

REACTIONS LUMINESCENTES HISTOLOGIQUES DE DETECTION DE  
L'ELASTINE ET DU COLLAGENE

E; Tchakarof, M. Gardevski, I. Kratchmarov, M. Kiliowska

Institut de recherches scientifiques et technologiques  
sur la viande - Sofia

La sensibilité et la spécificité des méthodes cytologiques reposant sur le phénomène de la fluorescence secondaire conditionnent l'intérêt porté à la création d'un spectre de techniques aptes à satisfaire aux exigences de l'analyse cytochimique et applicables surtout dans les cas où les méthodes de coloration conventionnelles s'avèrent d'une sensibilité insuffisante.

Depuis qu'Ornstein et al. (1957) ont attiré l'attention sur les perspectives de l'application des méthodes fluorescentes dans le domaine de l'histochemie et que Kasten (1958, 1961) a introduit les réactifs du type Schiff luminescents bon nombre de techniques histo-chimiques luminescentes ont été proposées.

Dans la présente communication nous exposons les résultats de nos recherches portant sur la possibilité de création de méthodes histo-chimiques luminescentes de détection de l'élastine et du collagène.

Du point de vue histochemie deux méthodes de détection des éléments élastiques méritent une attention plus spéciale. En premier lieu c'est la réaction pseudoplasmale de Verne (1928) qui peut être imputée à la présence de phospholipides oxydés (Pearse, 1968). En second lieu c'est la méthode de Gomori (1950) à la paraldehyde-fuchsine qui, outre l'élastine met en évidence différents mucopolysaccharides acides (Abu'l Hay, Rinehart, 1952; Scott, Clayton, 1953; Halmi, Da-

viés, 1953; Spicer, Meyer, 1960). D'après Spicer et Meyer (1960) la paraldéhyde colore surtout les mucopolysaccharides sulfatés. Pour Ortman et Forbes (1966) la méthode repose sur la réactivité des groupement carboxyles. Malgré que la spécificité de ces deux réactions n'est pas absolue par rapport à l'élastine, leur valeur histochimique surpasse celle des méthodes de coloration empiriques, surtout dans le plan des possibilités d'explication du mécanisme chimique de l'élastophilie tinctoriale.

Du point de vue de l'analyse lumineuse de l'élastine il est nécessaire avant tout de prendre en considération le fait que cette dernière possède une fluorescence primaire. Pour Thomas, Elsdon et Partridge (1963) et Bedford et Katritzky (1963) cette fluorescence bleue-blanchâtre devrait être imputée à la présence d'un noyau chromophore, représentant un dérivé de la pyridine et qui relie en quatre positions croisées les deux courtes chaînes polypeptidiques de la molécule de l'élastine. La fluorescence primaire de l'élastine permet de mettre en évidence des agglomérations fibrillaires plus notables, telles que les membranes élastiques des artères, mais la détection d'éléments plus fins ou solitaires en est difficile, compte tenu aussi du fait que la luminescence native de beaucoup de composés protidiques est d'une nuance pareille.

Dans le domaine de la microscopie de fluorescence diverses méthodes ont été proposées pour la mise en évidence de l'élastine (Haitinger, 1959). Elles reposent, ainsi que les méthodes conventionnelles de coloration de l'élastine, sur une affinité tinctoriale empiriquement démontrée, qui de point de vue chimique est d'une valeur insuffisante. En outre la spécificité de ces méthodes lumineuses n'est pas grande - beaucoup d'autres éléments morphologiques des tissus sont aussi colorés.

Les expériences que nous avons effectuées avaient pour but d'obtenir des équivalents fluorescents de la méthode de Gomori et de la réaction pseudoplasmale.

Réactions lumineuses type Gomori.

La technique de Gomori repose sur les propriétés tinctoriales du produit de la réaction entre la paraldéhyde et la fuchsine basique en milieu acide. Ce produit est probablement une base de Schiff formée entre les groupes amines de la fuchsine et l'aldéhyde acétique libérée à partir de la paraldéhyde en milieu acide.

Les fluorochromes suivants furent testés par rapport à leur propriété de former des produits élastophiles avec la paraldéhyde: acri-

flavine, acridine orange, rivanol, coriphosphine O, phosphine 3R, auramine O, rouge neutre, primuline, thioflavine S. Cette série de composés chimiques comprend en premier lieu des colorants dont le caractère basique est occasionné par la présence d'un ou de plusieurs groupements amines primaires; en second lieu des fluorochromes ne possédant que des groupes amines substitués (acridine orange) et enfin des colorants acides caractérisés par la présence d'un groupe amine primaire (primuline) ou substitué (thioflavine S). L'inclusion dans les recherches des fluorochromes des deux derniers groupes était fait en vue d'étudier le rôle des groupes amines et de l'électropolarité ionique du colorant dans la formation de produits élastophiles avec la paraldéhyde.

#### Technique de coloration:

1. Fixation au formol à 15%. Inclusion à la paraffine. Microtomisation à 5 - 8 microns. Déparaffinage des coupes d'après le procédé habituel.

2. Oxydation des coupes deux minutes dans le mélange suivant:

|  |       |
|--|-------|
| Solution de permanganate de potassium à 2,5% | 5 ml  |
| Acide sulfurique à 5%                        | 5 ml  |
| Eau distillée                                | 30 ml |

La solution doit être préparée avant l'emploi et n'est utilisable que quelques minutes. Les coupes doivent être constamment en mouvement.

3. Lavage à l'eau courante 5 minutes.

4. Traitement dans du bisulfite de sodium à 2% jusqu'à la décoloration totale des coupes (environ 2 minutes).

5. Lavage à l'eau courante 30 secondes.

6. Rinçage à l'alcool à 70°.

7. Traitement par le réactif de Gomori fluorescent 30 minutes.

8. Lavage répété à l'eau distillée

9. Déshydratation en commençant par de l'alcool à 95°, alcool absolu, xylène, inclusion en milieu non fluorescent.

#### Préparation de l'aldéhyde-fluorochrome:

0,5 gr du fluorochrome sont dissous dans 100 ml d'éthanol à 70°. on ajoute 2 ml d'acide chlorhydrique concentré et 1 ml de paraldéhyde. La solution est chauffée au bain marie à 50° pendant 10 min., après quoi elle est laissée à la température du laboratoire pour 3 - 4 jours. Le réactif mûr est conservé au frigidaire à 4°. Filtrer avant l'emploi.

#### Résultats:

Des résultats satisfaisants par rapport à la possibilité de former des produits élastophiles avec la paraldéhyde furent obtenus unique-

ment avec les fluorochromes possédant deux groupes amines primaires - phosphine 3R, acriflavine et rivanol. La fluorescence observée avec la paraldéhyde-phosphine était d'une électivité suffisamment haute, mais de différente nuance suivant le calibre des fibres élastiques. Les fibres plus grosses témoignaient une luminescence jaune-beige et les plus fines - une luminescence rouge-brunâtre. Si on prend en considération le fait que la phosphine est un fluorochrome qui possède une forte hétérofluorescence dissociative, on peut supposer que les résultats observés sont dûs à la présence de composants apolaires dans les fibres plus volumineuses ou à la concentration plus élevée des polysaccharides acides qui fixent le fluorochrome sous sa forme ionique dans les fibres élastiques plus fines. Les fibres élastiques traitées avec la paraldéhyde-rivanol témoignaient une fluorescence verte blanchâtre intense. Toutefois le contraste avec la luminescence des autres composants cellulaires et tissulaires était plus faible qu'avec la phosphine. Les meilleurs résultats furent obtenus avec la paraldéhyde-acriflavine. Les fibres élastiques témoignaient une luminescence jaune-or intense et stable. Outre les fibres élastiques, analogiquement à la méthode originale de Gomori, d'autres éléments cellulaires témoignaient une fluorescence secondaire: noyaux - jaune terne, granulations des mastocytes, granulations neurosécrétoires, mucus - orange foncée, cellules B du pancréas endocrine et cellules B de l'adénohypophyse - jaune-or terne, cellules D de l'adénohypophyse - jaune-vert brillante. Les érythrocytes étaient caractérisés par une luminescence bleu-ciel très intense.

Les résultats obtenus avec les fluorochromes possédant un groupe-ment amine primaire - coriphosphine O, auramine O et rouge neutre étaient moins satisfaisants. Les produits obtenus avec la paraldéhyde témoignaient une affinité relativement faible envers l'élastine.

Les colorants ne possédant que des groupes amines substitués - acridine orange, thioflavine S ne permettaient pas d'obtenir des produits élastophiles avec la paraldéhyde.

Des résultats plutôt inattendus furent obtenus avec les colorants thiazoles acides - la primuline et la thioflavine S. Le composé avec la paraldéhyde témoignait une affinité très prononcée pour les éléments collagènes et qui dépassait celle de ces mêmes colorants en solution aqueuse. Outre le tissu collagène, le noyaux et le cytoplasme cellulaires accusaient une luminescence modérée. L'interprétation de ces derniers résultats exige des recherches supplémentaires. Trois hypothèses peuvent être suggérées: rôle du Ph du milieu de coloration,

action de la paraldéhyde sur le collagène et formation d'un produit collagénophile spécifique.

#### Techniques luminescentes du type de la réaction pseudoplasmale.

Dans nos recherches sur les possibilités de création d'une réaction luminescente pseudoplasmale nous avons étudié les propriétés des réactifs type-Schiff luminescents proposés par Kasten (1959, 1961), ainsi qu'une combinaison primuline-Schiff de notre composition.

#### Technique de coloration:

1. Fixation au formol à 15%. Inclusion à la paraffine. Coupes à 5 - 8 microns. Déparaffinage des coupes.
2. Traitement 20 à 40 minutes dans le réactif type-Schiff luminescent.
3. Lavage à 5 - 6 reprises dans de l'eau sulfureuse.
4. Lavage 15 à 20 minutes dans de l'eau courante.
5. Deshydratation et montage en milieu non fluorescent.

#### Préparation du réactif type-Schiff luminescent:

0,2 gr d'acriflavine ou de primuline sont dissous à froid dans 200 ml d'eau distillée. On ajoute 20 ml d'HCl normal et 1 gr de métabisulfite de potassium. Le réactif ne se décolore pas comme celui qui est préparé à base de fuchsine basique. Il peut être employé après 4 heures et se conserve à la glacière.

#### Résultats:

Les éléments fibrillaires élastiques témoignent une luminescence jaune-or brillante avec l'acriflavine-Schiff et blanche brillante avec la primuline-Schiff.

#### Conclusions:

Les résultats de nos recherches confirment les possibilités de création de réactions luminescentes dont la spécificité est équivalente à celle que propose l'histochemie dans le domaine de la microscopie conventionnelle par la méthode de Gomori et la réaction pseudoplasmale. La haute sensibilité des méthodes luminescentes permet d'envisager leur application dans les cas où l'élastine et le collagène subissent une dégradation progressive par des processus pathologiques ou technologiques.

La possibilité d'obtenir des résultats équivalents à la méthode de Gomori seulement avec les fluorochromes possédant des groupes amines primaires confirme le rôle de ces derniers dans le mécanisme de la formation du produit élastophile.

L'élastophilie de la primuline-Schiff et la collagénophilie de la paraldéhyde primuline indiquent que le comportement de ce fluorochrome est conditionné, au moins dans l'un des cas par la formation d'un

nouveau produit et non par la simple acidité du milieu, qui pour les deux réactifs est semblable.

### B i b l i o g r a p h i e

1. Abu'l-Haj S. K., Rinehart J. F., J. Natl. Canc. Inst., 13, 1952, 232.
2. Bedford G. R., Katritzky A. R., Nature, 200, 1963, 652.
3. Haitinger M., Fluoreszenz-Mikroskopie, Geets & Portig, Leipzig, 1959.
4. Halmi N. S., Davies J., J. Histochem. Cytochem., 1, 1953, 447.
5. Kasten F. H., J. Histochem. Cytochem., 9, 1961, 599.
6. Kasten F. H., Burton V., Glover., Nature, 184, 1959, 1797.
7. Ornstein L., Mautner W., Davies B. J., Tamura R., J. Mount Sinai Hosp. 24, 1957, 1066.
8. Ortman R., Forbes W. F., Balasurbramaman A., J. Histochem. Cytochem., 14, 1966, 104.
9. Pearse A. G. E., Histochemistru, v. I, Churchill, London, 1968.
10. Scott H. R., Clayton B. P., J. Histochem. Cytochem., 1, 1953, 336.
11. Spicer S. S., Meuer D. B., Tech. Bull. Reg. Med. Technol., 30, 1960, 53.
12. Thomas J., Elsdon D. F., Partridge S. M., Nature, 200, 1963, 651.
13. Verne J., C. R. Soc. Biol., 99, 1928, 266.