle de Bovidés

3.2.1. Aspects de la JED après techniques classiques

Préliminaires : a) avant de juger l'apport de la cryofixation et de la cryosubstitution sur la morphologie de la JED, il convenait de bien la connaître en microscopie traditionnelle afin de disposer d'une **iconographie personnelle de référence**.

Il nous a semblé important de vérifier si la JED du mufle des bovins correspondait au schéma classiquement proposé chez d'autres espèces plus fréquemment étudiées comme le rat (Goldberg, 1984; Reale, 1985), la souris (Gordon, 1980) ou l'homme (Salonen, 1984; Kirkham, 1989).

Il nous a également paru intéressant de vérifier l'influence éventuelle des fixateurs chimiques sur sa morphologie fine et de voir si d'autres modèles (comme ceux proposés par Gordon, 1980, fig.14) se vérifiaient aussi chez les Bovidés.

b) **choix des fixateurs**

Nous nous sommes limités à quatre fixations (fix.) différentes.

Nous avons d'abord retenu la fixation double au glutaraldéhyde (glut) et à l' OsO_4 (fix.1) car il s'agit de la fixation de routine par excellence.

Nous avons ensuite testé la fixation à l' OsO_4 seul (fix.2), cette dernière étant souvent utilisée dans les études morphologiques portant sur les épithélia (Breathnach, 1971). Elle nous servira de plus de référence directe pour établir une comparaison avec un de nos tests de CS où nous essayerons d'améliorer le milieu de substitution en y ajoutant de l' OsO_4 au même pourcentage.

Nous avons encore, comme Gordon (1980) choisi d'ajouter du rouge de ruthénium à la fois au glut et à l' OsO_4 (fix.3). Le mode d'action précis du rouge de ruthénium est encore mal connu à l'heure actuelle (Luft, 1971a et 1971b; Cohn, 1977). Ce composé inorganique, cation hexavalent, précipiterait une large variété de polyanions. Il se lierait tout particulièrement avec les glycosaminoglycanes (GAG), composés solubles donc perdus dans les fixations classiques. L' OsO_4 oxyderait ensuite le rouge de ruthénium (RR) du complexe RR-GAG en un ruthénium brun, substance

	fixation 1 glut/0 _s 0 ₄	fixation 2 0 _s 0 ₄	fixation 3 rouge de ruthénium	fixation 4 ac. tannique
MEMBRANE PLASMIQUE	-aspect mono- laminaire -plaque d'attache des hémi- desmosomes continue, et d'épaisseur constante	-aspect mono- laminaire -plaque d'attache des hémi- desmosomes discontinue et d'épaisseur variable	-aspect mono- laminaire -plaque d'attache des hémi- desmosomes discontinue et d'épaisseur variable	-aspect tri- laminaire -plaque d'attache des hémi- desmosomes continue et d'épaisseur constante mais discrète
LAMINA LUCIDA	-ruban clair d'épaisseur variable -quelques filaments d'ancrage -plaque sous- basale nette avec nbx filaments d'ancrage	-ruban clair d'épaisseur variable -quelques filaments d'ancrage -plaque sous- basale nette avec nbx filaments d'ancrage	-plages claires séparées par des zones denses à contenu finement granuleux -plaque sous- basale nette	-ruban clair d'épaisseur variable -quelques filaments d'ancrage -plaque sous- basale nette
LAMINA DENSA	-ruban dense d'épaisseur variable, plus mince que la LL -contenu finement granuleux -plus épais sous hémidesmosome	-ruban dense d'épaisseur variable plus mince que LL -contenu finement granuleux -plus épais sous hémidesmosome	-ruban dense très épais mais d'épaisseur variable mal délimité de LL -contenu finement granuleux	-ruban dense d'épaisseur variable plus mince que LL -contenu finement granuleux -épaississement sous hémi- desmosome peu marqué
LAMINA SUBBASALE	-peu de détails fibrilles d'ancrage et microfibrilles rarement visibles	-3 types de fibres perceptibles	-3 types de fibres perceptibles	-3 types de fibres perceptibles

tableau 8 : aspects de la JED après techniques classiques (fig.30 et 31)

contrastante. Le RR agirait donc à la fois comme fixateur et comme colorant. Ces deux propriétés rendent le RR particulièrement intéressant pour toute étude de la JED, zone riche en protéoglycanes.

Nous avons enfin retenu une fixation triple où intervient en plus du glut et de l'OsO₄, de l'acide tannique (fix.4). Ce dernier agirait en rendant plus résistant à l'extraction lors de la déshydratation et de l'inclusion, certains composants tissulaires comme les protéoglycanes (Simionescu, 1976a, et 1976b). Il permettrait également d'augmenter le contraste des coupes lors de la coloration au citrate de plomb (solution de Reynolds) en agissant comme "mordanceur" des structures fixées à l'OsO₄.

c) choix des critères

Pour caractériser morphologiquement la JED et pour pouvoir établir ensuite des comparaisons valables, nous avons choisi d'observer au niveau de chacune de ses "couches" certains détails particuliers.

Ainsi au niveau de la *membrane plasmique* (MP) nous nous sommes attachés à observer son aspect général (trilaminaire, ligne diffuse) ainsi que celui de ses hémidesmosomes (forme des plaques d'attache, implantation des tonofilaments, ...)

Nous avons défini la *lamina lucida* (LL) en essayant d'apprécier son épaisseur, sa transparence aux électrons, la disposition des filaments d'ancrage, ...

Pour caractériser la *lamina densa* (LD) nous avons tenté de détailler son contenu (matériel granuleux, filamenteux).

Au niveau de la *lamina subbasale* (LSB), nous nous sommes limités à définir les éléments fibreux perceptibles.

Observations

Nos observations sont résumées dans le tableau 8 et illustrées dans les figures 30 et 31.

fig.30 : peau de Bovidés techniquée classiquement

ce : cellule épidermique

d : derme

A : semi-fine de peau fixée au glut/OsO₄(fix.1)
inclue à l'Epon et colorée au bleu
de toluidine (Gross.: 530x)

B : semi-fine de peau fixée au OsO₄ (fix.2)
inclue à l'Epon et colorée au bleu de
toluidine (Gross.: 530x)

C : JED après fixation au glut/OsO₄ (fix.1)
Elle présente l'aspect classique : une lamina
lucida (LL) claire parcourue par des
filaments d'ancrage (fla) et une plaque sous-
basale dans la région sous-hémidesmosomiale
(psb); une lamina densa (LD) dense granuleuse.
Peu de détails sont discernables dans la lamina
subbasale (LSB)
L'hémidesmosome (hd) montre une plaque
d'attache plutôt continue (Gross.:78 0000x)

D : JED après fixation au OsO₄ (fix.2)
La lamina lucida (LL) est claire, la lamina
densa (LD) dense. La lamina subbasale
montre des fibrilles d'ancrage (fba) et des
microfibrilles (mf). L'hémidesmosome (hd)
présente une plaque d'attache discontinue.
(Gross.:78 0000x)

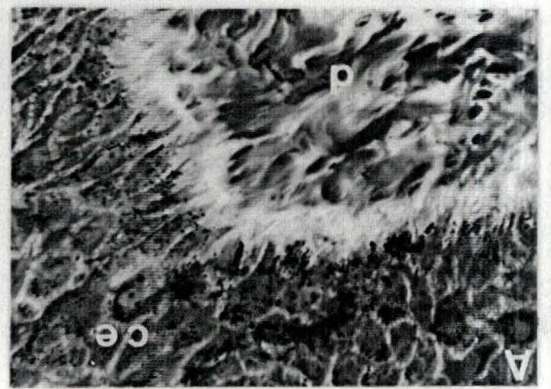
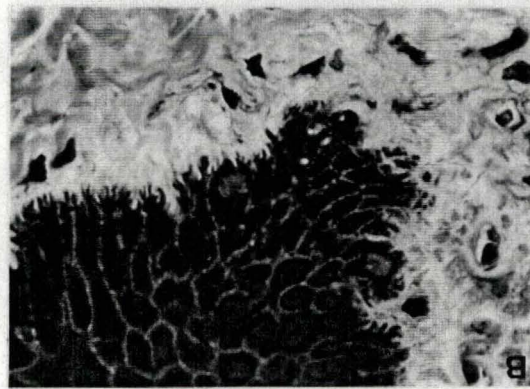
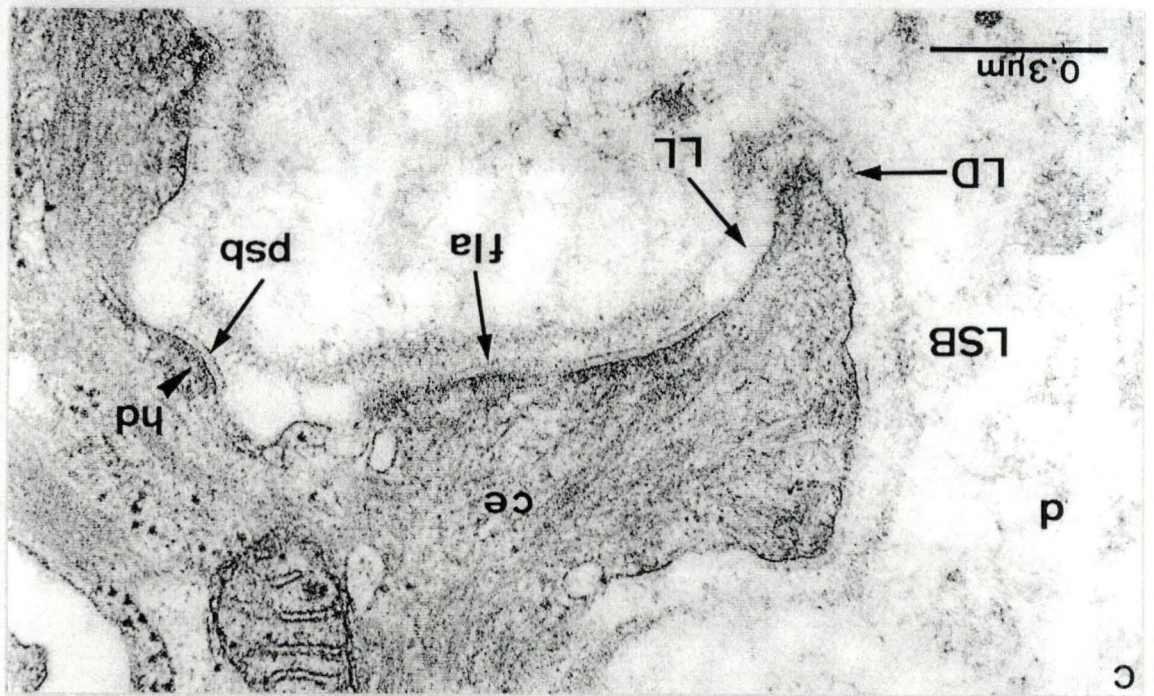
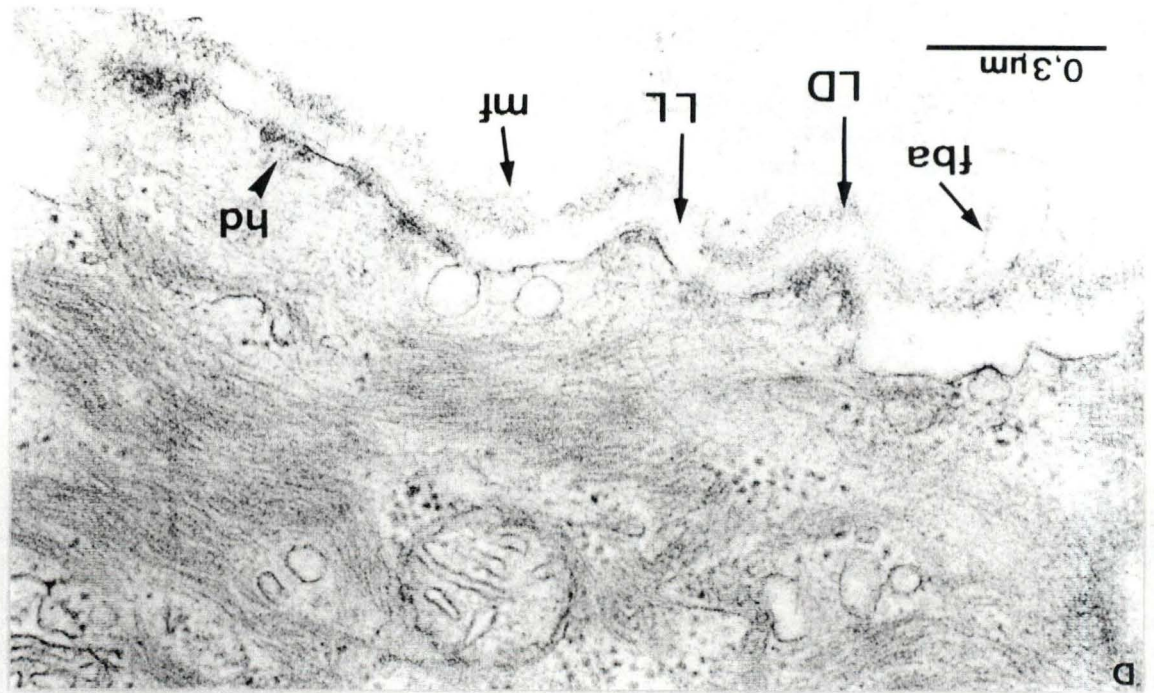
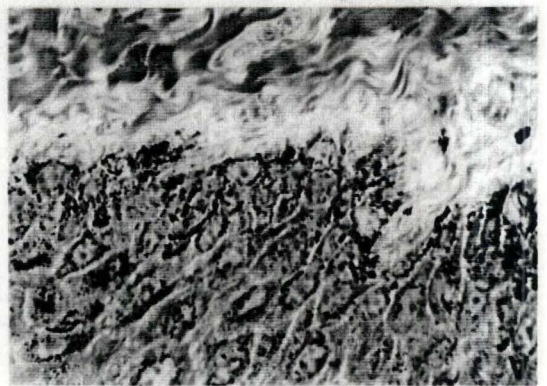
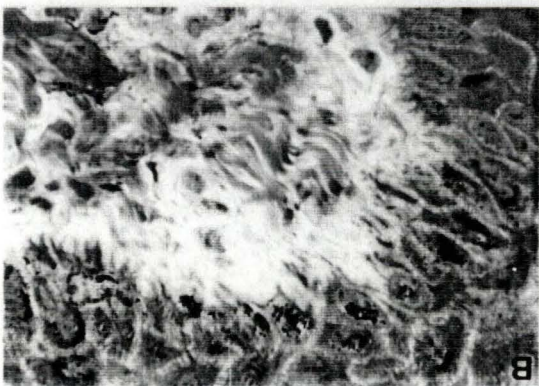
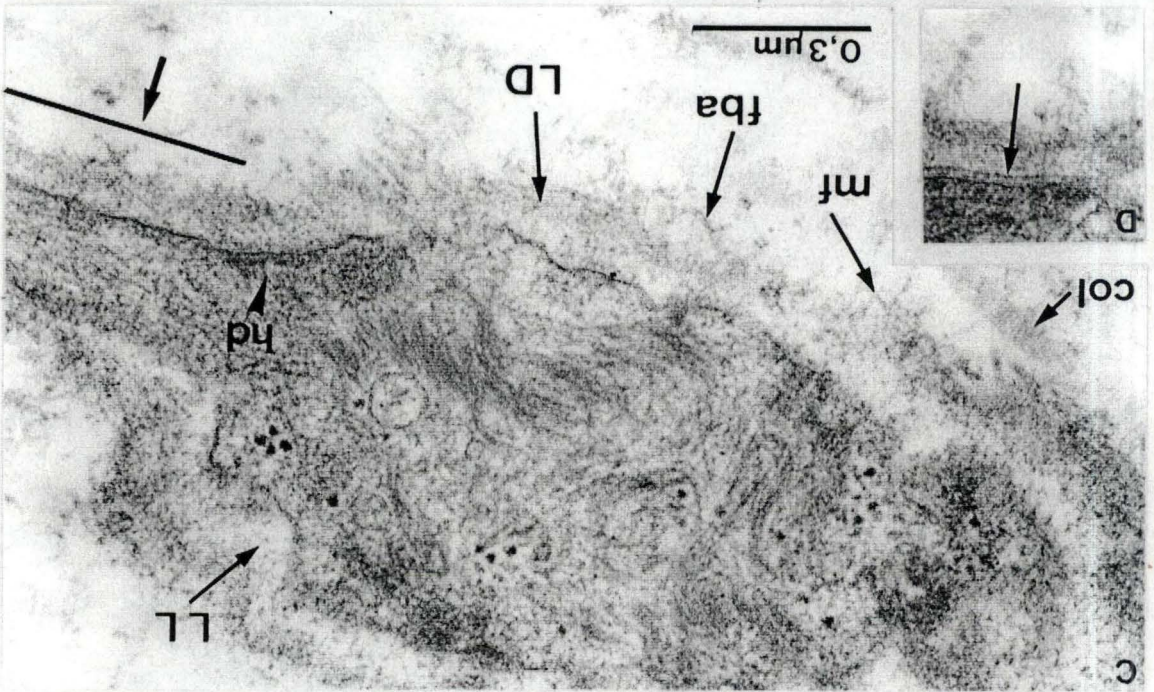
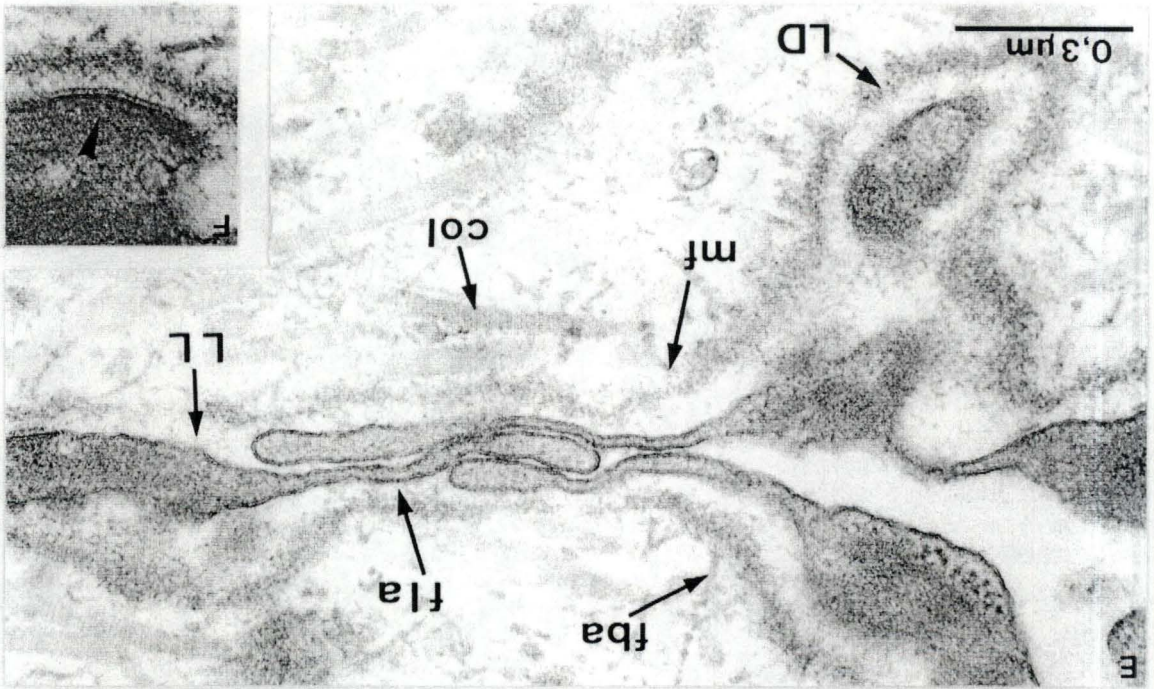


fig.31 : peau de Bovidés techniquée classiquement

- A : semi-fine de peau fixée au rouge de ruthénium (fix.3) (Gross.:530x)
- B : semi-fine de peau fixée à l'acide tannique (fix.4) (Gross.: 530x)
- C : JED après fixation au rouge de ruthénium (fix.3). Elle se présente sous deux aspects:
- la lamina lucida est claire (LL), on distingue une lamina densa (LD)
- les lamina lucida et densa sont confondues (flèche)
L'hémidesmosome (hd) montre une plaque d'attache discontinue. On distingue les détails dans la lamina subbasale : fibrilles d'ancrage (fba), microfibrilles (mf) et fibres de collagène (col) (Gross.: 78 000x)
- D : détail de la zone sous-hémidesmosomiale : plaque sous-basale (flèche) (Gross.: 78 000x)
- E : JED après fixation à l'acide tannique (fix.4). La membrane plasmique montre un aspect trilaminaire. La lamina lucida (LL) est claire et parcourue par des filaments d'ancrage, la lamina densa (LD) est dense. La lamina subbasale montre des fibrilles d'ancrage (fba), microfibrilles (mf) et des fibres de collagène (col) (Gross.: 78 000x)
- F : L'hémidesmosome présente une plaque d'attache mince (flèche) (Gross.: 78 000x)



Commentaires des résultats

Aucune des quatre variations de fixation ne correspond parfaitement au schéma classique (proposé entre autre par Briggaman, 1982)

Seule la fixation à l'acide tannique permet de voir l'aspect trilaminaire de la **membrane plasmique** au grossissement employé (78 000 x) (fig.31E).

Au niveau des **hémidesmosomes**, nous avons constaté que la plaque d'attache montre un aspect différent selon le type de fixation. Elle peut ainsi être d'un seul tenant et d'épaisseur constante (fix.1, fig.30C et fix.4, fig.31F) ou, au contraire, discontinue et d'épaisseur variable (fix.2, fig.30D et fix.3, fig.31C). Il nous est difficile de juger qu'elle est l'image la moins artéfactuelle ne disposant pas d'éléments de référence. En effet, la plupart des travaux dans la littérature portent sur des membranes basales autres que celle de la peau et ne possèdent pas d'hémidesmosomes.

La structure de la **LL** apparaît constante dans trois fixations (fix.1, fig.30C et fix.2, fig.30D et fix.3, fig.31E). Cette zone transparente aux électrons se présente sur coupe comme un "ruban" d'épaisseur variable mais toujours continu et bien individualisé. Peu de détails s'y observent, les filaments d'ancrage sont rares sauf dans la région sous-hémidesmosomiale

Par contre dans la fixation au rouge de ruthénium (fig.31C), son aspect est totalement différent. On n'observe de zones transparentes aux électrons que localement. Entre ces plages claires, l'espace est occupé par du matériel dense, finement granuleux comparable à celui de la LD. Nos observations rejoignent celles de Gordon (1980) qui décrit des "pieds denses" émanant de la LD (fig.14) pouvant être assimilés à nos régions denses. Cependant ces derniers dans le mufle de veau semblent différer de par leur taille très variable et leur disposition irrégulière.

Contrairement à certains auteurs qui ont utilisé le rouge de ruthénium nous n'avons jamais mis en évidence ni dans les zones denses, ni dans les plages claires, de grosses particules de 20 nm de diamètre (Goldberg, 1984; Kanwar, 1979) ou de grosses

fibres individualisées (Reale, 1985). Soulignons que comme dans toutes les descriptions de membranes basales fixées au rouge de ruthénium (et donc contrairement au schéma classique), nous avons retrouvé la présence de matériel dense dans la LL. Ce matériel qui peut être de texture variable correspondrait aux protéoglycanes précipités par le rouge de ruthénium (Gordon, 1980).

Remarquons que la fixation à l'acide tannique ne nous a pas apporté plus de renseignements que les fixations de routine. Gordon (1980) cependant avait pu mettre en évidence par ce fixateur chez la souris un nombre important de filaments d'ancrage en dehors de la zone sous-hémidesmosomiale.

La LD est toujours bien visible dans toutes les fixations testées et se présente comme un ruban continu occupé par un matériel dense aux électrons et finement granuleux. Elle présente une épaisseur maximale dans la fixation au rouge de ruthénium où ses limites avec la LL sont mal définies.

Dans toutes les fixations, nous avons pu détailler au niveau de la LSB les trois types de fibres classiquement décrites (fig.30D, 31C, 31E, flèches). Cependant dans le cas de la fixation au glut/OsO₄ (fig.30C), elles paraissent relativement moins bien préservées. Cette fixation de routine ne semble pas être optimale pour la JED.

Il ressort de ce premier test que l'image de la JED est fonction du choix des fixateurs, certains conservant mieux que d'autres ses constituants. Nous pouvons supposer que la fixation avec le rouge de ruthénium est la plus complète et nous fournit une image proche de la réalité.

Nos observations rejoignent celles faites par quelques auteurs qui se sont penchés sur le problème (Gordon, 1980; Reale, 1985, Kanwar, 1979). Signalons qu'aucun d'entre eux n'a cependant travaillé sur une véritable JED, ni sur du matériel bovin. Cela peut expliquer les quelques différences que nous avons citées.

3.2.2. Aspects de la JED après CF et CS

Avant d'examiner l'aspect de la JED après CF par impact suivie d'une CS, il nous a fallu **mettre au point** ces techniques nouvelles pour le département et même en Belgique. La première étape importante était de congeler correctement les échantillons ce qui impliquait une recherche du bon réglage de l'appareil MM80: vitesse et force d'impact à déterminer de façon à optimiser la congélation de notre type de matériel à savoir le muflon de Bovides.

Pour juger de la **qualité de la cryofixation** seule, il aurait fallu pouvoir examiner directement les échantillons dans un microscope électronique à transmission muni d'un dispositif de refroidissement. N'ayant pu disposer d'un tel système, nous avons dû faire subir aux échantillons cryofixés une certaine préparation afin de pouvoir les examiner en coupe ultra-fine après inclusion à l'Epon, au microscope électronique traditionnel. Pour les déshydrater, nous avons choisi de les cryosubstituer tous de manière identique sans connaître au préalable les artefacts introduits par cette 2^{ème} étape.

En introduisant un paramètre nouveau mais constant, nous avons ainsi un moyen, dans le cadre des techniques du département, de contrôler l'impact de la CF sur nos échantillons.

Une fois l'appareil réglé, nous avons essayé d'améliorer la CF par l'emploi de cryoprotecteurs.

Après avoir déterminé la CF optimale, nous avons testé l'influence de la CS sur la qualité de nos échantillons cryofixés.

3.2.2.1. Choix de la combinaison vitesse-force

Le système MM80 de Reichert-Jung permet de varier la vitesse et la force avec lesquelles le piston garni du porte-échantillon est précipité sur le miroir de cuivre. Une vitesse et force trop faibles ne permettent pas une extraction de chaleur suffisamment importante pour éviter la formation des cristaux de glace. Par contre une vitesse et force trop élevées conduisent à des

		V ₂ F ₂	V ₂ F ₆	V ₂ F ₁₀	V ₆ F ₂	V ₆ F ₆	V ₆ F ₁₀	V ₁₀ F ₂	V ₁₀ F ₆	V ₁₀ F ₁₀
0 à 3µm	noyau	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	cytoplasme	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	t. conj.	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	JED	-	-	-	-	-	+	-	-	+
3 à 5µm	noyau	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	cytoplasme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	t. conj.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JED	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5µm et +	noyau	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	cytoplasme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	t. conj.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	JED	+	+	+	+	+	+	+	+	+

tableau 9 : test vitesses-forces

(+) : présence de compartiments de ségrégation

(-) : absence de compartiments de ségrégation

dommages mécaniques du tissu lors de son impact sur le miroir de cuivre (Sitte, 1985).

Le premier test était dès lors la recherche de la vitesse et force optimale pour notre tissu. Les paramètres "vitesse" et "force" étant réglables séparément de 1 à 11, nous avons opté pour les neuf combinaisons suivantes :

V2F2	V6F2	V10F2
V2F6	V6F6	V10F6
V2F10	V6F10	V10F10

Six échantillons par combinaison ont été cryofixés individuellement, avant d'être tous cryosubstitués, comme nous l'avons déjà dit, de manière identique. Nous avons choisi la CS suivie par Goldberg (1986), seul auteur à notre connaissance à avoir décrit par cette technique une membrane basale. Dans ce protocole (protocole de Van Harreveld) le milieu de substitution est composé d'OsO₄ 2,5% dissout dans de l'acétone absolue et les temps de CS sont longs à savoir trois jours à 183 K (-90 °C).

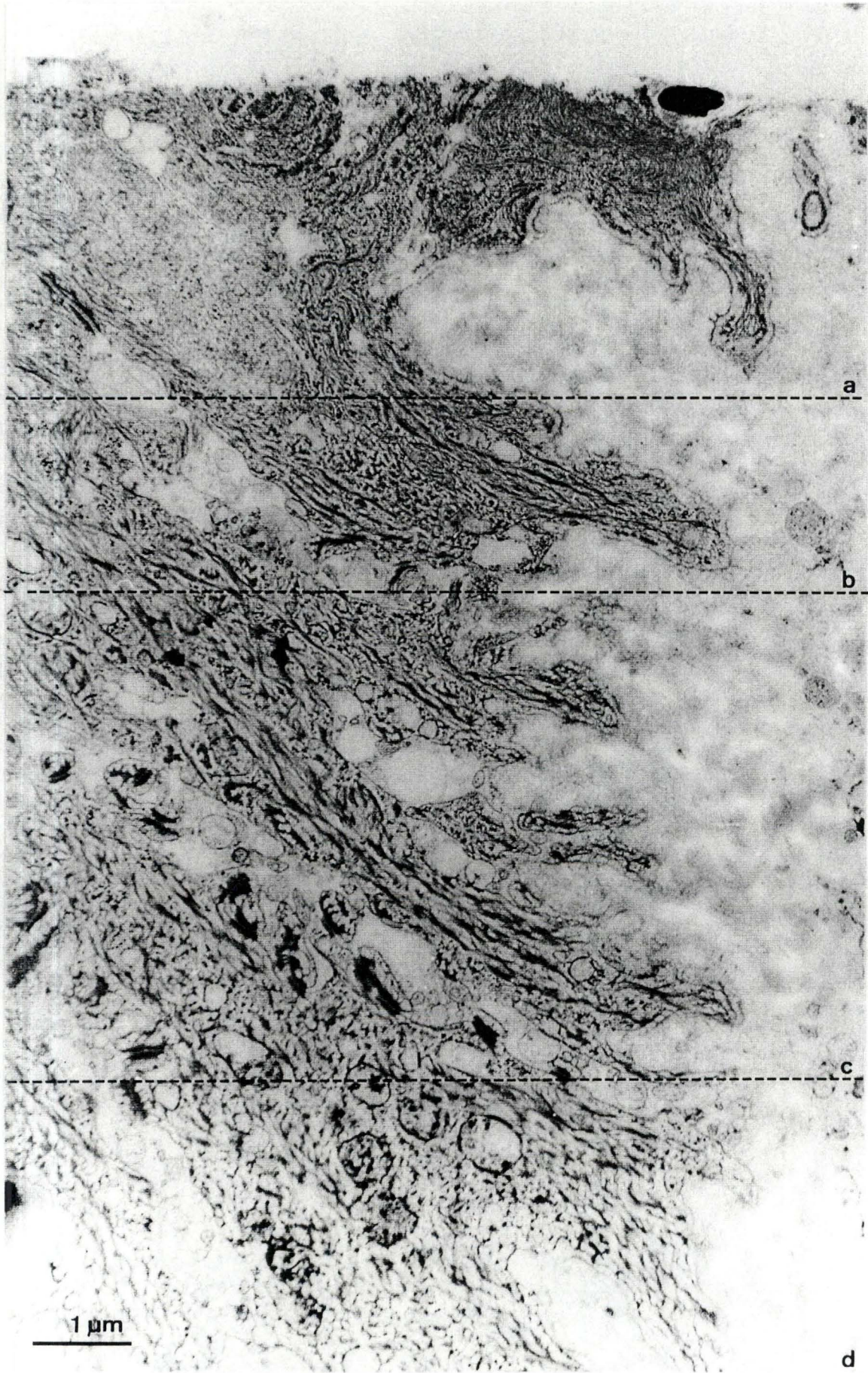
Pour déterminer la qualité de la CF nous avons choisi de nous baser au niveau des ultra-fines sur l'apparition des compartiments de ségrégation, artéfacts typiques de congélation (appelés encore "ice-crystal-ghosts"). Il s'agit d'aires claires, de taille variable, toujours de forme polygonale, séparées les unes des autres par les lignes sombres. Ces aires claires correspondent à l'emplacement des cristaux de glace enlevés lors de la déshydratation. Les lignes sombres représentent le protoplasme concentré par la formation des cristaux (Steinbrecht, 1980) (fig.27E). Rappelons que leur taille augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne du bord d'impact car la vitesse de congélation diminue lorsqu'on s'écarte de ce même bord.

Observations

Nos observations sont résumées dans le tableau 9 et illustrées dans les figures 32 et 33.

fig.32 : aspect d'un tissu cryofixé (V6F6) et cryosubstitué (OsO₄ dans **acétone, temps longs**) (Gross.: 17 000x)

- a : zone de 0 à 3 μm du bord d'impact : zone sans compartiments de ségrégation
- b : zone de 3 à 5 μm du bord d'impact : apparition de compartiments de ségrégation
- c : zone de 5 à 10 μm du bord d'impact
- d : zone au-delà de 10 μm du bord d'impact : la taille des compartiments de ségrégation augmente de plus en plus



a

b

c

d

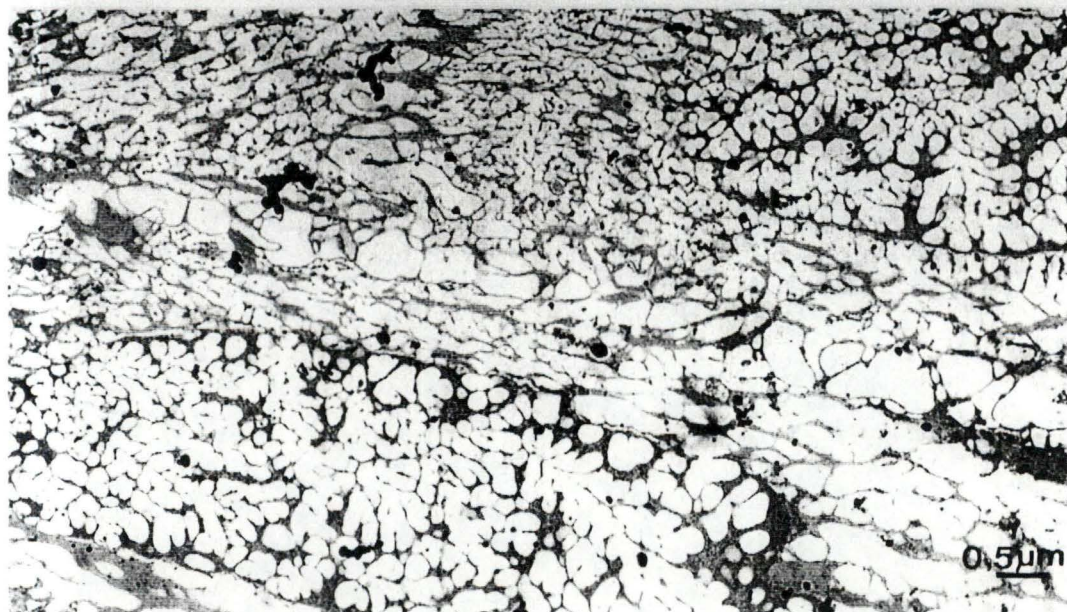
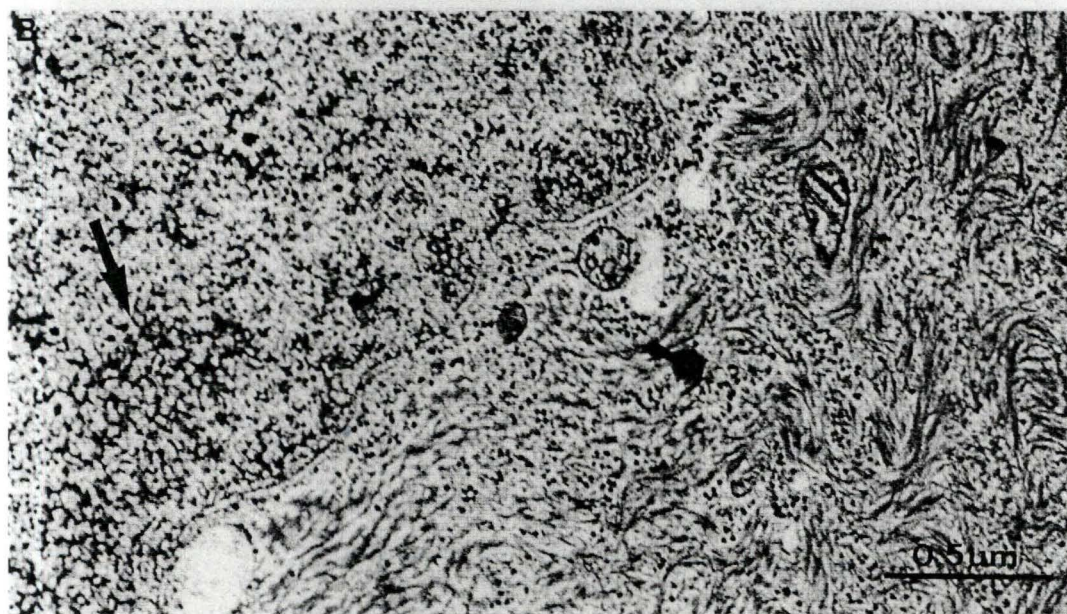
1 μm

fig.33 : détail d'un échantillon cryofixé (V6F6) et cryosubstitué (OsO_4 dans **acétone, temps longs**)

A : zone de 0 à 3 μm du bord d'impact :
zone sans compartiments de ségrégation
(Gross.: 78 000x)

B : zone de 3 à 5 μm du bord d'impact :
apparition de compartiments de ségrégation au
niveau du noyau (flèche) (Gross.: 44 000x)

C : zone au-delà de 15 μm du bord d'impact
existence de compartiments de ségrégation de
taille importante (Gross.: 12 000x)



Commentaires des résultats

La **première constatation** qui s'impose de ce test préliminaire est que la CF est une technique relativement délicate : des échantillons apparemment identiques congelés dans des conditions semblables (même combinaison) montrent des résultats variables.

La zone correctement cryofixée c-à-d sans compartiments de ségrégation non seulement varie en épaisseur d'un échantillon à l'autre dans un même test mais aussi au sein d'un même échantillon (fig.32)

Deux raisons majeures permettent d'expliquer ces résultats : d'une part l'existence d'un grand nombre de paramètres difficilement contrôlables lors de la technique en elle-même et d'autre part l'hétérogénéité de notre tissu.

- ainsi lors de la CF, il est extrêmement important de veiller à l'état du miroir en cuivre. Celui-ci doit être particulièrement propre et non terni par la moindre condensation de vapeur d'eau pour optimiser l'extraction de chaleur de l'échantillon lors de l'impact

- de même, il nous est apparu que le tissu technique doit être le plus petit possible et surtout le plus mince possible car n'oublions pas que l'extraction de chaleur ne se fait que du côté de l'impact qui est le seul correctement congelé. L'idéal serait de cryofixer des échantillons parfaitement calibrés, d'épaisseur constante, identiques, ce que nous n'avons jamais pu garantir avec notre mode de découpe

- il est extrêmement important de préparer les échantillons à cryofixer extemporanément et surtout d'essorer correctement leur surface avant de les fixer au piston. Tout film de liquide recouvrant l'échantillon ralentit en effet sa CF car constitue une couche supplémentaire, l'isolant du miroir

- la fixation de l'échantillon au piston doit également être très rapide afin d'éviter que le tissu ne commence à se refroidir par les vapeurs d'azote émanant de l'appareil (et par là à former de gros cristaux) et ce, avant la CF proprement dite

- après l'impact, il faut empêcher le spécimen cryofixé de se réchauffer (danger de recristallisation) notamment lors de son

transfert de l'appareil de CF à l'appareil de CS. Une chambre isolante, préalablement refroidie à la t° de la CF (telle qu'il en existe sur l'appareil CS auto de Reichert que nous avons eu en démonstration) permet de réduire les inconvénients de cette étape. Nous n'avons malheureusement pas pu en disposer pour notre travail.

La texture même de notre matériel (enchevêtrement de papilles dermiques et de tissu épithélial) est certainement la deuxième raison permettant d'expliquer la relative hétérogénéité de nos résultats.

Il est vraisemblable qu'à cause de la dureté différente des tissus qui entrent dans la constitution du mufle, nous n'avons jamais pu obtenir, lors de la découpe de nos échantillons, des surfaces de CF parfaitement planes : cela expliquerait qu'au moment de l'impact avec le miroir, l'extraction de chaleur se soit faite plus lentement dans certaines zones que dans d'autres et ainsi ait engendré plus vite à certains endroits des artéfacts.

Comme de plus la conductivité à la chaleur diffère d'un tissu à l'autre, nous pouvons comprendre qu'à équidistance du bord d'impact, nous avons souvent observé des compartiments de ségrégation de taille fort différente dans l'épithélium et le tissu conjonctif.

Mais nous avons aussi constaté qu'au sein d'un même tissu, il existe également des variations dans la taille des artéfacts, les organites cellulaires réagissant en effet différemment à la CF. Ainsi, le noyau par exemple est toujours le premier à montrer des signes de compartiments de ségrégation (fig.33B). Nous pensons donc comme l'a suggéré Sitte (1987) que cet organite peut dès lors être considéré comme un excellent indicateur de la qualité de la CF.

La **deuxième constatation** ressortant de nos observations est que les paramètres "force" et "vitesse" interfèrent peu dans la qualité de la CF obtenue (tableau 9).

Néanmoins nous avons remarqué que le paramètre "force" semble avoir plus d'importance que le paramètre "vitesse". Aux mêmes

"forces", les résultats obtenus en variant les "vitesses" sont à peu près équivalents. Par contre, pour une même vitesse une augmentation de la force entraîne davantage d'artéfacts. Les forces c-à-d les poussées exercées sur l'échantillon juste avant l'impact, dans les combinaisons V2F10, V6F10, V10F10 semblent trop importantes pour notre tissu ainsi qu'en témoignent les dommages mécaniques (déchirures ou déformations) que nous avons parfois observés.

Par contre les vitesses qui nous sont proposées sur l'appareil ne semblent pas influencer la qualité de la CF de notre tissu. Cela paraît logique, en effet Sitte (1987) signale qu'il faut au moins une vitesse de 5 m/s avant d'entraîner des dommages tissulaires (ici la vitesse maximale correspond à 2,5 m/s).

A part les combinaisons à "force" élevées, nous pouvons conclure et c'est la **troisième constatation** importante de cette expérience préliminaire, que toutes les autres combinaisons donnent des résultats de CF équivalents : la zone correctement cryofixée n'excédant jamais $3\mu\text{m}$ (fig.33A). Il est à noter que cette valeur est beaucoup moins élevée que celle décrite dans la littérature (10 à $12\mu\text{m}$, Dempsey, 1976; Sitte, 1987). Cette différence peut être imputée en partie à notre manque d'expérience dans la manipulation mais surtout à notre avis à la texture hétérogène du tissu employé. En effet, les auteurs qui ont obtenu de meilleurs résultats ont toujours travaillé sur des tissus de consistance beaucoup plus homogène (tissu musculaire, Edelman, 1989; foie, Sitte, 1987; suspension cellulaire, Handley, 1981).

C'est donc la combinaison **V6F6** moyen terme que nous avons retenue pour nos expériences ultérieures.

3.2.2.2. Morphologie de la JED

Observations

Nous avons observé 12 échantillons cryofixés, rappelons-le, en réglant l'appareil MM80 sur V6F6 et cryosubstitués selon le protocole de Goldberg (1986).

	< 2µm	2-5 µm	> 5µm
MEMBRANE PLASMIQUE	-trilaminaire -plaque d'attache continue d'épaisseur variable -implantation des tonofilaments peu nette	-trilaminaire -plaque d'attache discontinue	-trilaminaire -plus de plaque d'attache -implantation des tonofilaments sur MP
LAMINA LUCIDA	-zone homogène occupée par du matériel granuleux dense "zone granuleuse" -zone sous-hémidesmosome sous forme d'un trait noir -pas de filament d'ancrage	-apparition d'une LL -contenu granuleux "aéré" -plaque sous basale fragmentée -sans filament d'ancrage	-LL importante avec compartiments de ségrégation -contenu fibrillaire (?) -plaque sous basale fragmentée, granuleuse
LAMINA DENSA	-mince ruban noir -contenu granuleux -pas d'épaississement sous hémidesmosome	-ruban noir plus épais -contenu granuleux -épaississement sous hémidesmosome	-ruban noir granuleux -épaississement sous hémidesmosome
LAMINA SUBBASALE	-zone dense -contenu granuleux -pas de fibrille visible	-zone claire avec compartiments de ségrégation -pseudo fibrilles visibles	-zone claire avec grands compartiments de ségrégation -pseudo fibrilles

tableau 10 : aspects de la JED après cryofixation par impact (V6F6) et cryosubstitution selon le protocole de Goldberg (1986) (fig.34)

Nos observations sont résumées dans le tableau 10 et illustrées dans la fig.34.

Commentaires des résultats

Il ressort de toutes nos observations que la morphologie de la JED varie énormément en fonction de l'éloignement du bord d'impact mais que cette variation se retrouve dans tous les spécimens examinés.

Ainsi, **près du bord d'impact** (les deux premiers μm au maximum, fig.34A), la membrane plasmique présente un aspect trilaminaire. Elle supporte des plaques d'attache hémidesmosomiales discontinues mais d'épaisseur variable (aspect en dents de scie) et l'implantation des tonofilaments n'y est jamais nette (fig.34A).

Sous la membrane plasmique nous observons une zone homogène dense aux électrons, d'épaisseur relativement constante, occupée par du matériel plutôt granuleux que filamenteux : nous n'y avons jamais vu le moindre filament d'ancrage. Nous avons appelé "zone granuleuse" (ZG) cette couche à cause de sa texture, le terme de LL ("lame claire") nous semblant impropre ici (fig.34A).

Chaque région sous-hémidesmosomiale est soulignée par un trait plus dense aux électrons pouvant être assimilé à une plaque sous-basale.

Sous la zone granuleuse dense, nous distinguons une fine bande noire d'épaisseur constante. Il s'agit probablement de la LD décrite dans les techniques classiques dont elle diffère cependant par l'absence de particularités (épaississement,...) dans la région sous-hémidesmosomiale (fig.34A)

Cette mince "LD" est bordée côté derme par une troisième couche dense. Cette dernière, d'épaisseur très variable, est remplie par un matériel granuleux comparable à celui de la ZG et qui se retrouve également partout dans le derme autour des fibres de collagène (fig.34A). Cette zone qui pourrait correspondre à la LSB classique, ne présente jamais la moindre structure fibreuse.

Cet aspect de la JED se modifie très rapidement dès que l'on s'éloigne du bord d'impact.

fig.34 : aspect de la JED après CF (V6F6) et CS (OsO₄ dans acétone, temps longs)

A : zone près du bord d'impact (2µm)

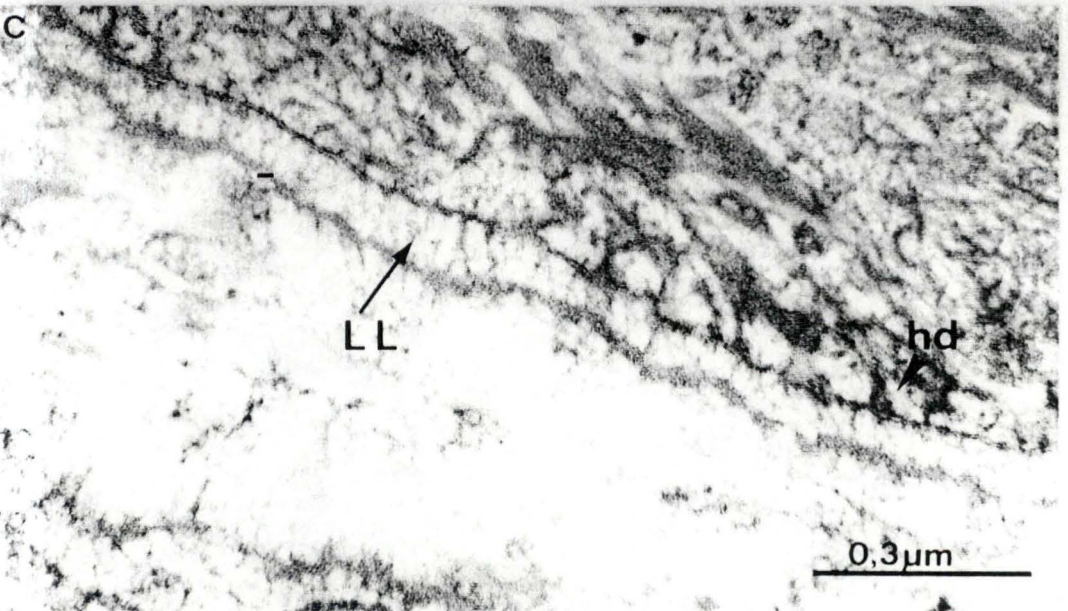
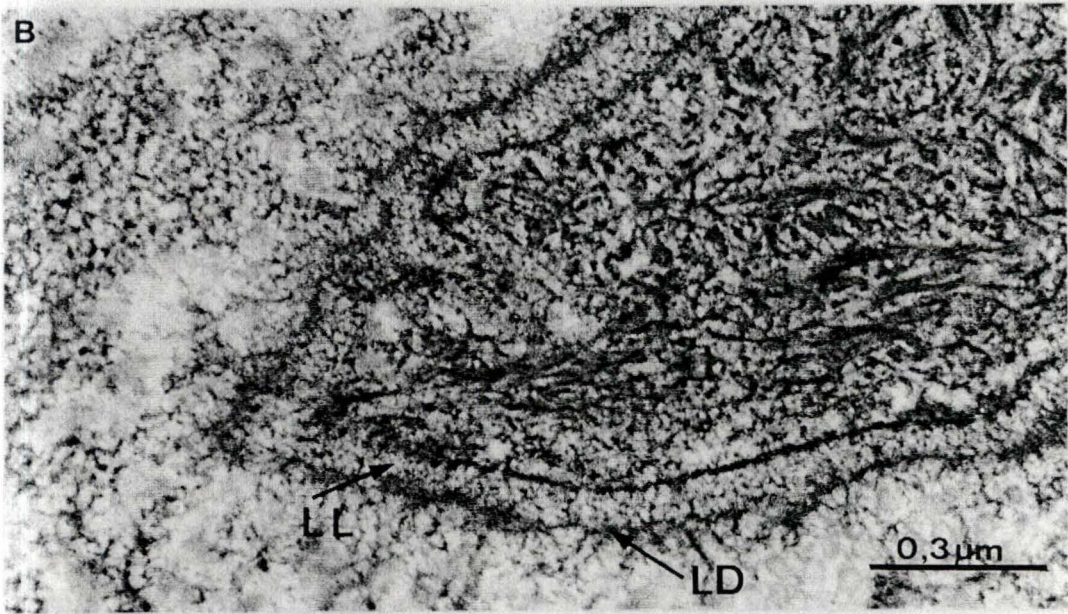
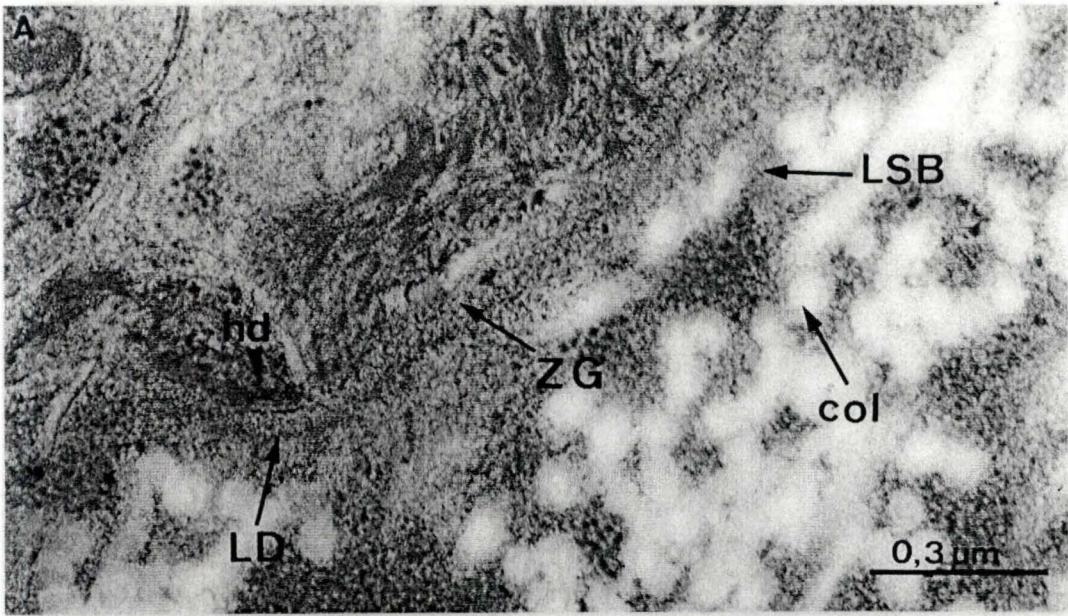
La JED est occupée entièrement par un matériel dense granuleux. Nous distinguons néanmoins une bande plus foncée (LD ?) qui délimite une zone granuleuse (ZG) côté épiderme et une zone dense (LSB ?) côté derme en continuité avec la substance fondamentale du derme entourant les fibres de collagène (col). Les tonofilaments s'implantent d'une manière diffuse au niveau de l'hémidesmosome (hd) (Gross.: 78 000x)

B : zone entre 2-5µm du bord d'impact.

Une lamina lucida (LL) se distingue nettement de la lamina densa (LD) (Gross.: 78 000x)

C : zone au-delà de 5µm

La lamina lucida (LL) devient de plus en plus claire. Elle est parcourue par des structures fibreuses. Au niveau de l'hémidesmosome les tonofilaments semblent s'implanter directement sur la membrane plasmique (flèche) (Gross.: 96 000x)



Ainsi **dès 2 μ m de distance** (fig.34B) nous constatons que les plaques d'attaches hémidesmosomiales se "fragmentent" en petits amas d'épaisseur variable dans lesquels viennent s'implanter d'une manière diffuse les tonofilaments.

Mais les modifications les plus spectaculaires s'observent au milieu des couches sous-jacentes : une LL se dessine sous la membrane plasmique. En effet, le matériel dense qui occupe la "zone granuleuse" devient moins abondant et il apparaît ainsi une zone plus claire aux électrons se contrastant par conséquent davantage du contexte. Aucune structure filamenteuse ne s'y observe. Le contenu granuleux y est dispersé d'une manière homogène, des petites condensations s'observent néanmoins sous les plaques d'attache hémidesmosomiales (fig.34B). Il s'agit vraisemblablement des plaques sous-basales.

Tandis que la LL s'éclaircit de plus en plus au fur et à mesure que l'on s'éloigne du bord d'impact, la LD se marque davantage. De texture également granuleuse, cette couche présente des épaisissements nettement marqués dans les zones sous hémidesmosomiale.

La zone dense homogène assimilée à la LSB disparaît progressivement. Elle devient de plus en plus claire. Des petits compartiments de ségrégation s'y observent très vite ainsi que des espèces de fibrilles. L'interprétation de ces dernières demande la plus grande prudence. Il s'agit peut-être des filaments décrites en microscopie classique mais peut-être aussi des bords des compartiments de ségrégation.

Après 5 μ m, les modifications que nous venons de décrire s'accroissent (fig.34C). Ainsi les plaques d'attache (fig.34C flèche) semblent disparaître, tandis que les tonofilaments paraissent s'implanter directement sur la membrane plasmique. La LL s'éclaircit davantage : des compartiments de ségrégation s'y remarquent ce qui lui confère un aspect filamenteux probablement artéfactuel.

Notons que la plaque sous-basale reste marquée par une condensation d'un matériel granuleux dans la zone hémidesmosomiale. Si la LD se présente toujours sous l'aspect d'un mince ruban noir à contenu granuleux (épaissie dans la zone sous

l'hémidesmosome), la LSB continue à s'estomper et les compartiments de ségrégation y deviennent de plus en plus grands.

Si nous pouvons supposer que l'image de la JED en dessous de $2\mu\text{m}$ du bord d'impact représente l'image la moins artéfactuelle, elle est totalement différente de celle décrite en microscopie classique. Il nous est difficile de discuter de ce sujet, faute de références dans la littérature. En effet, comme nous l'avons déjà signalé, la JED ne semble à notre connaissance avoir été décrite après CF et CS que par Goldberg (1986) et ce au niveau de la muqueuse gingivale de rat.

Sa description est proche de la nôtre : il observe une zone uniforme, tout à fait homogène (donc sans "LD"), épaisse de 20 à 100nm et de contenu granuleux sans le moindre filament ou fibrille d'ancrage. Ces différences sont peut-être liées à l'espèce ou à l'organe.

Notons que l'auteur ne précise dans ses descriptions ni la localisation par rapport au bord d'impact ni la moindre évolution dans la morphologie de la jonction lorsqu'on s'éloigne du bord d'impact.

Goldberg explique la densité de la JED par la conservation lors de la technique de froid des protéoglycanes localisés au niveau de la LL (notre zone granuleuse). Il confirme cette hypothèse par une coloration au bleu alcian (colorant basique précipitant les structures polyanioniques). Nos observations et celles de Goldberg rejoignent donc celles de Gordon (1980) qui avait déjà signalé en technique classique l'existence d'un matériel dense granuleux dans la LL grâce à l'utilisation du rouge de ruthénium.

Nous avons tenté également de vérifier la présence de ces structures dans la LL (zone granuleuse) en réalisant à notre tour un "staining" au bleu alcian sur des ultra-fines cryofixées et cryosubstituées, selon la méthode de Goldberg. Malheureusement notre test n'a pas été concluant. Nous n'avons pas pu, dans le cadre de ce mémoire, recommencer l'expérience. Pour démontrer l'hypothèse de la présence de protéoglycanes dans cette zone, il aurait fallu un test plus spécifique qu'un staining : un marquage

immunocytochimique des protéoglycanes (héparane ou chondroïtine sulfate) devrait résoudre ce problème.

Notons que les protéoglycanes ne sont pas forcément les seules substances occupant la LL. Laurie (1982 et 1984) observe un marquage de cinq composants de la membrane basale glomérulaire (collagène IV, entactine, laminine, protéoglycane héparane sulfate et fibronectine) dans la LD. Pour lui ces composants s'associeraient en un complexe moléculaire. Il se pourrait que ce complexe occupe en fait toute la JED d'une manière uniforme et bougerait lors de la fixation et déshydratation classique. Ici aussi un marquage immunocytochimique pourrait éclaircir la question.

Nous concluons en constatant que la JED pourrait être utilisée au même titre que le noyau comme indicateur de la qualité de la cryofixation puisque des différences morphologiques s'y observent en fonction de l'éloignement du bord d'impact.

Ainsi que nous l'avons déjà constaté en microscopie classique (§ 3.2.1.), la JED apparaît donc comme une structure fort sensible à la qualité de la fixation (qu'elle soit chimique ou physique).

3.2.2.3. Influence des cryoprotecteurs

Suite à l'expérience précédente nous avons voulu varier un paramètre dans notre technique : nous avons cryoprotégé nos échantillons avant de les cryofixer et cryosubstituer dans les mêmes conditions que celles des tests précédents (réglage V6F6 à l'appareil MM80, protocole de Goldberg)

La raison majeure qui nous a amené à rechercher l'utilisation d'un cryoprotecteur était d'essayer d'augmenter l'épaisseur de la zone correctement congelée, donc de diminuer l'importance des compartiments de ségrégation.

Nous avons opté pour l'emploi du glycérol (et nous nous sommes limités à lui seul dans le cadre de ce mémoire) car c'est un des cryoprotecteurs les plus utilisés notamment dans certaines techniques de froid comme le cryodécapage (Chandler, 1979; Leloup, 1979). Le glycérol cependant, s'il contribue à réduire la

	glycérol	glut-glycérol	glycérol	glut-glycérol
	1 ^{er} aspect: de type "classique"		2 ^{ème} aspect: de type "Goldberg"	
MEMBRANE PLASMIQUE	<ul style="list-style-type: none"> -trilaminaire -plaques d'attaches constituées de 2 zones <ul style="list-style-type: none"> a) zone d'ancrage des tonofilaments et petite formation dense de taille variable b) zone accolée à la MP formations triangulaires denses 			
LAMINA LUCIDA	<ul style="list-style-type: none"> -bien apparente -contenu granuleux "aéré" -plaques sous-basales sous forme d'un trait noir -pas de filament d'ancrage 		<ul style="list-style-type: none"> -zone uniforme -épaisseur variable -contenu dense granuleux -plaques basales sous forme d'un trait noir -pas de filament d'ancrage 	
LAMINA DENSA	<ul style="list-style-type: none"> -ruban épais dense -contenu granuleux -épaississement sous hémidesmosomes 			
LAMINA SUBBASALE	<ul style="list-style-type: none"> -peu distincte -fibrilles parfois visibles 		<ul style="list-style-type: none"> -non distincte 	

tableau 11 : aspects de la JED dans des tissus cryoprotégés avant d'être cryosubstitué selon le protocole de Goldberg (fig.36 et 37)

quantité de glace formée dans les compartiments intra- et extracellulaires (Dupierieux, 1989), altère aussi les cellules qu'il pénètre (Sitte, 1987). Il provoque notamment des dilatations de l'espace périnucléaire, des gonflements des mitochondries et la formation de "blebs" au niveau des membranes plasmiques. Ces artefacts peuvent être tempérés par une fixation chimique préalable au glutaraldéhyde (Böhler, 1979). Cette préfixation aldéhydique doit être suffisante pour figer partiellement les structures cellulaires et limiter ainsi les dégâts causés par le glycérol mais doit rester brève (30 min maximum) pour ne pas entraîner tous les artefacts observés lors des techniques classiques après fixation chimique de longue durée.

Pour pouvoir juger de l'influence du glycérol nous avons, après avoir techniqué six échantillons prétraités au glycérol (30%, 30 min), également préfixé six autres échantillons au glutaraldéhyde (2,5%, 30 min) avant de les cryoprotéger de la même manière que les précédents.

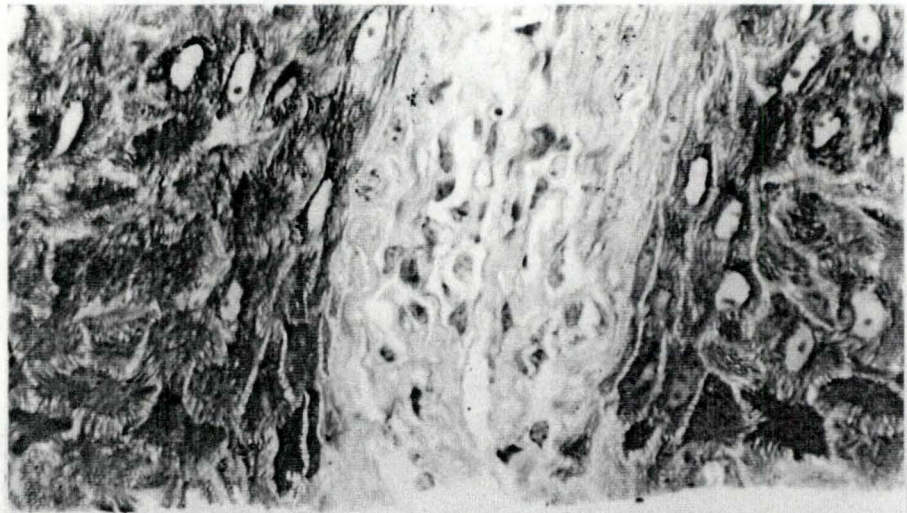
Observations

Nos observations sont résumées dans le tableau 11 et illustrées dans les figures 35, 36 et 37.

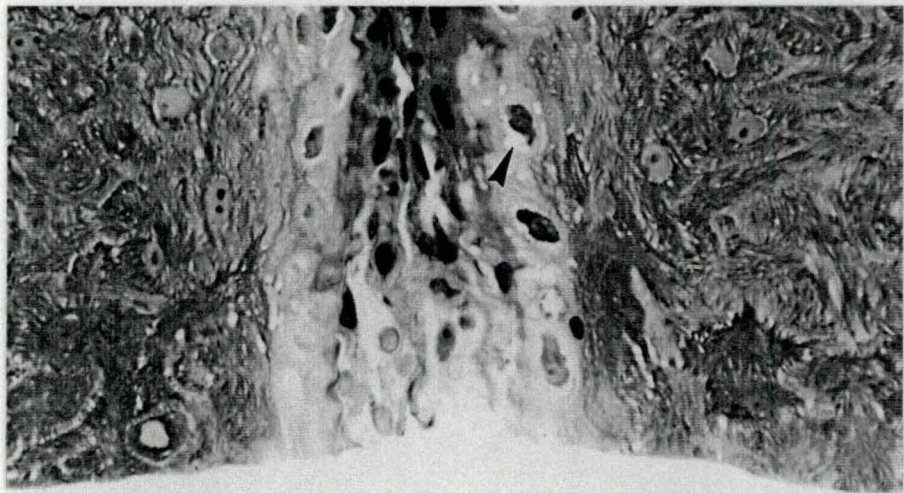
Commentaires des résultats

L'influence des cryoprotecteurs sur la qualité de la morphologie des tissus traités se remarque déjà au microscope optique. En effet, sur les coupes semi-fines de tissus cryofixés sans cryoprotecteur (fig.35A), il est possible de détecter la présence de compartiments de ségrégation, particulièrement dans la zone opposée au bord d'impact. Par contre dans les tissus prétraités au glycérol (fig.35B) ou au glut/glycérol (fig.35C), aucun compartiment de ségrégation ne s'observe en microscopie optique et ceci se vérifie en microscopie électronique (fig.36 et 37) sur toute l'épaisseur congelée (500 μ m).

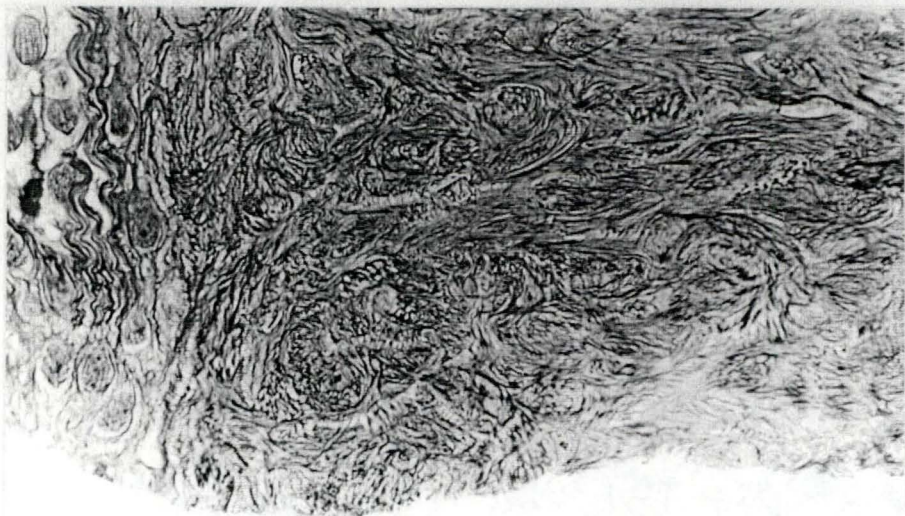
Nous avons retrouvé dans nos échantillons fixés au glycérol, les artefacts dus à ce cryoprotecteur, certains déjà visibles sur



C



B



A

fig. 36 : Influence des cryoprotecteurs
aspect de la JED d'un échantillon cryofixé (V6F6)
et cryosubstitué (OsO₄ dans **acétone, temps longs**)
après **cryoprotection au glycérol**.

Elle présente deux aspects :

A : aspect de "type classique" : existence d'une
lamina lucida (LL) et lamina densa (LD)
L'implantation des tonofilaments au niveau de
l'hémidesmosome se fait dans une formation
triangulaire par l'intermédiaire d'un petit
épaississement dense (flèche) (Gross.: 78 000x)

B : aspect de "type Goldberg" :
la JED ne présente aucune stratification
(Gross.: 78 000x)

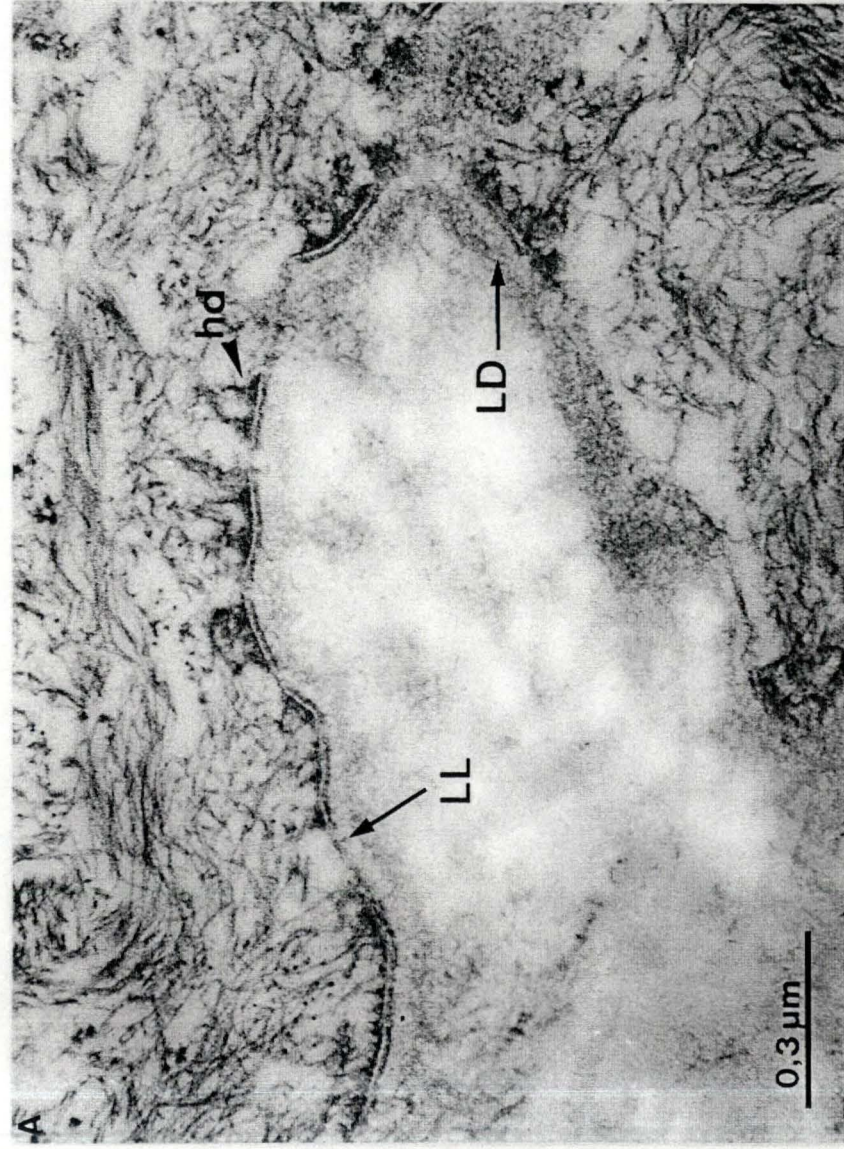
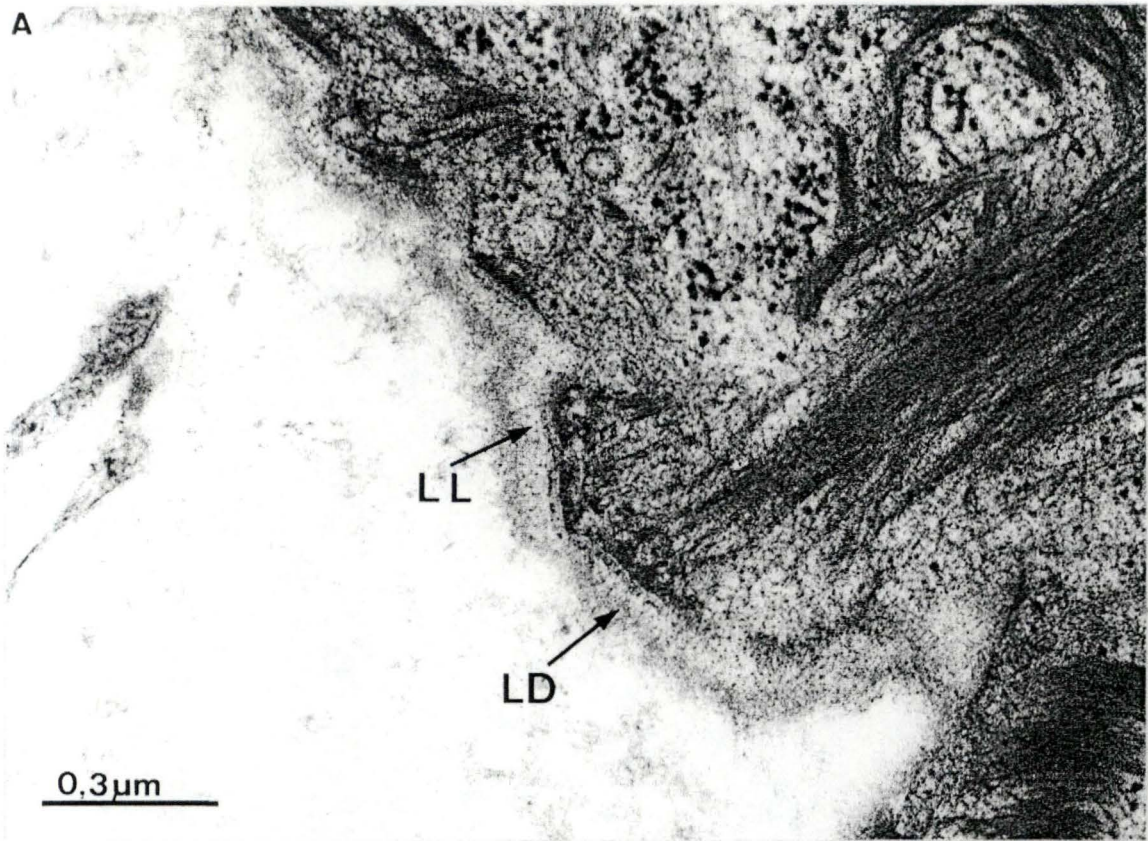


fig.37 : Influence des cryoprotecteurs
aspect de la JED d'un échantillon cryofixé (V6F6)
et cryosubstitué (OsO₄ dans **acétone, temps longs**)
après **préfixation au glut et cryoprotection**
au glycérol

A : aspect de "type classique" : existence d'une
lamina lucida (LL) et densa (LD)
(Gross.: 78 000x)

B : aspect de "type Goldberg" :
La JED ne présente aucune stratification
(Gross.: 78 000x)

A



0.3µm

coupes semi-fines comme par exemple la dilatation périnucléaire (fig.35B), les autres nécessitant une observation sur ultra-fines (gonflement des mitochondries,...). Tous ces artéfacts disparaissent dans les échantillons préfixés au glutaraldéhyde (fig.35C).

Au niveau de la JED nous n'avons pas observé de différences entre les deux types de spécimens. Nous avons retrouvé dans tous nos échantillons **deux morphologies distinctes** de la JED.

La **première** (fig.36A et 37A) est une image se rapprochant de la description **classique**.

La **membrane plasmique** qui présente souvent un aspect trilaminaire ne supporte pas de plaque d'attache continue mais des petites formations denses triangulaires (image en dents de scie). La pointe de chacune de ces formations triangulaires est en contact du côté cytoplasmique avec un petit épaissement dense de forme variable dans lequel viennent s'ancrer les tonofilaments (fig.36A). Deux zones distinctes se discernent donc ainsi dans ces "plaques d'attache", une zone plus interne, zone d'ancrage des tonofilaments et une zone intimement collée à la membrane plasmique (formations triangulaires).

Dans ce modèle, la **LL** est toujours bien apparente et occupée d'un matériel dense granuleux peu concentré, repartit d'une manière homogène. Les plaques sous-basales se marquent sous la forme d'un trait noir. Aucun filament d'ancrage n'y est discernable.

La **LD** se présente toujours sous la forme d'un ruban granuleux dense aux électrons épaissi au niveau de la zone sous-hémidesmosomiale.

La **LSB** est peu distincte, des fibrilles y sont parfois visibles.

La **deuxième** image que nous avons observée dans nos échantillons (fig.36B et 37B) est comparable à celle décrite par **Goldberg** (1986) dans la muqueuse gingivale de rat. La JED diffère dans ce modèle du précédent par l'aspect des couches situées sous la MP.

On n'y voit qu'une zone uniforme, d'épaisseur variable, occupée par un matériel dense granuleux. Dans cette masse homogène aucun détail fibrillaire ne s'observe, seules les

plaques sous-basales, toujours sous forme d'un trait noir, sont visibles.

Cette deuxième image est donc légèrement différente de celle que nous avons décrite précédemment dans la zone correctement congelée (2 μ m) des tissus techniques sans cryoprotecteurs (fig. 34A) puisque nous n'avons pas retrouvé ici de fine LD et par conséquent pas pu individualiser une éventuelle LSB.

Comment expliquer la coexistence des deux types d'images de la JED (modèle "classique" et modèle "Goldberg") au sein du tissu cryoprotégé ? La première idée est qu'elle résulte d'observations réalisées sur des JED situées à des **distances différentes** du bord d'impact. Nous avons en effet déjà constaté (§ 3.2.2.2.) que la JED est une structure extrêmement sensible à toute fixation, particulièrement à la congélation. Cette idée ne peut être retenue car nous avons retrouvé très souvent côte à côte les deux modèles et ce à une équidistance du bord d'impact. Nous pensons que ces deux représentations pourraient être le reflet du **dynamisme** de la JED dont les rôles ainsi que nous l'avons signalé sont multiples : les passages de molécules, les mouvements des kératinocytes basaux (impliquant la destruction et la formation des hémidesmosomes) en font une structure continuellement soumise à des remaniements. De même, certains états physiologiques pourraient la rendre plus sensible à l'influence de substances étrangères. N'oublions pas que le glycérol comme le glutaraldéhyde sont connus comme agents induisant des **altérations structurelles** sous forme de déplacements de certains constituants (ce qui expliquerait les images de type classique avec LL claire). Les images sans LL distincte pourraient être interprétées comme des zones de JED ayant subi moins d'altérations : état physiologique plus stable donc moins sensible à la pénétration du cryoprotecteur ou à l'action brève du fixateur chimique.

Il serait intéressant d'approfondir ce problème en recherchant d'autres cryoprotecteurs ou fixateurs chimiques.

Si les cryoprotecteurs permettent d'améliorer la qualité de la CF en garantissant une absence de compartiments de ségrégation

dans toute l'épaisseur de l'échantillon, ils ne facilitent certainement pas l'interprétation de la morphologie de la JED qui apparaît comme une structure complexe.

3.2.2.4. Influence du temps de CS

Dans toutes nos expériences précédentes nous avons cryosubstitué nos échantillons d'une manière constante selon le protocole de Goldberg (1986). Dans ce modèle expérimental défendu par tous les partisans de l'**école de Van Harreveld** (tableau 7), les temps de cryosubstitution doivent être longs car le milieu de CS est à base d'acétone, milieu rappelons-le à faible pouvoir de déshydratation (cfr introduction).

Il était intéressant d'essayer de réduire la longueur de ce protocole pour deux raisons majeures : gain de temps (pour examiner les résultats et programmer les expériences ultérieures) et réduction de la consommation d'azote liquide (nécessaire au maintien des basses t° de CS).

Afin de pouvoir établir des comparaisons nous avons conservé le milieu de CS précédemment utilisé (OsO_4 2,5% dans l'acétone) et nous avons cryosubstitué nos échantillons selon le **protocole de Müller** (tableau 7) qui réduit le séjour des échantillons à 183 K (-90°C) à 8 heures.

La première question qui se posait était de savoir si l'acétone allait pouvoir, dans les conditions du protocole de Müller, déshydrater correctement nos échantillons.

Aussi avons-nous cryofixé (V6F6, sans cryoprotection) et cryosubstitué 4 échantillons au cours d'une expérience préliminaire.

Les résultats ont confirmé nos craintes : les spécimens n'ont pas été suffisamment déshydratés, nous avons observé des compartiments de ségrégation importants déjà visibles en MO sur les semi-fines et ce dès le bord d'impact.

Nous avons alors, pour améliorer la capacité de déshydratation du milieu, ajouté à l'acétone un piège moléculaire à eau ainsi que le suggérait Humbel (1984, rapporté par Robards, 1985).

Sans références bibliographiques, nous avons ajouté au jugé deux billes par contenu de 1,5 ml de milieu de CS.

	C F	glycérol	glut-glycérol	glycérol	glut-glycérol
		aspect de type "classique"		aspect de type "Goldberg"	
MEMBRANE PLASMIQUE	-trilaminaire -plaque d'attache relativement continue -implantation des tonofilaments peu nette	-trilaminaire -plaque d'attache constituée de 2 zones: a) zone d'ancrage des tonofilaments : petites formations de taille variable b) zone accolée à la MP formations triangulaires denses			
LAMINA LUCIDA	zone homogène dense et granuleuse sans structure filamenteuse	-bien apparente -contenu granuleux aéré -plaques sous-basales sous forme de trait noir -pas de filament d'ancrage	-zone uniforme -épaisseur variable -contenu dense granuleux -plaques sous-basales sous forme d'un trait noir -pas de filament d'ancrage		
LAMINA DENSA	parfois "nuage plus dense"	-ruban épais dense -contenu granuleux -épaississement sous hémidesmosomes			
LAMINA SUBBASALE	-non distincte	-peu distincte -fibrilles parfois visibles	-non distincte		

tableau 12 : aspects de la JED après CS suivant le protocole de Müller (fig. 38)

Afin de pouvoir nous référer à nos observations précédentes (§ 3.2.2.2. et 3.2.2.3.) nous avons choisi de cryosubstituer des échantillons cryofixés soit sans cryoprotecteurs (6) soit préalablement prétraités au glycérol (6) ou au glut/glycérol (6).

Observations

Nos observations sont résumées dans le tableau 12 et illustrées dans la figure 38.

Commentaires des résultats

Nous avons retrouvé après cette courte CS, dans nos échantillons préalablement cryoprotégés (glycérol ou glut/glycérol) les mêmes images que celles que nous avons obtenues lors des CS longues : aucun compartiment de ségrégation ne s'observe, la morphologie est bien conservée et la JED apparaît indépendamment de sa localisation par rapport au bord d'impact sous deux aspects différents : un aspect "classique" (fig.38B) avec une LL dégagée et LD bien marquée, et un aspect plus dense granuleux (sans LL) semblable au modèle décrit par Goldberg (fig.38C)

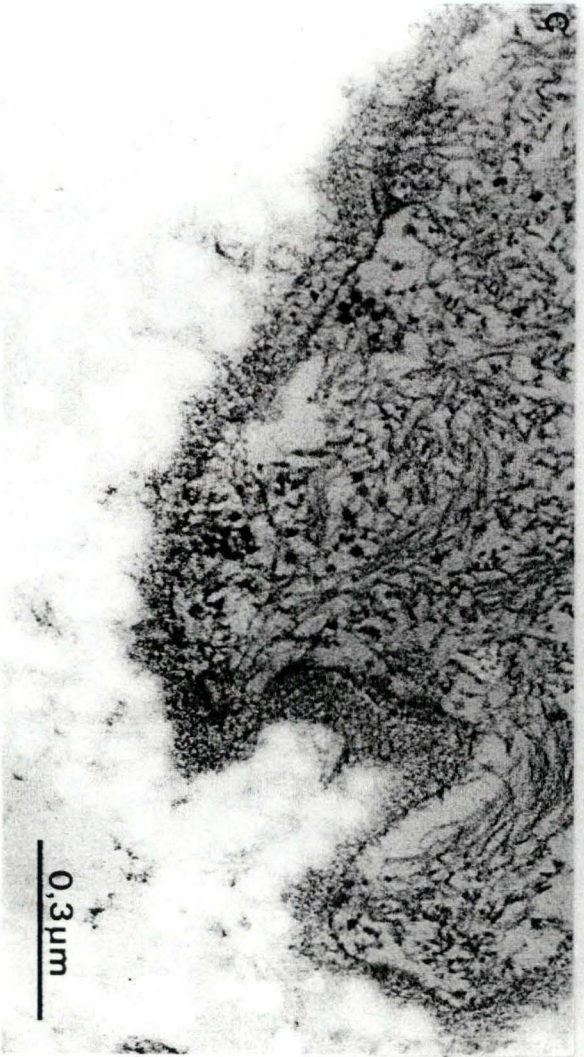
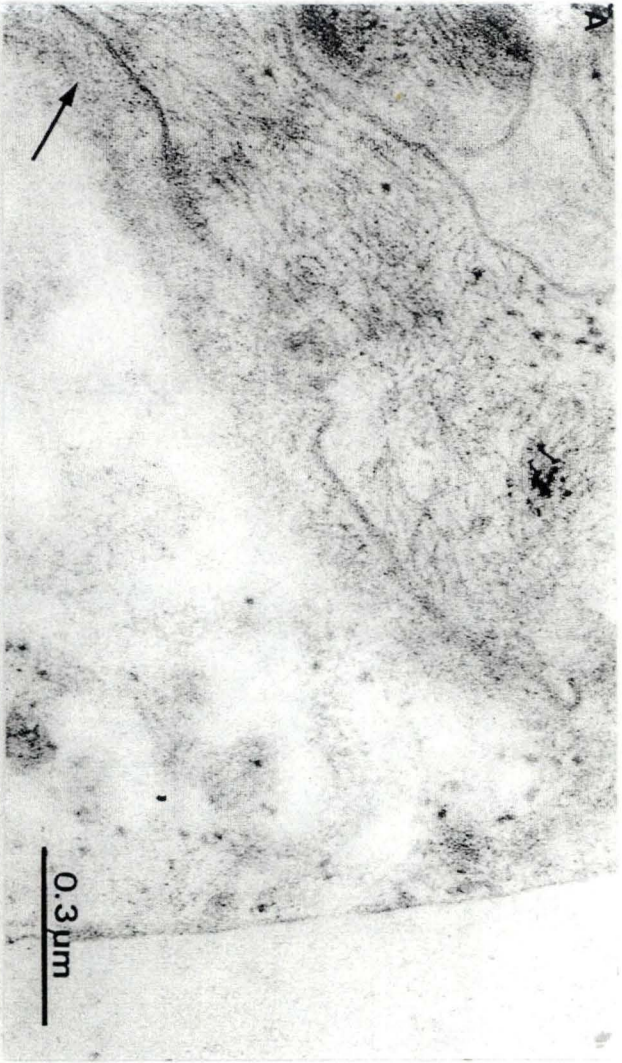
Dans nos échantillons cryosubstitués après CF sans cryoprotection préalable (fig.38A) nous n'avons pas intégralement retrouvé les images observées lors des CS longues.

Les différences (minimes) que nous avons constatées se situent dans la zone correctement cryofixée c-à-d dans les deux premiers μm du bord d'impact.

Si la JED y apparaît toujours sous la MP comme une zone dense de contenu granuleux nous n'avons jamais remarqué de bande noire nette continue assimilable à une LD (tout au plus parfois une densité un peu plus marquée (fig.38A flèche). Par conséquent il est difficile dans ces conditions d'individualiser une LSB. Aucun matériel fibrillaire ne s'observant dans cette bande granuleuse uniforme, nous retrouvons donc ici une image non seulement semblable à celle décrite par Goldberg mais également proche de celle que nous avons signalée dans nos échantillons cryoprotégés.

fig. 38 : Modification des temps de substitution
aspect de la JED après CF et CS (OsO_4 dans
acétone) suivant des **temps courts**

- A : coupe de tissu cryofixé sans prétraitement
JED homogène sans stratification sauf locale
(flèche) (Gross.: 78 000x)
- B : coupe de tissu cryofixé et cryoprotégé au
glycérol aspect de "type classique" de la JED :
une lamina lucida (LL) plus apparente se dessine
(Gross.: 78 000x)
- C : coupe de tissu cryofixé et cryoprotégé au
glycérol aspect de "type Goldberg" de la JED :
sans lamina lucida apparente
(Gross.: 78 000x)



Nous pouvons donc conclure que des CF courtes (protocole Müller) semblent convenir parfaitement pour des échantillons préalablement cryoprotégés puisque nous n'avons observé aucune différence avec les CS longues. Par contre, dans le cas d'échantillons non cryoprotégés les résultats ne sont pas tout à fait identiques. La texture généralement moins dense de la JED dans la zone correctement cryofixée et les légères différences morphologiques observées nous font penser qu'il pourrait y avoir eu une perte ou un déplacement de certains constituants d'une manière plus importante dans les temps de CS longs.

Ceci serait à imputer à l'acétone. Il serait intéressant d'approfondir le problème des pièges moléculaires pour améliorer le rendement de l'acétone (mieux les connaître afin de pouvoir les doser, ...) ou d'essayer d'autres milieux de substitution.

C'est cette dernière idée que nous avons testée dans l'expérience suivante.

3.2.2.5. Influence des différents milieux de substitution

Nous avons essayé au cours de cette expérience d'améliorer la qualité de la CS réalisée en des temps courts en modifiant la composition du milieu de substitution.

Le premier paramètre que nous avons modifié est le solvant de substitution : à l'acétone (additionné de pièges moléculaires) nous avons préféré le **méthanol** dont le pouvoir de déshydratation est nettement supérieur (Humbel, 1986).

Nous avons testé **trois milieux différents** à base de méthanol.

Dans le **premier**, nous avons ajouté de l' OsO_4 pour assurer un bon contraste des tissus - des membranes en particulier - et aussi pour pouvoir établir des comparaisons avec nos expériences précédentes.

Comme **2ième milieu**, nous avons repris la première composition mais en l'enrichissant de l'acétate d'uranyle, contrastant pouvant aussi jouer un rôle de fixateur (Zalokar, 1966).

	OsO ₄ méthanol	OsO ₄ + acétate d'uranyl méthanol	OsO ₄ + acétate d'uranyl + glutaral- déhyde méthanol
CF sans cryoprotection	image cfr CS dans OsO ₄ ACETONE temps longs 3 zones -zone granuleuse -L densa -L subbasale -texture générale granuleuse dense -aucune structure fibrillaire		-meilleur contraste
CF avec prétraitement (glycérol ou glut/glycérol)	deux aspects -"aspect de type classique" -"aspect de type Goldberg" mais, en plus, des filaments d'ancrage et fibrilles d'ancrage parfois visibles		-meilleur contraste -hémidesmosomes plus nets -striation des fibres de collagène apparente

tableau 13 : observations de la JED après variations du milieu de substitution (fig.39 et 40)

Enfin, pour le **3ième milieu** nous avons additionné au mélange précédant du glutaraldéhyde. Ce milieu complexe est en fait celui de Müller (Humbel, 1986)

Dans chacun de ces trois milieux, nous avons, comme dans nos expériences antérieures, cryosubstitué des échantillons préalablement cryofixés, soit sans cryoprotecteur (6) soit après prétraitement au glycérol (6) ou au glut/glycérol (6).

Observations

Nos observations sont résumées dans le tableau 13 et illustrées dans les figures 39 et 40.

Commentaires des résultats

La **première constatation** qui ressort de nos observations est qu'il n'existe pas de grandes différences entre les trois milieux choisis, en ce qui concerne du moins l'aspect de la JED. Nous y retrouvons les mêmes variations liées à la CF que précédemment.

Ainsi dans les échantillons cryofixés sans cryoprotection préalable, nous retrouvons une image de JED dense, de texture granuleuse (fig.39A).

Mais ici elle est à rapprocher non pas du modèle de Goldberg (1986) mais plutôt de celui que nous avons décrit précédemment dans les spécimens cryosubstitués à l'acétone pendant des temps longs (3.2.2.2.). Trois zones denses s'y distinguent : une "zone granuleuse" (ex-LL), située directement sous la membrane plasmique, une LD plus marquée et une LSB en continuité avec le tissu conjonctif environnant. Aucune structure fibrillaire ne s'y dessine (fig.39A).

Nous observons donc ici plus de détails que lors des CS à l'acétone en des temps courts.

Cette remarque s'applique également pour les échantillons cryoprotégés. Si nous y retrouvons les deux aspects de la JED (aspect de "type classique" et de "type Goldberg") (fig.39B, 39C, 40B et 40C), certains détails ressortent davantage p.ex. les filaments d'ancrage (particulièrement dans les zones sous-

fig. 39 : Modification du milieu de substitution
aspect de la JED après CF (V6F6) CS (OsO₄ dans
méthanol) suivant des **temps courts**

- A : coupe de tissu cryofixé sans prétraitement.
L'aspect de la JED correspond à celui de la
fig. 34A. La JED se présente comme une zone
dense à l'intérieur de laquelle une bande
plus foncée (LD ?) délimite une zone
granuleuse (ZG) côté épiderme et une zone
dense (LSB ?) côté derme en continuité avec
la substance fondamentale du derme
(Gross.: 78 000x)
- B : coupe de tissu cryofixé après cryoprotection
au glut/glycérol: aspect de "type classique" de
la JED, lamina lucida (LL) apparente. On
distingue les filaments d'ancrage (fla), fibrilles
d'ancrage (fba) et microfibrilles (mf)
(Gross.: 78 000x)
- C : coupe de tissu cryofixé après cryoprotection
au glycérol : aspect "de type Goldberg" de la
JED, lamina lucida non apparente. On
distingue les fibrilles d'ancrage (fba) et
les microfibrilles (mf)
(Gross.: 78 000x)

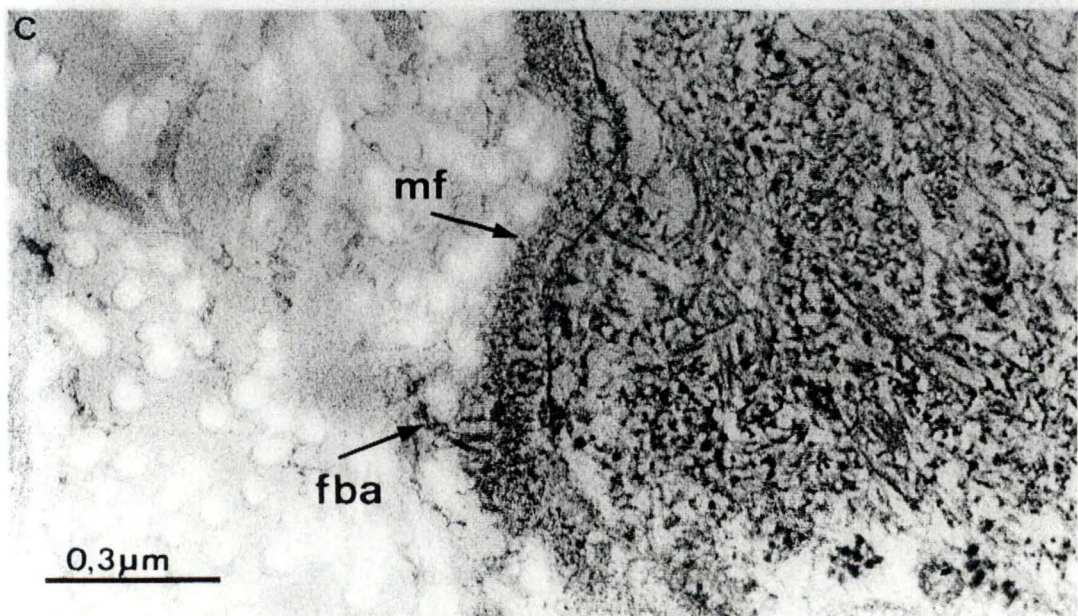
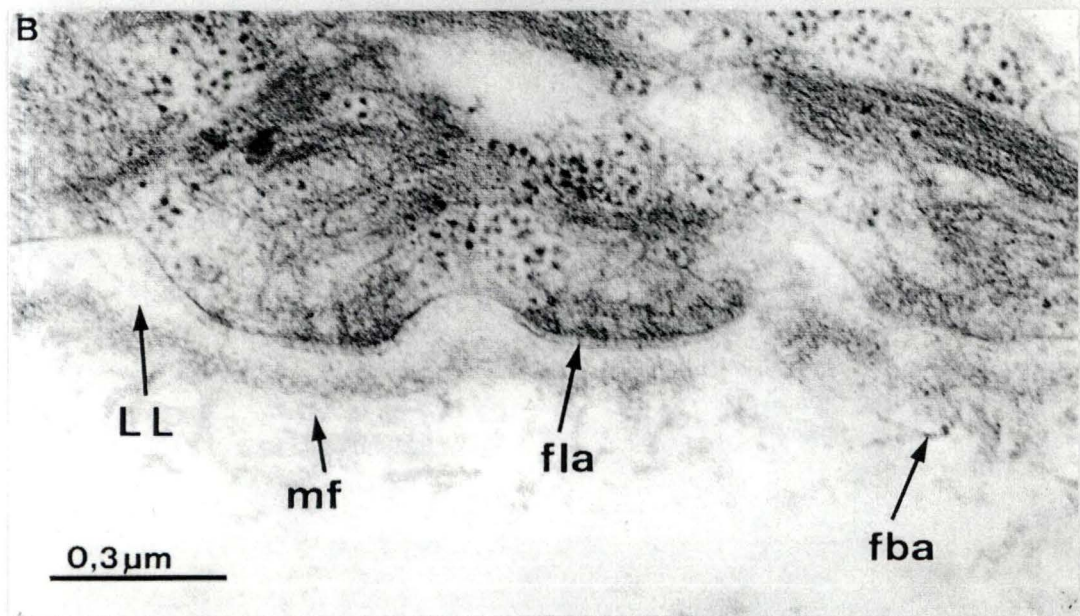
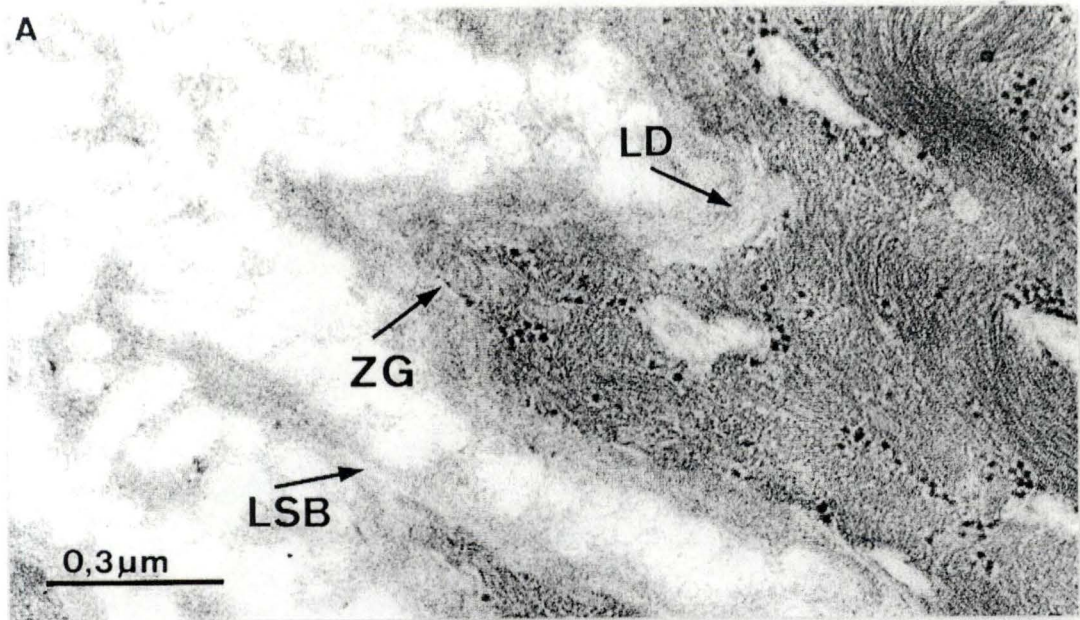
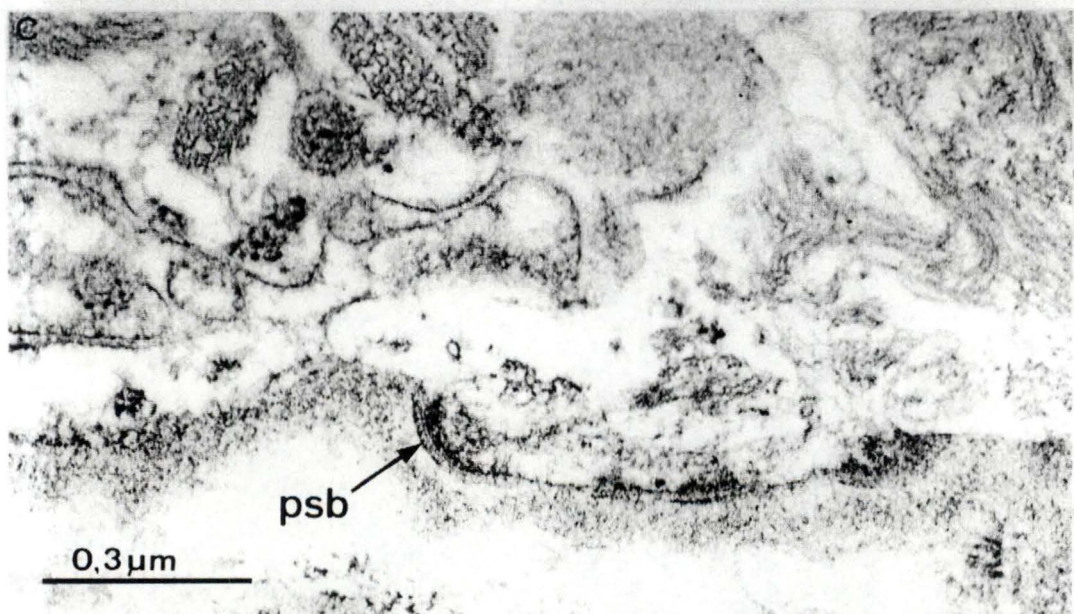
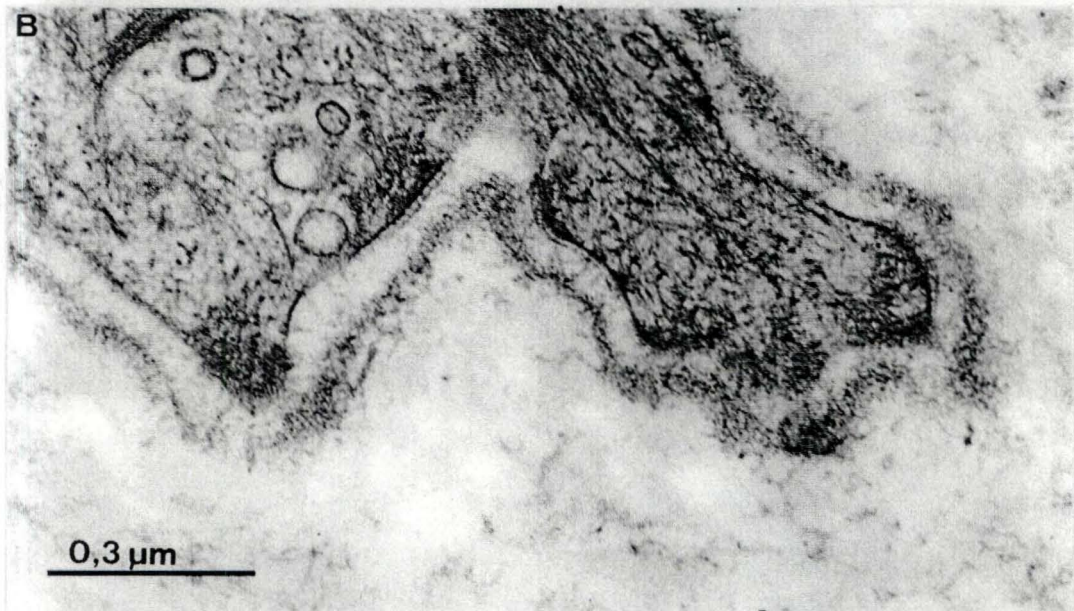
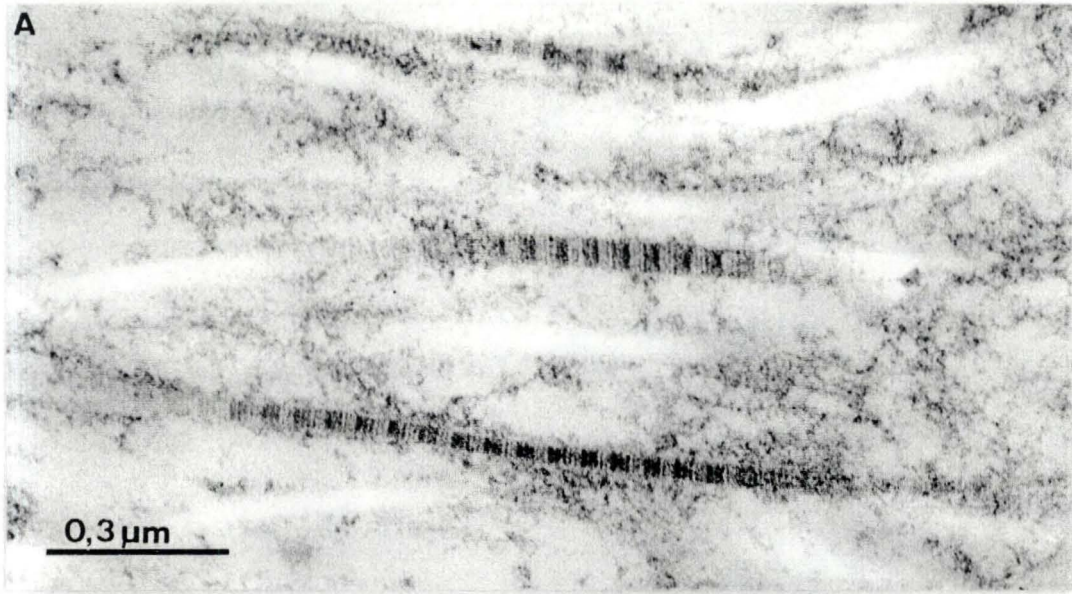


fig.40 : Modification du milieu de substitution
échantillons cryofixés et cryosubstitués en des **temps courts** dans du **milieu de Müller** (glut/OsO₄/acétate d'uranyl dans méthanol)

A : fibres de collagène à striation bien apparente
(Gross.: 78 000x)

B : aspect de la JED d'un tissu cryoprotégé au glut/glycérol. Aspect de "type classique" : lamina lucida apparente (Gross.: 78 000x)

C : aspect de la JED sur coupe de tissu cryoprotégé au glut/glycérol. Aspect de "type Goldberg" : la JED ne présente pas de stratification. La plaque sous-basale (psb) est particulièrement bien visible (Gross.: 78 000x)



hémidesmosomiale, fig.39B,) et les fibrilles d'ancrage (fig.39B). Nous n'avons jamais pu les visualiser aussi nettement lors de CS en temps courts dans l'acétone. Le méthanol semble donc mieux conserver pour des temps courts certains constituants que l'acétone qui lui nécessite des CS longues pour obtenir des résultats équivalents.

Que faut-il penser de l'amélioration du milieu de substitution par l'**acétate d'uranyle** sur l'aspect de la JED ? Nous n'avons vu pour notre part aucune différence : pas la moindre augmentation du contraste du tissu.

Hayat (1970) signale que l'acétate d'uranyle ne renforce le contraste d'un tissu (traité classiquement) que s'il suit une fixation au glut/OsO₄. Cette hypothèse semble se confirmer dans nos tissus cryosubstitués puisque effectivement nous avons constaté une meilleure définition dans les spécimens cryosubstitués avec "**le milieu de Müller**" qui contient en plus de l'acétate d'uranyle et l'OsO₄ du glutaraldéhyde. L'exemple le plus frappant se remarque au niveau des fibres de collagène (fig.40A). Alors que dans toutes les autres combinaisons elles apparaissent en "négatif" (rubans blancs en coupe longitudinale, fig.34A ou ronds blancs en coupe transversale fig.39C, telles que les avait observées Goldberg, 1984), ici non seulement elles sont bien contrastées mais les détails de leur striation se dessinent clairement (fig.40A). De même, au niveau de la JED, la plaque sous-basale ressort davantage (fig.40C, flèche).

Nous concluons donc en recommandant pour des temps des CS courtes le "milieu de Müller".

3.3. Caractérisation immunocytochimique de la JED

Préliminaires : a) **choix de la méthode**

Nous avons voulu compléter nos observations ultrastructurales de la JED par une caractérisation immunocytochimique. Il était en effet tentant d'essayer de préciser la localisation de quelques uns de ses constituants et surtout de vérifier l'hypothèse de Goldberg sur l'existence de déplacements éventuels de certains d'entre eux lors d'une fixation inadéquate.

Dans ce but, nous avons choisi dans le cadre de ce mémoire de réaliser des marquages sur coupes ultra-fines (marquage "postembedding") par méthode indirecte utilisant de l'or colloïdal couplé à un anticorps secondaire pour amplifier le signal antigénique.

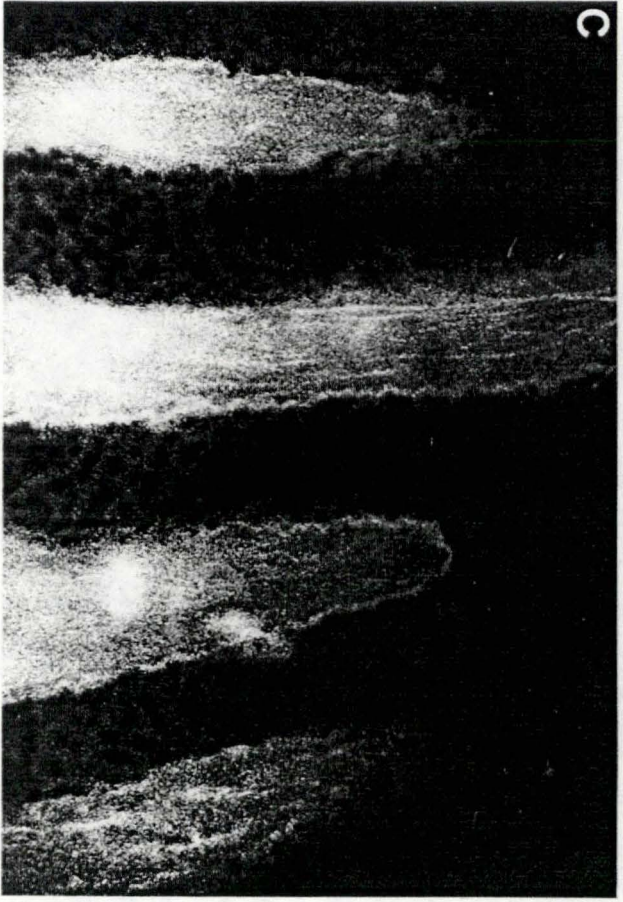
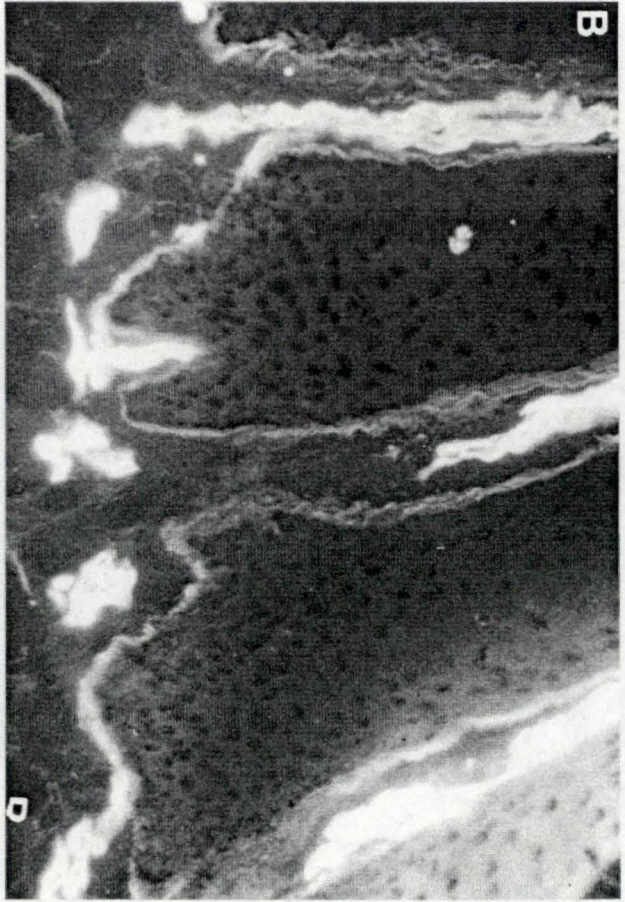
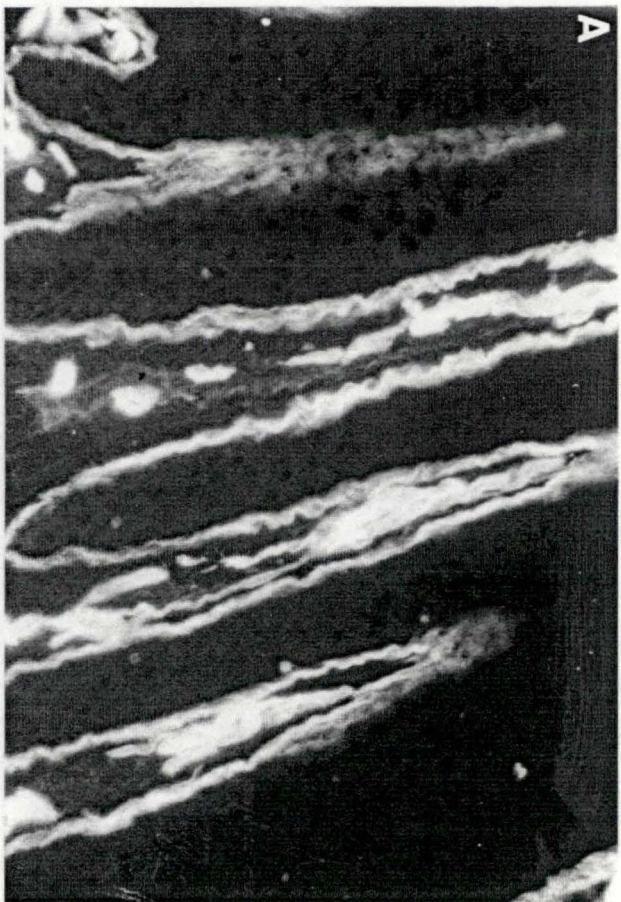
Afin de juger de l'impact des techniques de CF et CS sur la conservation de l'antigénicité de la JED, il fallait pouvoir disposer d'images de référence : aussi avons-nous commencé par mettre au point des marquages immunocytochimiques sur coupes de tissus classiquement fixés et enrobés.

b) **choix des constituants à marquer**

Dans le cadre de ce mémoire, nous ne pouvions nous permettre d'essayer de localiser la localisation qu'un seul constituant de la JED.

Aussi, avant de mettre au point les marquages sur ultra-fines nous avons réalisé un test préliminaire. Nous avons observé en MO, soit sur des coupes à congélation (cryostat Reichert) (fig.41) soit sur des coupes de tissus préalablement fixés au BHAS et inclus au Surgipath, les marquages de trois composants importants de la JED: la laminine, le collagène IV et le protéoglycane héparane sulfate (par méthode indirecte utilisant l'isothiocyanate de fluorescéine).

Nous nous sommes ainsi aperçus que, contrairement à ce qui se passe chez l'homme (Dubois, 1989), la laminine (fig.41A) marque beaucoup plus intensivement chez les Bovidés que le collagène IV (fig.41B) et que les marquages de l'héparane sulfate étaient toujours très discrets (fig.41C).



Il s'agit peut-être d'une différence spécifique qui mériterait une étude approfondie. Pour une première mise au point, nous avons donc opté pour le constituant apparemment le plus abondant, **la laminine**, étant donné que les signaux antigéniques sont souvent fortement affaiblis dans les techniques en "postembedding".

Une 2^{ème} raison nous a confirmé dans notre choix : la localisation de la laminine au sein de la JED étant fort controversée dans la littérature (§1.5.3.2.) il était intéressant de résoudre ce problème.

c) choix des milieux d'inclusion

Afin d'optimiser les marquages nous avons opté pour des **résines acryliques hydrophiles** qui, parce qu'elles autorisent des déshydratations incomplètes et ne créent que peu de liens avec le tissu, respectent davantage l'antigénicité de ce dernier que les résines époxy (Bendayan, 1987).

Parmi les différentes résines acryliques existant sur le marché, nous avons retenu le **Lowicryl K4M** et le **LR Gold** car la particularité de ces 2 résines est de se polymériser à basse t° (sous UV), ce qui les rend particulièrement intéressantes pour le traitement des tissus congelés (Acetarin, 1986)

Pourquoi deux résines ? Nous nous devions de tester le K4M car la plupart des marquages réalisés sur des constituants de la JED (sur des tissus fixés classiquement) ont été faits dans cette résine. Malheureusement la manipulation du K4M est très délicate (Hobot, 1989), non seulement sa polymérisation pose de nombreux problèmes (Bendayan, 1987), mais la coupe est aussi souvent difficile (pas de rubans, p.ex.). C'est pourquoi nous avons à côté du K4M aussi testé le LR Gold apparemment plus facile à manipuler. Cette résine récemment apparue sur le marché est notamment aussi recommandée par Causton (1984) pour sa plus grande stabilité sous les électrons.

fig.42 : marquage immunocytochimique (post-embedding)
anti-laminine à l'or colloïdal au niveau
d'échantillons inclus en LR Gold (TC)

A : marquage réalisé avec une dilution de 1/10 de
l'Ac anti-laminine (Gross.:25 000x)

B : marquage réalisé avec une dilution de 1/20 de
l'Ac anti-laminine (Gross.:43 200x)

C : marquage réalisé avec une dilution de 1/50 de
l'Ac anti-laminine (Gross.:62 500x)

D : témoin (Gross.:62 500x)

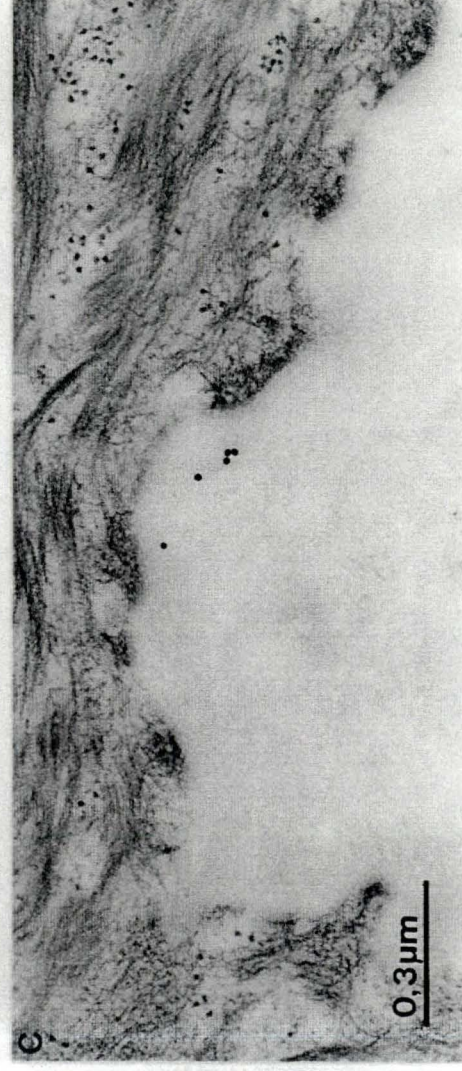
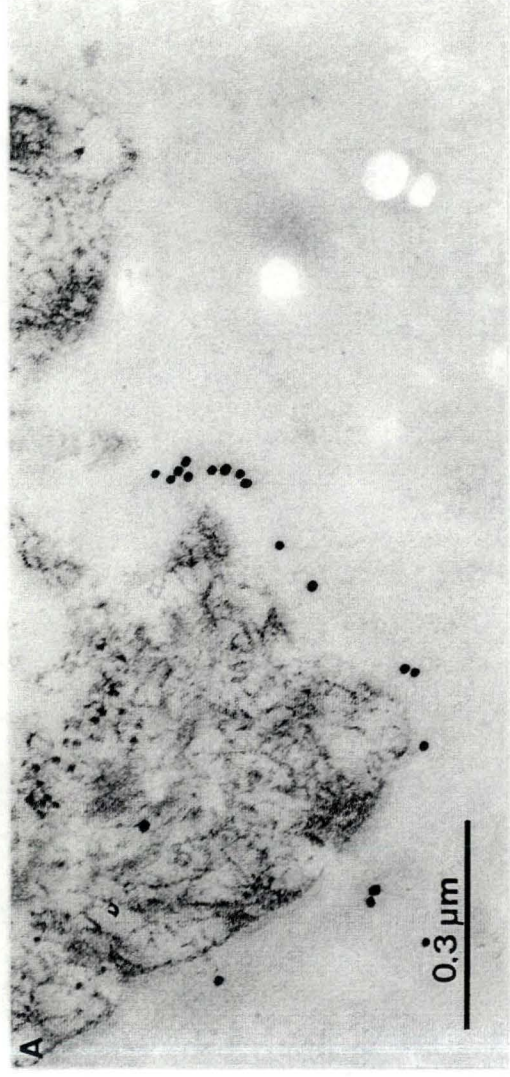
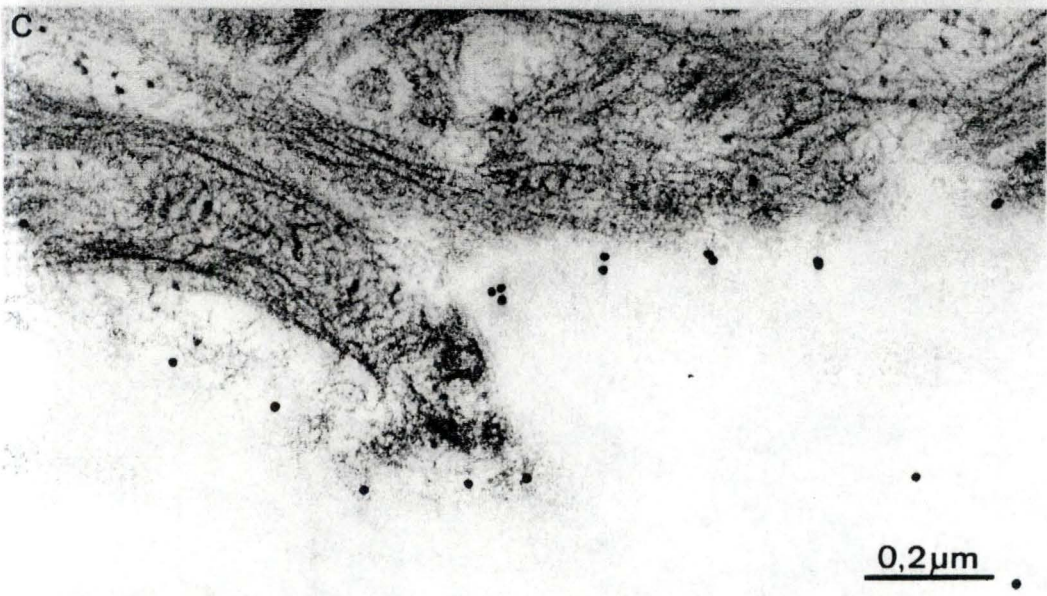
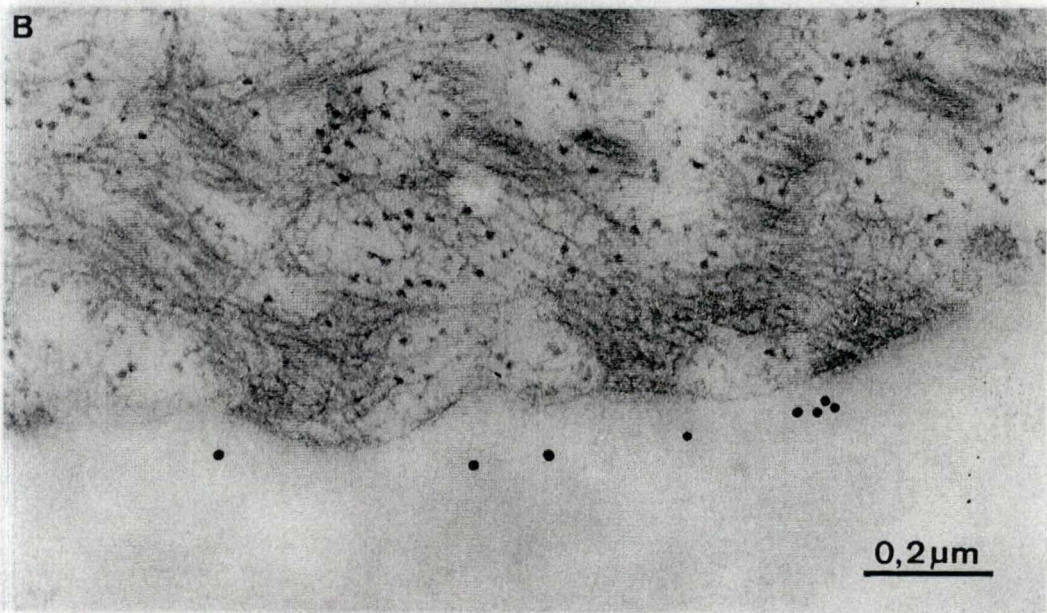
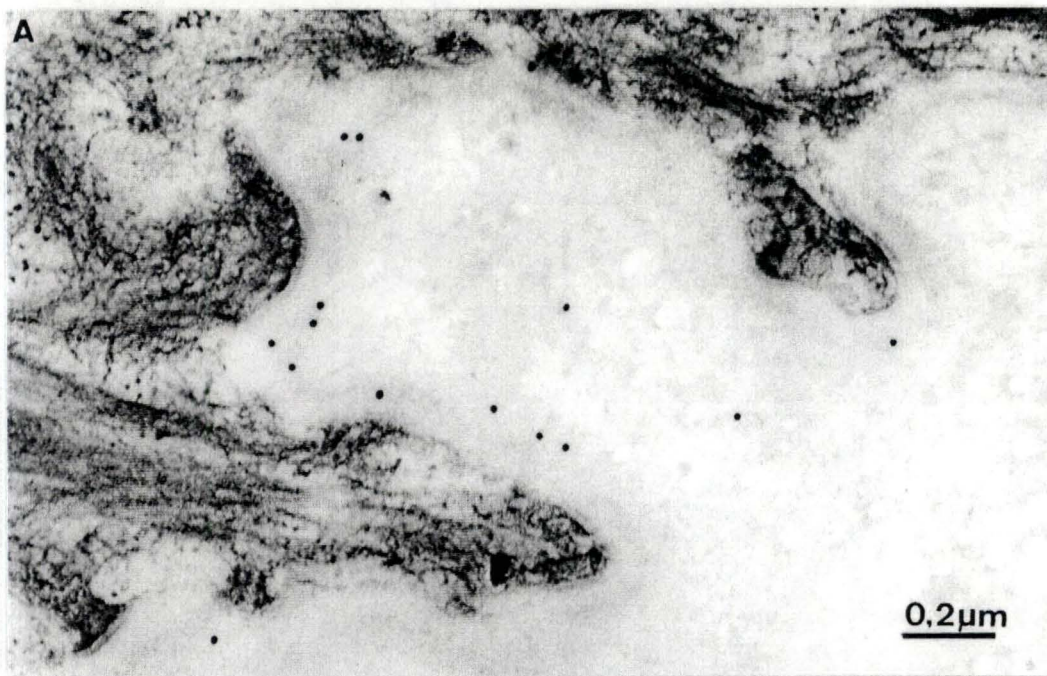


fig.43 : marquage immunocytochimique (post-embedding)
anti-laminine à l'or colloïdal au niveau de la JED
d'échantillons inclus en LR Gold (TC). Marquages
réalisés avec une dilution de 1/20 de l'Ac anti-
laminine après attaque de la coupe

A : attaque à la pepsine, 30 min (Gross. : 62 500x)

B : attaque à l'HCl 0,01N, 30 min (Gross. : 85 000x)

C : attaque à l'HCl 0,1N, 30 min (Gross. 85 000x)



3.3.1. Aspects après technique classique

Ainsi que nous venons de le préciser, nous avons commencé par mettre au point des marquages anti-laminine sur des tissus techniques classiquement.

Avant d'être inclus en LR Gold ou en K4M, ces tissus ont bien sûr dû être fixés. Nous avons choisi une fixation au paraformaldéhyde souvent utilisé dans des études immuno-cytochimiques (Newman, 1984; Laurie, 1980). L'intérêt principal de ce fixateur réside dans son faible pouvoir dénaturant des sites antigéniques (Hayat, 1970) et dans son absence d'interférences avec les résine choisies lors de la polymérisation (contrairement à l'OsO₄ p.ex., Bendayan, 1983).

Nos marquages ont été réalisés d'après le protocole général proposé par la firme Janssen (1989) auquel nous avons apporté quelques modifications (cfr. tableau 5).

Ainsi p.ex., nous avons préféré changer d'agent saturant (substance utilisée pour éviter les fixations aspécifiques des anticorps). Nous avons remplacé la Bovine Serum Albumine (BSA) par l'ovalbumine car la BSA donne une image voilée du tissu lors de l'observation au MET (figures non illustrées).

Observations

Nos observations sont illustrées dans les figures 42 à 45

Commentaires des résultats

Marquage en LR Gold (fig.42 et 43)

Nous avons commencé par mettre au point nos marquages sur les coupes de tissus inclus en LR Gold, la qualité de ces dernières était nettement supérieure à celle des tissus inclus en K4M (coupes homogènes et morphologie bien conservée, fig.42).

Dans un premier temps nous avons recherché la **bonne dilution de l'anticorps primaire** (Ac anti-laminine). Nous avons ainsi

testé la dilution de 1/20 (fig.42B) recommandée par la firme Organon et la dilution de 1/50 (fig.42C) déjà utilisée en MO. Un témoin a été chaque fois réalisé parallèlement en omettant l'Ac primaire et en le remplaçant par du sérum de lapin normal (fig.42D).

S'il existe un léger marquage à la dilution 1/20 (fig. 42B), il se révèle très discret. Quant au marquage à 1/50, il est quasi nul. Seules quelques billes d'or s'observent localement (fig.42C). C'est la raison pour laquelle nous avons essayé **d'intensifier la réponse antigénique.**

Nous avons réalisé trois tests :

1) nous avons **diminuer la dilution de l'Ac primaire** (fig.42A) à 1/10 en respectant le même protocole. Le résultat est nettement meilleur, le marquage devient plus intense mais reste local, ainsi que le montre la figure 42A.

2) pour suivre les conseils de Bendayan (1983) qui préfère ne pas jouer sur la dilution des Ac conduisant généralement, à son avis, à une augmentation du bruit de fond (et à un gaspillage des Ac), nous avons **augmenté le temps de contact** Ac(dilution 1/20)-antigènes (1 nuit à 4 °C et 2 heures à 37 °C, figures non illustrées). Nous avons, dans les deux cas, constaté une réponse moins importante que celle obtenue avec la dilution 1/10 et une augmentation du bruit de fond surtout lors du marquage à chaud.

3) nous avons également essayé d'**attaquer** les coupes par des agents "etchants" pour dégager les sites antigéniques (en conservant la dilution 1/20 pour l'Ac primaire).

Nous avons ainsi soumis nos coupes à la pepsine, enzyme protéolytique recommandée par Barsky (1984) pour la révélation des constituants de la membrane basale sur coupes déparaffinées en MO. Nous avons constaté (fig.43A) une nette amélioration de la réponse antigénique. Sans avoir fait d'étude quantitative, nous pouvons estimer par nos observations que ce marquage est comparable à celui obtenu sans etching avec des dilutions de moindre importance de l'Ac primaire (comparez les figures 42A et 43A). Il reste toujours local. Nous nous sommes alors posés la question de savoir si le renforcement du marquage résultait de l'action même de l'enzyme (Doerr-Schott, 1989) ou plutôt de l'HCl contenu dans la solution de pepsine à raison de 0,01 N. Nous

fig.44 : marquage immunocytochimique (post-embedding)
anti-laminine à l'or colloïdal au niveau
d'échantillons inclus en K4M (TC)

A : marquage réalisé avec une dilution 1/20 de
l'Ac anti-laminine (Gross. 43 200x)

B : marquage réalisé avec une dilution 1/50 de
l'Ac anti-laminine (Gross.60 000x)

C : témoin (Gross.: 15 600x)

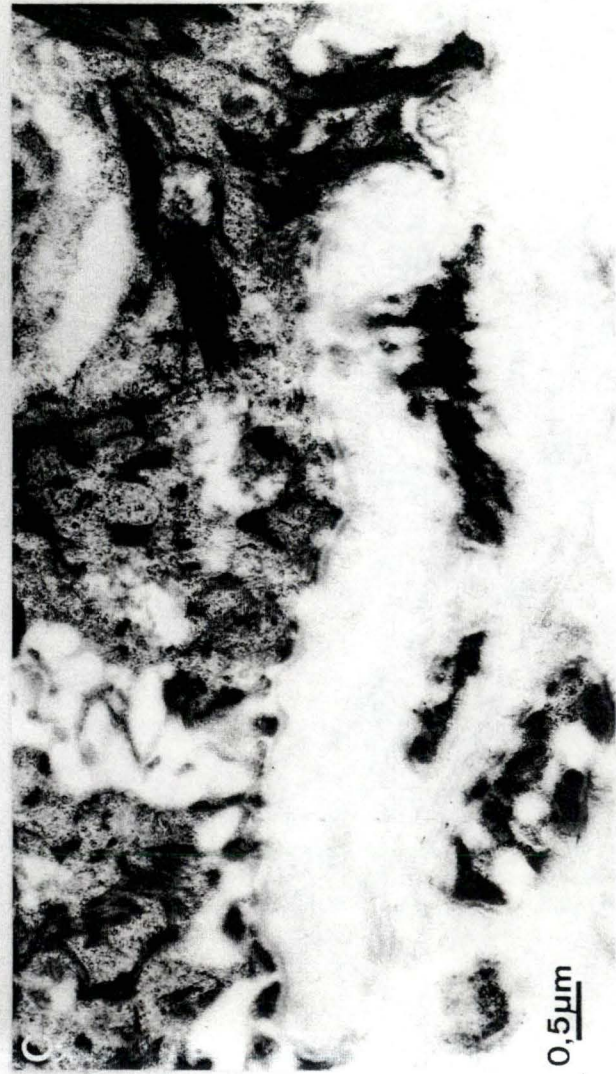
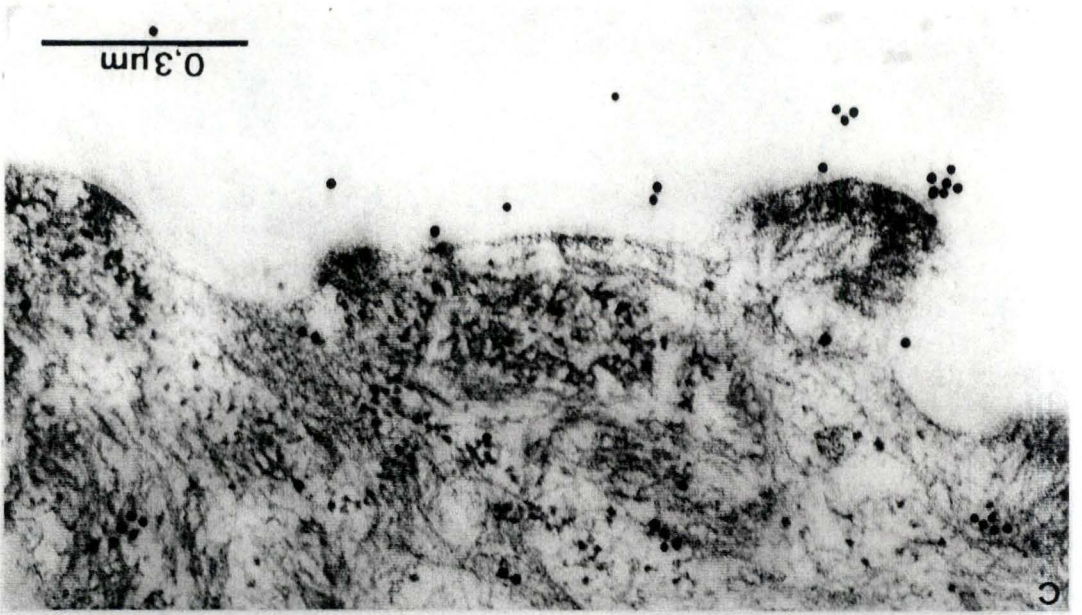
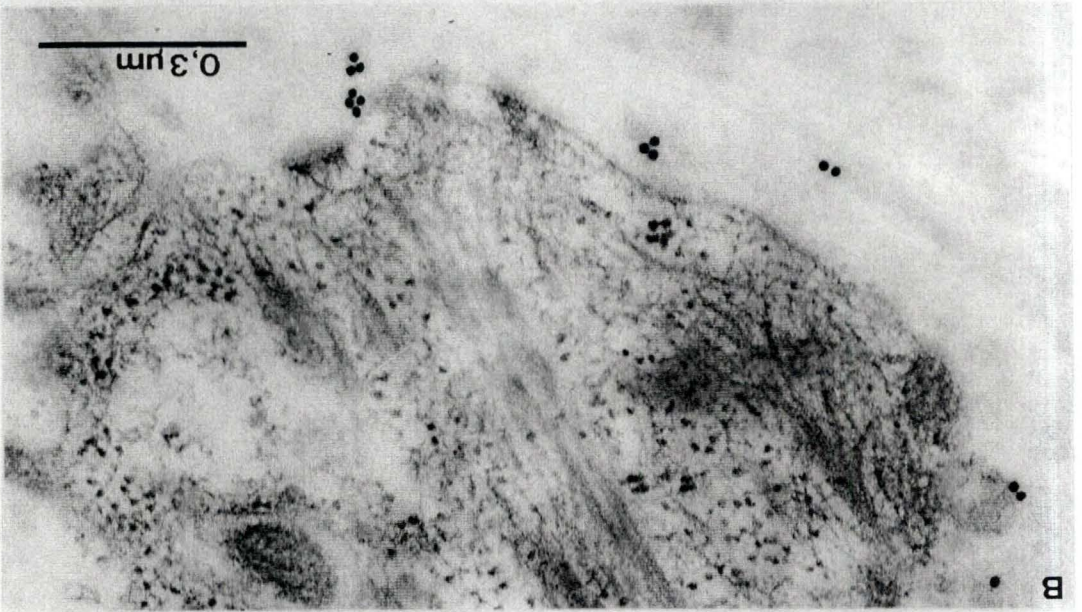
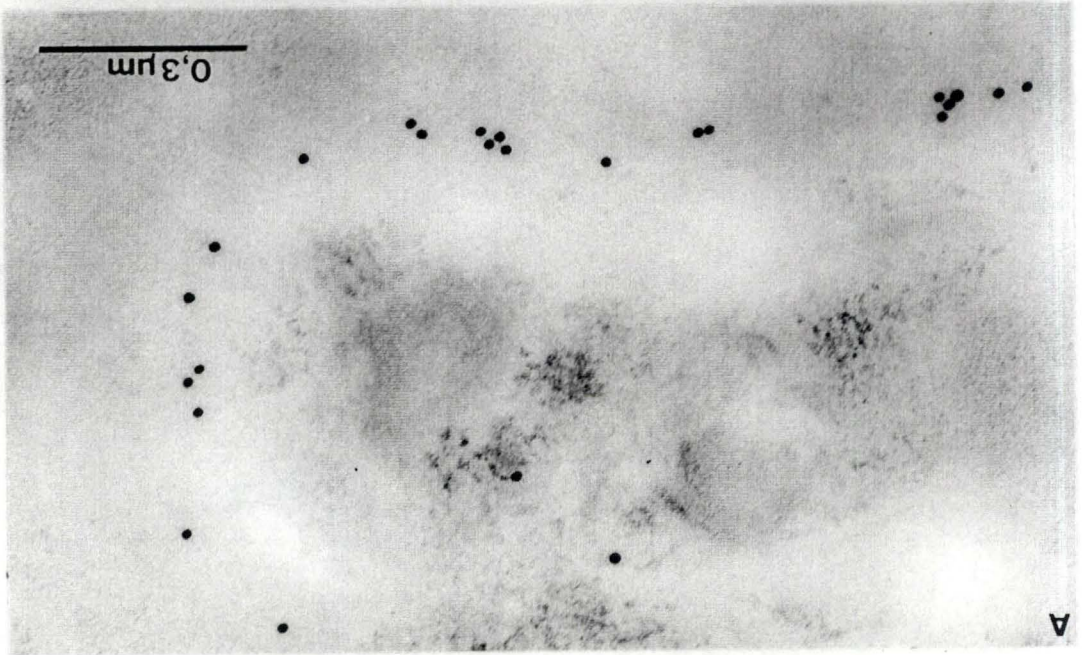


fig.45 : marquage immunocytochimique (post-embedding)
anti-laminine à l'or colloïdal au niveau de la JED
d'échantillons inclus en K4M (**TC**). Marquages
réalisés avec une dilution de 1/20 de l'Ac anti-
laminine après attaque de la coupe

A : attaque à la pepsine, 30 min (Gross.: 85 000x)

B : attaque à l'HCl 0,01N, 30 min (Gross.: 85 000x)

C : attaque à l'HCl 0,1N, 30 min (Gross. 85 000x)



avons alors attaqué nos coupes avec de l'HCl 0,01 N (fig.43B) et 0,1 N (fig.43C). Nous n'avons pas obtenu une intensification du signal antigénique mais au contraire une augmentation du bruit de fond et un gommage relatif des structures histologiques. Il ressort donc de ce petit test que c'est bien l'enzyme qui permet de dégager les sites antigéniques masqués probablement à la fois par le fixateur et par la résine.

Marquage en K4M (fig.44 et 45)

Nous avons également réalisé les mêmes tests sur des coupes de tissus inclus en K4M : dilutions (fig.44) et attaques (fig.45)

Les conclusions sont comparables : les meilleurs marquages s'observent après attaque à la pepsine. La réponse antigénique nous paraît cependant à première vue (estimation purement qualitative) légèrement améliorée car les billes d'or se retrouvent tout au long de la JED et non plus localement. Ceci pourrait s'expliquer par une pénétration (donc attaque) plus importante de l'enzyme dans le tissu ce qui permettrait de dégager davantage d'épitopes (résine moins résistante à l'enzyme). Nous nous basons pour émettre cette hypothèse sur l'aspect fortement abîmé du tissu (fig.45A) : plus aucune structure histologique ne s'y reconnaît, la JED par exemple, est tout à fait "fantomatique". Remarquons qu'un tel marquage, même s'il est amélioré, n'apporte plus beaucoup de renseignements topographiques. Il nous est impossible sur la figure 45A de localiser avec précision l'emplacement de la laminine.

Il est évident qu'il faut être très prudent dans l'interprétation de ces résultats, certaines étapes du protocole expérimental mériteraient d'être revues et approfondies afin d'optimiser les marquages. Ainsi, d'autres fixateurs comme le paraformaldéhyde-lysine-periodate (McLean, 1974) ou des fixateurs à base d'acide picrique (Hisano, 1984) permettraient peut-être d'améliorer le signal antigénique. En effet, Puchtler (1985) contrairement à Newman (1984) déconseille l'emploi du paraformaldéhyde lors de la mise en évidence de la laminine : ce

fixateur induirait pour cet auteur une importante destruction des sites antigéniques.

Ainsi que dans toutes les techniques de post-embedding, le masquage des épitopes par la résine ne doit pas non plus être négligé. Il serait intéressant de tester d'autres agents etchant comme le borohydrure de sodium (Laurie, 1984), le méthoxyde de sodium (Causton, 1984) ou encore le métaperiodate de sodium (Bendayan, 1983).

De ces premiers résultats, nous pouvons quand-même observer que le marquage de la laminine se situe pratiquement toujours au niveau de la LD ainsi que l'a signalé Laurie (1982), et non au niveau de la LL comme cela est plus classiquement admis : Claudy (1987), Briggaman (1982). Ces données contradictoires pourraient s'expliquer par des origines spécifiques (rat, souris,...) ou anatomiques (rein, pancréas,...) différentes des membranes basales étudiées et par des différences dans le traitement du tissu lors du marquage (fixation, méthode de révélation,...).

Nous ne pouvons dans le cadre de ce mémoire trancher cette question qui nécessiterait des études plus approfondies.

3.2.2. Aspects après CF et CS

Afin de garantir au maximum l'antigénicité des tissus, nous avons cryosubstitué nos échantillons préalablement cryofixés, dans du méthanol pur (en suivant le protocole de Müller). Le méthanol agirait en effet surtout comme déshydratant et moins comme fixateur (Seinbrecht, 1987).

Le protocole de marquage a été identique à celui effectué sur les coupes de tissus techniqués classiquement (§ 3.2.1.) : nous avons travaillé d'office avec une dilution de 1/20 de l'Ac primaire et notre attaque du tissu a été réalisée à la pepsine.

Nous n'avons, dans le cadre de ce mémoire, pu inclure que neuf échantillons en LR Gold et neuf autres en K4M. Dans chacune des deux séries, nous avons cryofixé trois échantillons frais, trois cryoprotégés par le glycérol et trois autres par le glut/glycérol afin de vérifier l'impact éventuel de la cryoprotection sur l'antigénicité.

fig.46 : marquage immunocytochimique (post-embedding)
anti-laminine à l'or colloïdal au niveau de la
JED d'échantillons **cryofixés et cryosubstitués**
avant inclusion en LR Gold

A : marquage avec la dilution 1/20 de l'Ac anti-
laminine sur coupe de tissu cryofixé sans
cryoprotection (Gross.: 85 000x)

B : marquage avec la dilution 1/20 de l'Ac anti-
laminine sur coupe de tissu cryofixé après
cryoprotection (glycérol) (Gross.: 85 000x)

C : marquage avec la dilution 1/20 de l'anti-
laminine sur coupe de tissu cryofixé après
cryoprotection (glut/glycérol), attaquée à la
pepsine (Gross.: 85 000x)

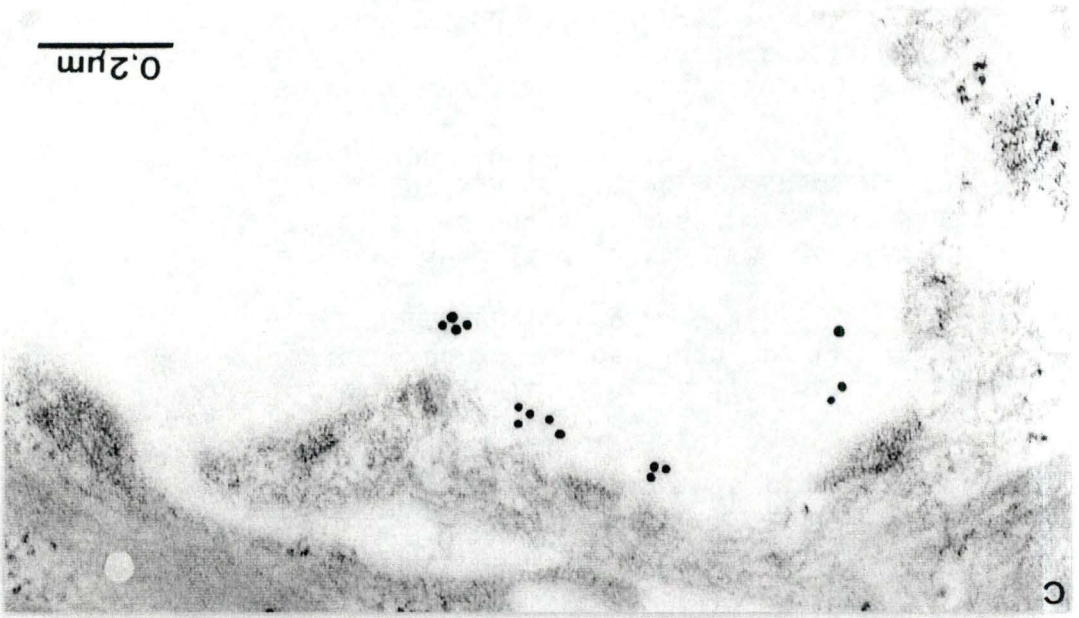
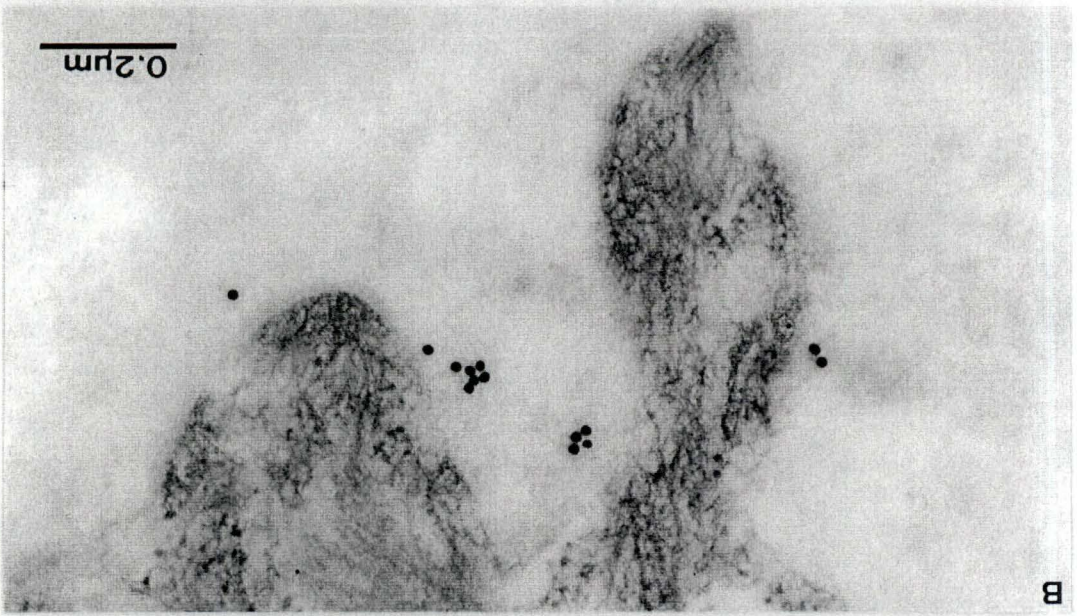
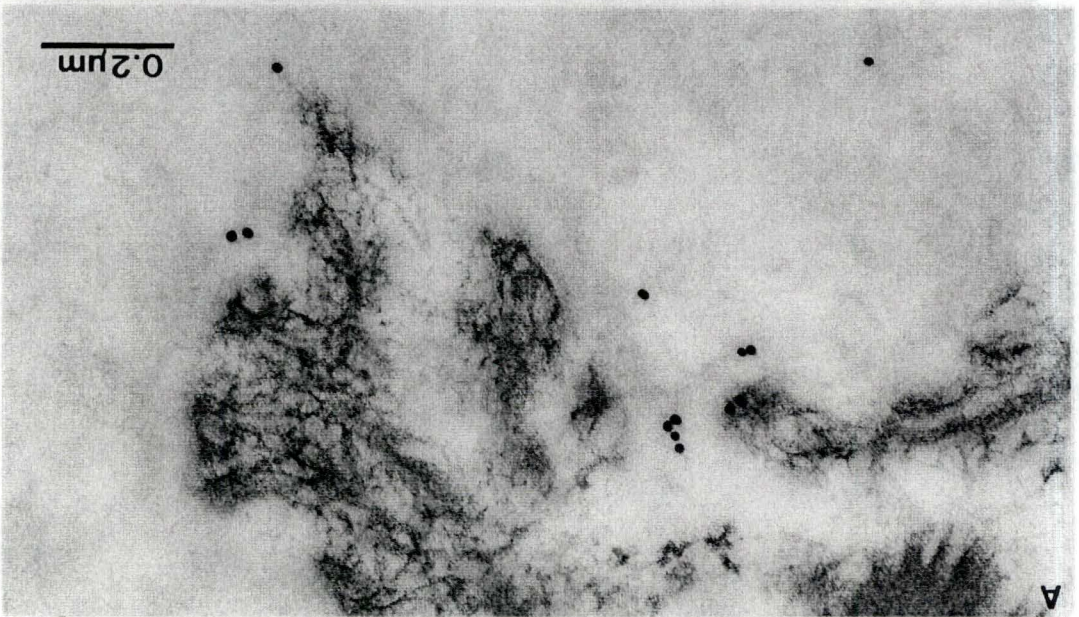
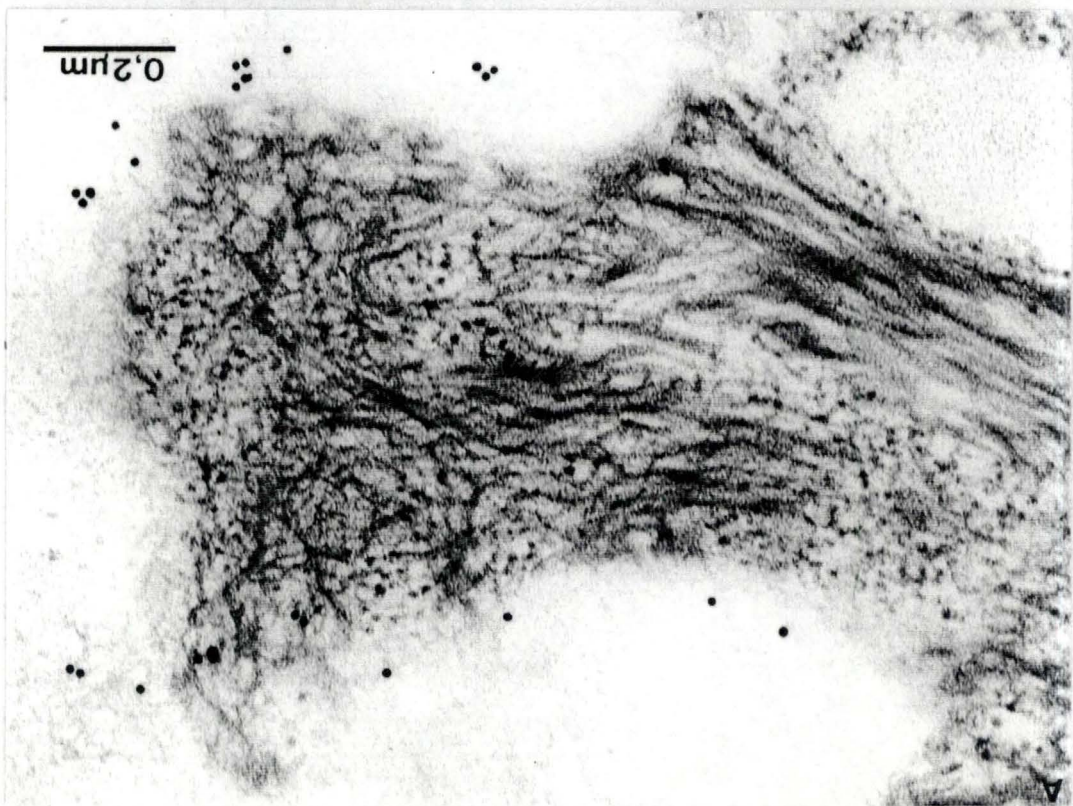
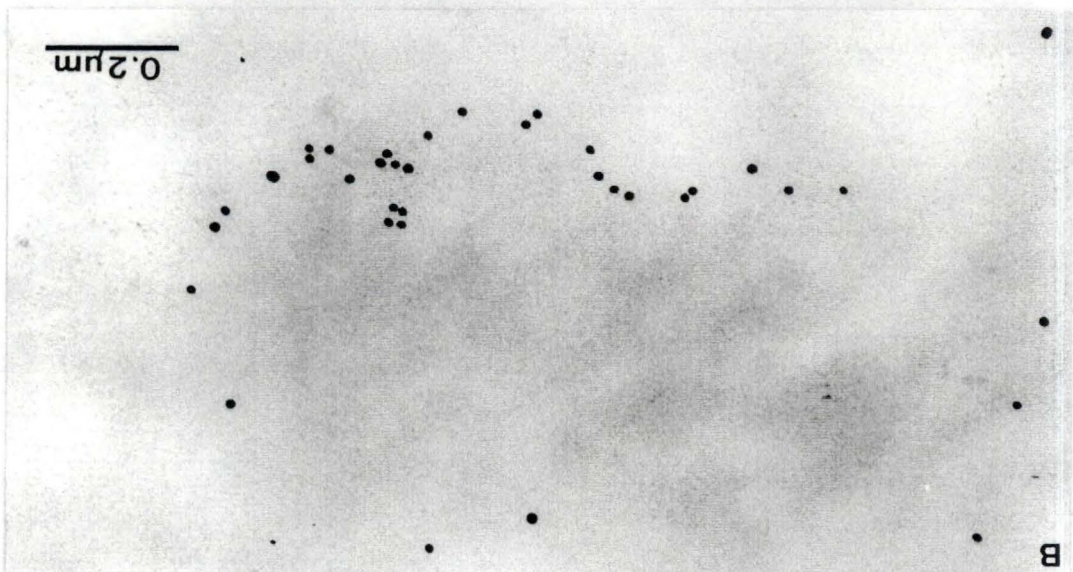
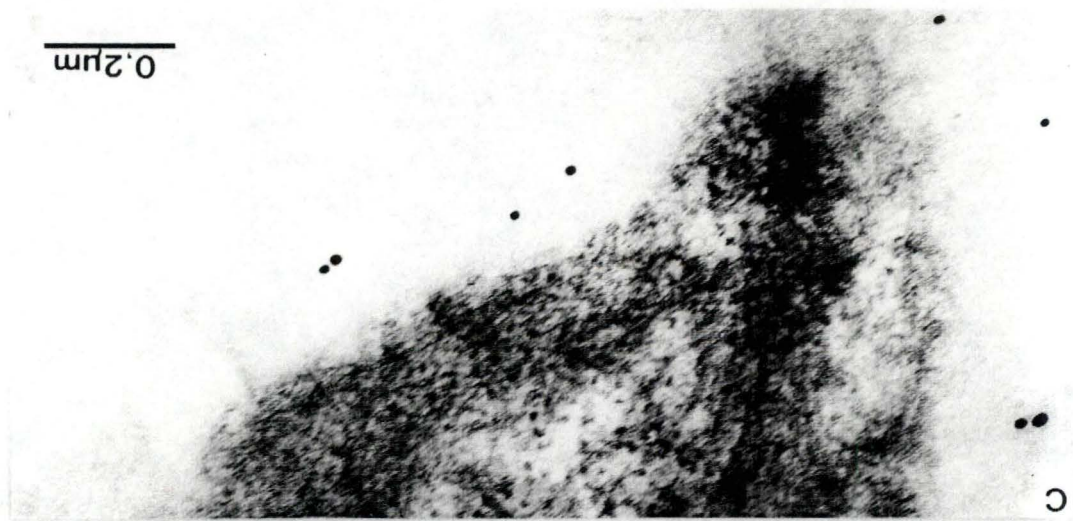


fig.47 : marquage immunocytochimique (post-embedding)
anti-laminine à l'or colloïdal au niveau de la
JED d'échantillons **cryofixés et cryosubstitués**
avant inclusion en K4M

A : marquage avec la dilution 1/20 de l'Ac anti-
laminine sur coupe de tissu cryofixé sans
cryoprotection (Gross.: 85 000x)

B : marquage avec la dilution 1/20 de l'Ac anti-
laminine sur coupe de tissu cryofixé sans
cryoprotection, attaquée à la pepsine
(Gross.: 85 000x)

C : marquage avec la dilution 1/20 de l'anti-
laminine sur coupe de tissu cryofixé après
cryoprotection (glut/glycérol), attaquée à la
pepsine (Gross.: 85 000x)



Avant marquage, chaque bloc a été soumis à un contrôle ultrastructural sur ultra-fine.

Marquage en LR Gold (fig.46)

Le contrôle histologique effectué sur les échantillons cryofixés sans prétraitement nous a montré une préservation morphologique insuffisante (existence de compartiments de ségrégation sur l'ensemble de la coupe, absence de zones de JED correctement cryofixées c-à-d aspect dense).

Le même contrôle au niveau des ultra-fines des tissus cryoprotégés nous a également révélé une image peu satisfaisante, quoique améliorée par rapport aux précédentes.

Ceci est évidemment à imputer à des problèmes techniques se situant tant au niveau de la CF elle-même qu'au niveau de l'infiltration et de la polymérisation de la résine.

N'oublions pas que pour faire infiltrer correctement le LR Gold dans les échantillons cryosubstitués, il faut remonter la t° de 243K (-30 °C) à 253K (-20°C). Or à cette t° les spécimens dépassent le "t° d'effondrement" ce qui provoque des modifications architecturales internes (MacKenzie, 1967), surtout s'il n'y a pas eu de stabilisation chimique préalable.

N'ayant pas eu le temps de refaire un autre essai ni d'améliorer la technique de polymérisation du LR Gold après CS nous avons malgré tout tenté quelques marquages sur nos échantillons.

Dans un premier temps nous avons réalisé des **marquages sans attaque** (fig.46A et 46B). Dans tous nos échantillons cryoprotégés ou non, nous avons obtenu une réponse antigénique identique, comparable à celle observée sur les coupes de LR Gold après techniques classiques (comparez les figures 46A et 42B) : la réponse est peu intense et locale.

Nous avons ensuite essayé d'**intensifier la réponse antigénique** par une attaque à la pepsine (fig.46C). Le signal antigénique se trouve alors légèrement amélioré sans toutefois atteindre l'intensité obtenue en technique classique (fig.46A).

Ici aussi nous n'avons pas observé de différences entre les tissus cryoprotégés et ceux qui ne l'étaient pas.

Bien qu'une certaine antigénicité ait pu être mise en évidence, celle-ci ne correspond pas à notre attente ; étant donné les problèmes techniques rencontrés, nous ne pouvons dès lors tirer aucune conclusion valable de cette série de tests, ni sur la qualité de la conservation de l'antigénicité après CF et CS ni sur l'impact des cryoprotecteurs dans la révélation de cette antigénicité ni sur la localisation précise de la laminine.

Marquage en K4M (fig.47)

Le contrôle histologique effectué sur les trois types d'échantillons nous a révélé une préservation légèrement supérieure à celle obtenue en LR Gold. Ainsi sur les coupes de spécimens cryofixés sans cryoprotecteurs nous avons pu observer des zones de JED ne présentant pas de compartiments de ségrégation. Cependant comme dans le cas du LR Gold, l'infiltration des tissus préalablement refroidis lors de la CF et CS n'a pas été parfaite (problèmes de coupes, structures histologiques effondrées).

Le **marquage sans attaque** sur des coupes de tissus non cryoprotégés nous a révélé (et ce contrairement aux observations en LR Gold) une amélioration certaine de la réponse antigénique par rapport au tissu technique classiquement (comparez les figures 44A et 47A). Le marquage est plus intense et suit la JED. Ce marquage intensif ne se retrouve pas dans les tissus prétraités au glutaraldéhyde avant cryoprotection (fig.47C). Ceci serait probablement à imputer au fixateur (glutaraldéhyde) qui masquerait certains sites antigéniques plutôt qu'au glycérol même. Nous n'avons malheureusement pas pu vérifier cette hypothèse sur nos échantillons simplement cryofixés au glycérol : les coupes obtenues étaient de trop mauvaise qualité.

Ces résultats en K4M sont encourageants, ils nous montrent que les techniques de froid permettent non seulement de conserver

l'antigénicité du tissu mais la conservent vraisemblablement mieux que les techniques classiques.

Nous devons reconnaître, que si nous avons obtenu un marquage plus intensif, il ne nous a pas apporté beaucoup de renseignements quant à la localisation de la laminine (JED gommé). De nombreuses améliorations techniques s'imposent donc : il importe avant tout d'arriver à mieux contrôler la polymérisation des résines acryliques après CF et CS.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Notre but premier en réalisant ce mémoire était la mise au point des techniques de cryofixation par impact et de cryosubstitution susceptibles d'améliorer les connaissances tant ultrastructurales qu'immunocytochimiques de la JED.

D'un point de vue technique :

En travaillant sur le muflon de Bovidés nous sommes arrivés à obtenir des tissus correctement **cryofixés** c-à-d sans compartiments de ségrégation (décelables au MET) sur une épaisseur entre 3 et 5µm maximum. Ce résultat plus faible que celui obtenu par certains auteurs (Dempsey, 1976; Sitte, 1987) est néanmoins satisfaisant si l'on tient compte de notre inexpérience et des nombreux paramètres difficilement contrôlables intervenant dans la CF.

Nous avons constaté que l'emploi de cryoprotecteurs peut être intéressant car ils améliorent la qualité morphologique des tissus en éliminant tout compartiment de ségrégation.

Du point de vue **cryosubstitution**, nous avons testé les deux protocoles (temps longs, temps courts) proposés dans la littérature (Steinbrecht, 1987). Les différences observées entre ces deux modes opératoires (du moins en ce qui concerne la JED) sont minimes pour autant que l'on utilise comme solvant de substitution de base de l'acétone lors des temps de substitution longs et du méthanol lors des temps de substitution courts.

Nous avons également constaté qu'il était possible d'améliorer la qualité morphologique des tissus cryosubstitués en ajoutant au solvant de substitution certaines substances. C'est le mélange de Müller (glutaraldéhyde, OsO₄ et acétate d'uranyle dissous dans du méthanol) que nous recommandons pour des expériences ultérieures.

Notons que d'autres milieux de substitution restent à explorer (ajoute d'acide tannique, ...).

Nous avons enfin dans un dernier temps élaboré un protocole de **marquage anti-laminine** sur coupes ultra-fines de peau de Bovidés inclus après fixation chimique ou après CF et CS en LR Gold et K4M (marquage "post-embedding" à l'or colloïdal).

Nous ne pouvons tirer aucune conclusion ferme de ces expériences étant donné la qualité pas toujours satisfaisante des coupes obtenues : des améliorations sont encore à rechercher notamment au niveau de la polymérisation des résines utilisées.

Il ressort néanmoins de cette première approche que les techniques de froid garantissent au moins la conservation de l'antigénicité et semblent très prometteuses.

Tout réside dans la révélation de cette antigénicité ce qui s'avère très complexe.

D'un point de vue histologie de la JED :

Afin de disposer d'images de référence pour comparer nos observations de la JED après CF et CS, nous avons dû commencer par vérifier l'aspect de cette jonction après fixation classique.

De nos observations tant en technique classique qu'en technique de froid, il ressort :

- 1) que l'aspect de la JED est intimement lié à la qualité de la fixation. Certaines fixations (chimiques ou physiques) permettent vraisemblablement de mieux conserver certains de ses constituants et évitent des déplacements
- 2) par conséquent, l'aspect classique trilaminaire de la JED (Briggaman, 1982), comprenant une LL transparente, une LD, une LSB et de nombreuses structures fibrillaires pourrait bien être artéfactuelle.

En effet, nous n'avons jamais retrouvé cette image que dans des zones incorrectement cryofixées (zones avec compartiments de ségrégation).

L'image la plus proche de la réalité pourrait être celle déjà annoncée par Gordon (1980) en technique classique après fixation au rouge de ruthénium et confirmée après CF et CS par Goldberg (1986) et par nous-mêmes c-à-d une **zone uniforme, remplie d'un matériel dense et granuleux.**

Notons que dans certaines conditions expérimentales (CS en temps longs dans l'acétone ou CS en temps courts dans du méthanol) nous avons observé au sein de cette zone dense une **stratification** :

: une bande encore plus dense aux électrons s'y dessine (LD ?) délimitant ainsi côté épiderme une première zone dense granuleuse (ZG = ex-LL classique) et du côté derme une autre zone dense d'aspect identique à la première, en continuité avec le tissu conjonctif sous-jacent (LSB ?).

Quelle est la **nature** exacte du contenu granuleux de la JED ? Nous ne pouvons à partir de nos observations morphologiques répondre à cette question.

Des études approfondies immunocytochimiques ou autres (autoradiographies, ...) s'avèrent indispensables. Elles permettraient en outre de préciser, sur notre matériel, la localisation des différents constituants de la JED qui pourrait différer de celle décrite pour d'autres espèces.

En effet au cours de notre approche immunocytochimique nous avons constaté, du moins en technique classique, une localisation de la laminine au niveau de la LD et ce contrairement au schéma classiquement proposé qui la situe dans la LL (Briggaman, 1982).

Où se situe la laminine dans la JED correctement cryofixée (d'aspect dense granuleux) ? Nos essais de marquages après CF et CS ne nous ont pas apporté les renseignements attendus.

Il est possible en définitive que le vaste complexe, constitué par les différents constituants, décrit par Laurie (1982) soit réparti de manière homogène au niveau de la JED, ce qui expliquerait nos observations morphologiques. Mais ceci reste à vérifier immunocytochimiquement.

Quant à l'emploi de **cryoprotecteurs**, nous pouvons conclure qu'il ne facilite certainement pas l'interprétation puisque nous avons constaté des variations locales dans la structure de la JED: aspect tantôt de "type classique" (avec LL) tantôt de "type Goldberg" (sans LL).

Dans l'état actuel de nos observations nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses pour expliquer cette variabilité morphologique. Elle pourrait être le reflét du dynamisme de la JED. Cette dernière serait dans certains états physiologiques plus sensible à l'action d'agents chimiques (cfr. glycérol ou le glutaraldéhyde) qui y entraîneraient (si on admet la théorie de Goldberg, 1986) des déplacements chez certains de ses constituants.

Notre travail aura au moins eu le mérite de souligner la **complexité** de la JED.

La réalité de la structure de cette dernière réside probablement entre tous les aspects décrits. Chaque échantillon et chaque technique, plus ou moins artéfactuelle, apporte une nouvelle information.

"No technique without artefacts is available, from which vital information for the mental reconstruction of a living cell can be extracted. The *sine qua non* of whether an artefact is "good" or "bad" is whether we can understand the process by which it arises and whether the information obtained can be used in reconstructing the original system" (Rebhun, 1972).

BIBLIOGRAPHIE

bibliographie

- Acetarin, J.D., Carlemalm, E. and Villinger W.** (1986).
Developments of new Lowicryl resins for embedding
biological specimens at even lower temperatures.
J. Microsc., 143, 81-88
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K.
and Watson, J.D.** (1989).
Molecular biology of the cell, 2nd edition.
Ed. Garland Publishing, Inc., New York London
- Altman, L.G., Schneider, B.G. and Papermaster, D.S.**
(1984).
Rapid embedding of tissues in Lowicryl K4M for
immunoelectron microscopy.
J. Histochem. Cytochem., 32, 1217-1223
- Bachmann, L. and Mayer, E.** (1987).
Physics of water and ice : implication for cryofixation.
in : Cryotechniques in biological electron
microscopy, (p.3-34), Ed. Steinbrecht, R.A. and Zierold, K.
chez Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Bald, W.B.** (1986).
On crystal size and cooling rate.
J. Microsc., 143, 89-102
- Bance, G.** (1982).
Technical tips.
MSC-SMC Bulletins, 10, 28-32
- Barsky, S.H., Rao, N.C., Restrepo, C. and Liotta, L.A.**
(1984).
Immunocytochemical enhancement of basement membrane
antigens by pepsin : applications in diagnostic pathology.
Ann. J. Clin. Pathol., 82, 191-194
- Bendayan, M., Nanci, A. and Kan, F.W.K.** (1987).
Effect of tissue processing on colloidal gold
cytochemistry.
J. Histochem. Cytochem., 35, 983-996
- Bendayan, M. and Zollinger, M.** (1983).
Ultrastructural localization of antigenic sites on
osmium-fixed tissues applying the protein -A-gold
technique.
J. Histochem. Cytochem., 31, 101-109
- Bernfield, M.** (1984).
Introduction.
in : Basement membranes and cell movement (p.1-5), Ciba
Foundation symposium 108, Ed. Porter, R. and Whelan, J.
chez Pitman London
- Böhler, S.** (1979).
Artifacts and defects of preparation in freeze-etch
technique.
in : Freeze fracture : methods, artifacts and
interpretations, (p.19-29), Ed. Rash, J.E. and Hudson, C.S.
chez Raven Press, New York

bibliographie

- Borel, J-P., Randoux, A., Maquart, F.X., Le Peuch, G. and Valeyre, J.** (1987).
Biochimie dynamique, Ed. Maloine Paris
- Breathnach, A.S.** (1971).
Ultrastructure of human skin.
Ed. Longman Group Ltd chez W. Clowes and Sons Ltd, London
- Briggaman, R.A.** (1982).
Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement membrane.
J. Invest. Dermatol., 78, 1-6
- Burgeson, R.E.** (1988).
New collagens, new concepts.
Ann. Rev. Cell Biol., 4, 551-577
- Carlemalm, E., Garavito, R.M. and Villinger W.** (1982).
Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature.
J. Microsc., 126, 123-143
- Causton, B.E.** (1984).
The choice of resins for electron immunocytochemistry.
in : Immunolabelling for electron microscopy, (p.29-36),
Ed. Polak, J.M. and Varndell, I.M., chez Elsevier
Amsterdam
- Chandler, D.E.** (1979).
Quick freezing avoids specimen preparation artifacts in membrane-fusion studies.
in : Freeze fracture : methods, artifacts and interpretations, (p.81-87), Ed. Rash, J.E. and Hudson, C.S.
chez Raven Press, New York
- Claudy, A.L.** (1987).
La laminine.
in : Biologie de la peau , Vol. 148, p.103-110, Ed. INSERM
- Cohn, R.H., Banerjee, S.D. and Bernfield, M.R.** (1977).
Basal lamina of embryonic salivary epithelia. Nature of glycosaminoglycan and organization of extracellular materials.
J. Cell Biol., 73, 464-478
- Courtoy, P.J., Timpl, R. and Farquar, M.G.** (1982).
Comparative distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the rat glomerus.
J. Histochem. Cytochem., 30, 874-886
- Dempsey, G.P. and Bullivant, S.** (1976).
A copper block method for freezing non-cryoprotected tissue to produce ice-crystal-free regions for electron microscopy I. Evaluation using freeze-substitution.
J. Microsc., 106, 251-260

bibliographie

- Doerr-Schott, J.** (1989).
Colloidal gold for multiple staining.
in : Colloidal gold. Principles, methods and applications,
volume 1, (p.145-190), Ed. Hayat, M.A., Academic Press,
INC, San Diego
- Dubochet, J. and McDowell, A.W.** (1981).
Vitrification of pure water for electron microscopy.
J. Microsc., 124, RP3-RP4
- Dubois, C.** (1989).
Mise au point d'une référence morphologique permettant le
contrôle de la qualité d'épidermes obtenus en culture.
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en
sciences biologiques, FUNDP Namur
- Dupiereux, F.** (1989).
Développement d'un protocole de cryopréservation des
hépatocytes isolés et mis en suspension. Evaluation de
critères métaboliques et morphologiques.
Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en
sciences biologiques, FUNDP Namur
- Edelmann, L.** (1989).
The contracting muscle : a challenge for freeze-
substitution and low temperature embedding.
in : Science of biological specimen preparation, Ed.
Albrecht, R.M. and Ornberg, R.L., AMF O'Hara, SMI
- Feder, N. and Sidman, R.L.** (1958).
Methods and principles of fixation by freeze-substitution
J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 593-600
- Gabe, M.** (1968).
Techniques histologiques.
Ed. Masson et Cie, Paris
- Goldberg, M. and Escaig, F.** (1984).
The appearance in TEM of proteoglycan predentine is
fixation dependant.
J. Microsc., 134, 161-167
- Goldberg, M. and Escaig-Haye, F.** (1986).
Is the lamina lucida of the basement membrane a fixation
artefact ?
Eur. J. Cell Biol., 42, 365-368
- Gordon, J.R. and Bernfield, M.R.** (1980).
The basal lamina of the postnatal mammary epithelium
contains glycosaminoglycans in a precise ultrastructural
organization.
Dev. Biol., 74, 118-135
- Handley, D.A., Alexander, J.T. and Chien, S.** (1981).
The design and use of a simple device for rapid
quench-freezing of biological samples.
J. Microsc., 121, 273-282

bibliographie

- Harvey, D.** (1982).
Freeze-substitution.
J. Microsc., 127, 209-221
- Hayat, M.A.** (1970).
Principles and techniques of electron microscopy :
biological applications, Vol 1, Ed. Van Nostrand Reinhold
Company, New York
- Hisano, S., Adachi, T. and Deikoku, S.** (1984).
Immunolabeling of adeno-hypophysial cells with
protein-A-colloidal gold-antibody complex for electron
microscopy.
J. Histochem. Cytochem., 32, 705-711
- Hook, M., Couchman, J.R., Woods, A., Robinson, J. and
Christner, J.E.** (1984).
Proteoglycans in basement membranes.
in : Basement membranes and cell movement (p.44-50), Ciba
Foundation symposium 108, Ed. Porter, R. and Whelan, J.
chez Pitman London
- Humbel, B. and Müller, M.** (1986).
Freeze-substitution and low temperature embedding.
in : Science of biological specimen preparation (p.175-
183), Ed. Müller, M., Becker, R.P., Boyde, A. and
Wolosewick,
J.J., SEM Inc. AMF O'Hara (Chicago)
- Janssen Biotech.** (1989).
Auroprobe EM GAR G15, nr. 23-683-15
- Kanwar, Y.S. and Farquhar, M.G.** (1979).
Anionic sites in the glomerular basement membrane.
J. Cell Biol., 81, 137-153
- Katz, S.I.** (1984).
The epidermal basement membrane : structure, ontogeny and
role in disease.
in : Basement membranes and cell movement (p.243-255),
Ciba Foundation symposium 108, Ed. Porter, R. and Whelan
J.chez Pitman London
- Kefalides, A.N., Alper, R. and Clark, C.C.** (1979).
Biochemistry and metabolism of basement membranes.
Int. Rev. Cytol., 61, 167-228
- Kellenberger, E.** (1987).
The response of biological macromolecules and
supramolecular structures to the physics of specimen
cryopreparation.
in : Cryotechniques in biological electron
microscopy, (p.35-63), Ed. Steinbrecht, R.A. and Zierold, K
chez Springer Verlag Berlin Heidelberg

bibliographie

- Kirkham, N., Gibson, B., Leigh, I.M. and Price, M.L.** (1989).
A comparison of antibodies to type VII and type IV collagen laminin and amnion as epidermal basement membrane markers.
J. Pathol., 159, 5-6
- Kleinman, H.K., Klebe, R.J. and Martin, G.R.** (1981).
Role of the collagenous matrices in the adhesion and growth of cells.
J. Cell Biol., 88, 473-485
- Knoll, G., Verkleij, A.J. and Plattner, H.** (1987).
Cryofixation of dynamic processes in cells and organelles.
in : *Cryotechniques in biological electron microscopy* (p.258-271), Ed. Steinbrecht, R.A. and Zierold, K. chez Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Laurie, G.W., Leblond, C.P., Cournil, I. and Martin, G.R.** (1980).
Immunohistochemical evidence for intracellular formation of basement membrane collagen (type IV) in developing tissues.
J. Histochem. Cytochem., 28, 1267-1274
- Laurie, G.W., Leblond, C.P. and Martin, G.R.** (1982).
Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes.
J. Cell Biol., 95, 340-344.
- Laurie, G.W., Leblond, C.P., Inoue, S., Martin, G.R. and Chung, A.** (1984).
Fine structure of the glomerular basement membrane and immunolocalization of five basement membrane components to the lamina densa (basal lamina) and its extensions in both glomeruli and tubules of the rat kidney.
Am. J. Anat., 169, 463-481
- Laurie, G.W., Bing, J.T., Kleinman, H.K., Hassel, J.R., Aumailley, M., Martin, G.R. and Feldmann, R.J.** (1986).
Localization of binding sites for laminin, heparan sulfate proteoglycan and fibronectin on basement membrane (Type IV) collagen.
J. Mol. Biol., 189, 205-216
- Leloup, R., Laurent, L., Ronveaux, M-F., Drochmans, P. and Wanson, J-C.** (1979).
Desmosomes and desmogenesis in the epidermal of calf muzzle.
Biol. Cell., 34, 137-152
- Leloup, R., Leclercq-Smekens, M., Saint-Guillain, M-L., Sartenaer-Meurisse, M-F. et Van Reepinghen-Degen, A.** (1982).
Tissu conjonctif.
in : *Histologie générale II, syllabus FUNDP*

bibliographie

- Luft, J.H.** (1971a).
Ruthenium red and violet : I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action.
Anat. Rec., 171, 347-368
- Luft, J.H.** (1971b).
Ruthenium red and violet : II. Fine structural localization in animal tissues.
Anat. Rec., 171, 369-416
- MacKenzie, A.P.** (1967).
The collapse phenomenon in the freeze-substitution process.
Cryobiology, 3, 387
- Madri, J.A., Pratt, M., Yurchenco, P.D. and Furthmayr, H.** (1984).
The ultrastructural organization and architecture of basement membranes.
in : Basement membranes and cell movement (p.6-18), Ciba Foundation symposium 108, Ed. Porter, R. and Whelan J. chez Pitman London
- McLean, I.W. and Nakane, P.K.** (1974).
Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative for immunoelectron microscopy.
J. Histochem. Cytochem., 22, 1077-1083
- Montagna, W. and Carlisle, K.** (1979).
Structural changes in aging human skin.
J. Invest. Dermatol., 82, 453-457
- Müller, M., Marti, T. and Kriz, S.** (1980).
Improved structural preservation by freeze-substitution.
in : *Electron Microscopy, Volume 2 Biology* (p.720-721), Published by the Seventh European Congress on Electron Microscopy Foundation ; Leiden
- Nagele, R.G., Kosciuk, M.C., Wang, S.M., Spero, D.A. and Lee, H.** (1985).
A method for preparing quickfrozen, freeze-substituted cells for transmission electron microscopy and immunocytochemistry.
J. Microsc., 139, 291-301
- Newman, G.R. and Jasami, B.** (1984).
Post-embedding immunoenzyme techniques.
in : *Immunolabelling for electron microscopy*, (p.53-70), Ed. Polak, J.M. and Varndell, I.M., chez Elsevier Amsterdam
- Newman, G.R., Jasani, B. and Williams, E.D.** (1982).
The preservation of ultrastructure and antigenicity.
J. Microsc., 127, RP5-RP6

bibliographie

- Nicolas, G.** (1989).
La cryofixation, méthode de préparation à l'immunocytochimie ultrastructurale.
in : Immunocytochimie, méthodes pratiques, (p.47-55), Ed. Calas, A., Gounon, P., Hernandez-Verdun, D., Nicolas, G., Reynès, M. et Tougard, C., chez Société Française de Microscopie électronique, Ivry
- Puchtler, H. and Meloan, S.N.** (1985).
On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunochemical reactions.
Histochemistry, 82, 201-204
- Reale, E., Luciano, L. and Kühn, K.** (1985).
Cationic dyes reveal proteoglycans on the surface of epithelial and endothelial kidney cells.
Histochemistry, 82, 513-518
- Rebhun, L.I.** (1972).
Freeze-substitution and freeze-drying.
in : Principles and techniques of electron microscopy, biological applications, volume 2, (p.3-49), Ed. Hayat, M.A. chez Van Nostrand Reinhold Co., New York
- Robards, A.W. and Sleytr, U.B.** (1985).
Low temperature methods in biological electron microscopy, in : Practical methods in electron microscopy, Vol 10, Ed. Glauert, A.M. chez Elsevier, Amsterdam
- Salonen, J., Pelliniemi, L.J., Foidart, J.M., Risteli, L. and Santti, R.** (1984).
Immunohistochemical characterization of the basement membranes of the human oral mucosa.
Archs. oral Biol., 29, 363-368
- Sasaki, M., Kleinman, H.K., Hubert, H., Deutzmann, R. and Yamada, Y.** (1988).
Laminin, a multidomain protein.
J. Biol. Chem., 263, 16536-16544
- Simionescu, N. and Simionescu, M.** (1976a).
Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy : I. Procedure, and evidence for mordanting effect.
J. Cell Biol., 70, 608-621
- Simionescu, N. and Simionescu, M.** (1976b).
Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy : II. The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect.
J. Cell Biol., 70, 622-633
- Sitte, H., Neumann, K. and Edelman, L.** (1985).
Cryofixation and cryosubstitution for routine work in transmission electron microscopy.
in : Science of biological specimen preparation, (p.103-118), Ed. Müller, M., Becker, R.P., Boyde, A. and Wolosewick, J.J., SEM Inc., AMF O'Hara, Chicago

bibliographie

- Sitte, H., Edelmann, L. and Neuman, K. (1987).**
Cryofixation without pretreatment at ambient pressure.
in : Cryotechniques in biological electron microscopy
(p.87-113), Ed. Steinbrecht, R.A. and Zierold, K. chez
Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Skaer, H. (1982).**
Chemical cryoprotection for structural studies.
J. Microsc., 125, 137-147
- Steinbrecht, R.A. (1980).**
Cryofixation without cryoprotectants. Freeze-substitution
and freeze etching of an insect olfactory receptor.
Tissue & Cell, 12, 73-100
- Steinbrecht, R.A. . (1982).**
Experiments on freezing damage with freeze-substitution
using moth antennae as test objects.
J. Microsc., 125, 187-192
- Steinbrecht, R.A. and Müller, M. (1987).**
Freeze-substitution and freeze-drying.
in : Cryotechniques in biological electron microscopy,
(p.149-172), Ed. Steinbrecht, R.A. and Zierold, K. chez
Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Storey, K.B. and Storey, J.M. (1989).**
Comment les animaux survivent au gel.
La Recherche, 208, 332-341
- Timms, B.G. (1986).**
Postembedding Immunogold labeling for electron microscopy
using "LR White" resin.
Am. J. Anat., 175, 267-275
- Timpl, R., Fujiwara, S. Dziadek, M., Aumailly, M.,
Weber, S. and Engel, J. (1984).**
Laminin, proteoglycan, nidogen and collagen IV :
structural models and molecular interactions.
in : Basement membranes and cell movement (p.25-37), Ciba
Foundation symposium 108, Ed. Porter, R. and Whelan, J.
chez Pitman London
- Uitto, J., Olsen, D.R. and Fazio, M.J. (1989).**
Extracellular matrix of the skin : 50 years of progress.
J. Invest. Dermatol., 92, 61S-77S
- Van Harreveld, A. and Crowell, J. (1964).**
Electron microscopy after rapid freezing on a metal
surface and substitution fixation.
Anat. Rec., 149, 381-386
- Van Harreveld, A., Crowell, J. and Malhotra, S.K.
(1965).**
A study of extracellular space in central nervous tissue
by freeze-substitution.
J. Cell Biol., 25, 117-137

bibliographie

- Verna, A.** (1983).
A simple quick-freezing device for ultrastructure preservation : evaluation by freeze-substitution.
Biol. Cell, 49, 95-98
- Westgate, G., Weaver, A. and Couchman, J.** (1985).
Bullous pemphigoid antigen localization suggest an intracellular association with hemi-desmosomes.
J. Invest. Dermatol., 84, 218-224
- Woodley, D.T.** (1987).
Importance of the dermal-epidermal junction and recent advances.
Dermatologica, 174, 1-10
- Zalokar, M.** (1966).
A simple freeze-substitution method for electron microscopy.
J. Ultrastr. Res., 15, 469-479
- Zierold, K. and Steinbrecht, R.A.** (1987).
Cryofixation of diffusible elements in cells and tissues for electron probe microanalysis.
in : *Cryotechniques in biological electron microscopy* (p.272-282), Ed. Steinbrecht, R.A. and Zierold, K. chez Springer Verlag Berlin Heidelberg

Annexe

Fixateur BHAS (Bouin Hollande Acétifié Sublimé)

pour 100 ml d'eau distillée :

acétate neutre de cuivre : 2,5 gr

acide picrique : 4 gr

formaldéhyde à 36-40% : 10 ml

acide acétique glacial : 1,5 ml

Tampon PBS (pour les marquages)

pour 1 l d'eau distillée :

sodium chloride : 8000 mg

potassium chloride : 200 mg

disodium hydrogen phosphate : 1 150 mg

potassium dihydrogen phosphate : 200 mg