



HAL
open science

APPORT DES TECHNIQUES HISTOLOGIQUES EN ANTHROPOLOGIE MEDICO-LEGALE

Fernando Ramirez Rozzi

► **To cite this version:**

Fernando Ramirez Rozzi. APPORT DES TECHNIQUES HISTOLOGIQUES EN ANTHROPOLOGIE MEDICO-LEGALE. Revue Française d’Histotechnologie, 2017. ⟨hal-03356225⟩

HAL Id: hal-03356225

<https://hal.science/hal-03356225v1>

Submitted on 13 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L’archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d’enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



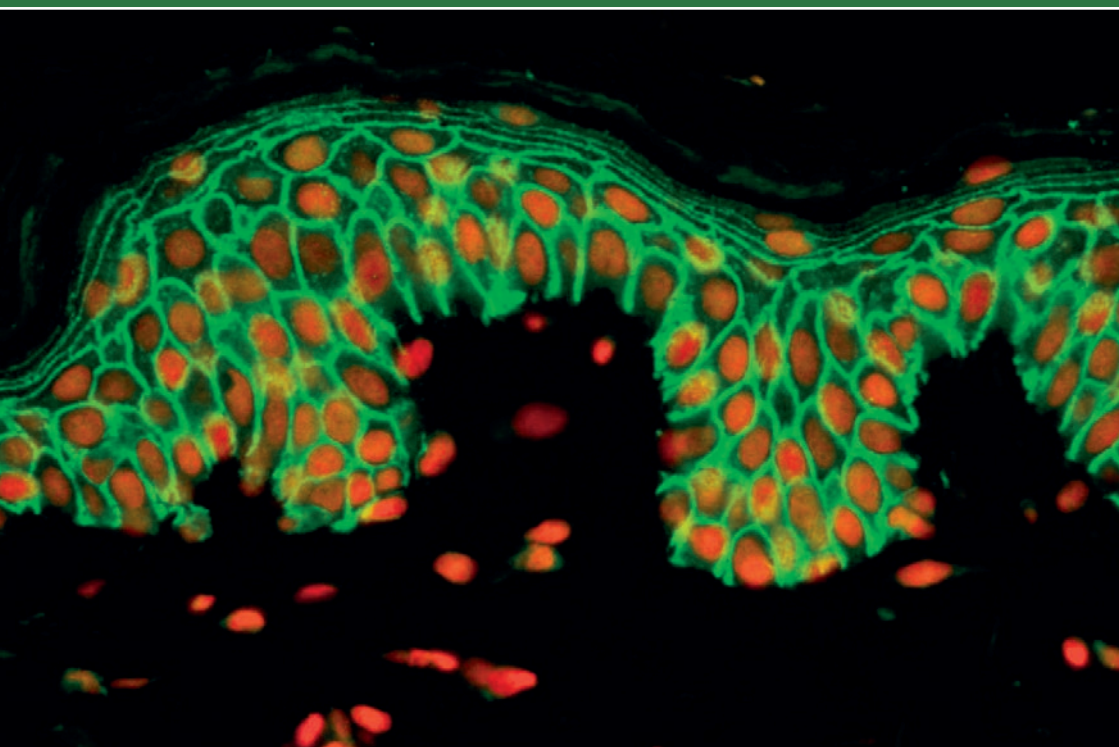
HAL Authorization

Revue Française

d'Histo

Technologie

2017 - Vol. 29 - n°1



Revue Française d'Histotechnologie

www.afhisto.com



2017 - Vol. 29 - n°1

ASSOCIATION FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

N° 8397, J.O. du 17 février 1988, n°7

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

COMPOSITION DU BUREAU :

Nathalie ACCART, Bâle, *Présidente*

Nicolas GADOT, Lyon, *Trésorier*

Sophie LUCCANTONI, Fontenay-Aux-Roses, *Secrétaire*

Jérôme AMIAUD, Nantes, *Secrétaire adjoint, spécialisé en communication*

Alain FAUTREL, Rennes, *Relation avec les firmes*

Lydie VENTEO, Reims, *Rédactrice en chef de la Revue*

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

Sophie LUCCANTONI, Fontenay-Aux-Roses, *Responsable Reportage*

Nombre d'adhérents au 31 décembre 2016 : 84

Siège social :

Association Française d'Histotechnologie

Mairie d'Amboise, BP 247

37402 AMBOISE CEDEX

REVUE FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE

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

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

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

Courrier, courriel, manuscrits :

Nathalie ACCART
2A route de Windsbourg
67710 WANGENBOURG
nathalie.accart_gris@novartis.com

Présidente du comité de lecture :

Lydie VENTEO, Label Histologie, Reims

Membres du comité de lecture :

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

Revue Française d'Histotechnologie

Editeur : Association Française d'Histotechnologie

Mise en page : Vincent CANNET, 68440 SCHLIERBACH

Imprimeur : Imprimerie de Saint-Louis, 68306 SAINT-LOUIS Cedex

Directrice de publication : Nathalie ACCART

Publicité : Alain FAUTREL

Rédactrice en chef : Lydie VENTEO

Tirage : 200 exemplaires

ISSN 0997-6434

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

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

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

I. Soumission des manuscrits

par voie postale à : Nathalie ACCART
2A route de Windsbourg
67710 WANGENBOURG

Par messagerie électronique à : nathalie.accart_gris@novartis.com

Dans tous les cas, fournir le nom, les adresses postale ET électronique de l'auteur en charge de la correspondance.

Il est nécessaire de fournir un résumé en français ET en anglais.

II. Présentation générale des manuscrits

Dactylographie

La première page du manuscrit indique le titre de l'article (éventuellement sous-titre), le nom et prénom de chaque auteur, son affiliation avec ses adresses postale complète et électronique. Les manuscrits doivent être saisis dans un logiciel de traitement de texte, de préférence Microsoft Word et si possible en police de caractère «Times New Roman» de taille 12. Les médicaments doivent être mentionnés selon leur dénomination commune ou leur nom chimique. Les références commerciales des réactifs (référence et fournisseur) et matériel (modèle et fabricant) utilisés sont citées clairement, ainsi que les conditions expérimentales des travaux décrits.

Acronymes

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

Les documents iconographiques (Figures et Tableaux)

- Les Figures sont numérotées en chiffres arabes et par ordre d'apparition dans le texte : (Figure 1).
- Les Tableaux sont numérotés en chiffres romains par ordre d'apparition dans le texte : (Tableau I).

Les légendes des Figures et Tableaux sont portées les unes à la suite des autres, en fin d'article.

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

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

- **soit en doc attaché par courriel et formuler ainsi :**

- 1 fichier (**Word** de préférence, caractères « **Times New Roman, taille 12** »), avec uniquement le texte et les légendes photos **et**
- 1 fichier au format **TIFF** avec une résolution minimum de **300 dpi** pour l'icongraphie seule, clairement identifiée et nommée dans le texte (Figure 1a, Figure 2...)

- **soit sur CD portant le nom de l'auteur**

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

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

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références bibliographiques, sont numérotées en chiffres arabes, classées selon l'ordre d'apparition dans le texte et portées en fin d'article. Le numéro de la référence bibliographique citée est mentionné entre parenthèses. Le nom de la revue doit correspondre aux abréviations disponibles dans les catalogues de l'**Institut de l'Information Scientifique et Technique** (INIST).

<http://services.inist.fr/public/fre/conslt.htm>.

Elle doit de plus correspondre au style et dactylographie suivants :

Pour les articles :

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

Pour les livres :

1. TERNYNCK T. & AVRAMEAS S.- Techniques immunoenzymatiques. 2^e éd. Inserm, Paris, p. 19-22, 1987.

EDITORIAL

L'ASSOCIATION FRANÇAISE D'HISTOTECHNOLOGIE FETE SES 30 ANS

Marc ANDREU et Nathalie ACCART

Remettons en route la machine à remonter le temps et appréhendons ensemble les tenants et les aboutissants de la genèse de notre association de techniciens, l'Association Française d'Histotechnologie (AFH). Elle est née le 20 Janvier 1988 en préfecture d'Indre et Loire (I. & L.) et la déclaration de l'A.F.H. s'est faite conformément à la loi de 1901. Depuis ce jour le siège social de l'Association est toujours resté à la Mairie d'Amboise (I. & L.).

Au cours des années 70, dans les laboratoires du secteur public, privé ou industriel, d'histologie, d'anatomie pathologique ou de cytologie, le marché de l'emploi était très favorable au personnel technique. Ce personnel était soit formé sur place, soit diplômé d'écoles privées ou publiques, Sciencia, ETAB, ELAM, puis plus tard IUT. Les programmes généralistes étaient parfois complétés par des initiatives locales, souvent universitaires comme par exemple, le certificat d'études pratiques d'histologie du Professeur Marc Maillet à Tours en 1970. Les associations comme l'UNATEB étaient généralistes, la semaine de l'Anatomie Pathologique était orientée vers le diagnostic. Seule l'association des cytotechniciens proposait congrès et formation dans sa spécialité.

Puis vinrent les années 80 pendant lesquelles le marché de l'emploi se rapprochait de l'équilibre. Les responsables de laboratoire recrutaient plutôt du personnel qualifié dans leur spécialité. Par voie de conséquence, les programmes des écoles s'augmentaient d'un volet histologie, tandis que les initiatives universitaires puis des écoles vétérinaires se poursuivaient. Les associations existantes poursuivaient leur action dans les techniques de routine. Pour les stages d'immunocytochimie, puis plus tard d'hybridation in situ, il fallait sortir de France.

Aux Pays-Bas, la V.H.N. (Vereniging Histotechniek Nederland) créée en 1980 par Bart Fisser organisait des congrès et des formations en immunocytochimie, hybridation in situ, autoradiographie, quantification en optique et électronique. Elle comptait 200 à 300 membres se réunissant dans une ambiance d'efficacité. Au Royaume-Uni, la I.H.D.G. (Industrial Histology Discussion Group) créée en 1980 par Margaret Knowles, issue de l'industrie pharmaceutique, rajoutait aux techniques de laboratoire, les problématiques des centres de recherches comme l'assurance qualité et la gestion des études. Elle réunissait une centaine de membres dans une ambiance club. En Suisse, la S.S.H.T. (Swiss Society of Histotechnology) créé en 1982 par André Bexter réunissait la synthèse des deux précédentes en terme d'organisation et de programmation. Le tout en 4 langues. En Europe, la E.S.H. (European Society of Histotechnology) créée en 1990 par André Bexter, était une fédération d'associations indépendantes à direction tournante. En préalable, il fallut donc créer l'AFH.

Retour à la création de l'AFH. En avril 1986, un sondage était envoyé à tous les laboratoires d'anatomie pathologique de France et suite à l'analyse des réponses, un bureau constitutif était réuni en présence d'André Bexter à Tours le 23-24 novembre 1987. Le premier bureau se composa de : Marc Andreu Président, Bernard Doublet Vice-Président, Françoise Paillard Secrétaire, Michel Olivier Secrétaire adjoint et Michèle Tardieu Trésorière. Cette création n'aurait pu se faire sans l'appui de la direction Pfizer d'Amboise, et pour la rendre durable (1), sans l'engagement des différents bureaux de l'association, bénévoles, membres et commerciaux. Depuis l'informatisation des fichiers et l'usage des adresses électroniques, nous avons recensé plus de 541 membres adhérents à notre association, répartis sur toute la France mais aussi en Belgique, Côte d'Ivoire et Cameroun, Maroc, Hongrie... Mais l'AFH, c'est avant tout des bénévoles qui depuis 30 ans œuvrent à perpétuer la vie et les actions de notre association. Nous aimerions ici mettre à jour la liste que Dominique Côme avait déjà établie en 2007 (2). Nous commencerons par les 4 Présidents qui se sont succédés, dont deux participent aujourd'hui à l'écriture de cet éditorial : Marc Andreu de 1987 à 1994, actuellement membre d'honneur – Catherine Guichard de 1995 à 2001 – Dominique Côme de 2002 à 2010 – Nathalie Accart de 2011 à aujourd'hui. Les trésoriers et secrétaires forment les deux autres piliers de cet édifice. Les secrétaires sont Françoise Paillard de 1987 à 1991 – Catherine Guichard de 1992 à 1994 – Marc Andreu de 1995 à 1996 – Natacha Miceli de 1997 à 2004 – Nicole Grançon de 2005 à 2010 – Dominique Côme de 2011 à

2012 – Alain Fautrel de 2012 à 2015 - Sophie Luccantoni de 2016 à aujourd'hui. Les trésoriers sont Michel Tardieu de 1987 à 1990 – Bela Simoes de 1991 à 1994 – Catherine Cannet de 1995 à 2001 – Noël Cruccioli de 2002 à 2007 – Christelle Gérard de 2008 à 2013 – Nicolas Gadot de 2014 à aujourd'hui. Nous ne voudrions pas oublier les responsables de la revue, du site internet, des relations avec les firmes ou la communication, les adjoints en charge des reportages, sans oublier les Vice-Présidents. Parmi ceux qui ne sont pas encore cités, nous nommerons Bernard Doublet, Sandra Dovero, Michel Olivier, Sylvie Trassard, Christine Guillermo, Danièle Raison, Chantal Cauty, Gwenaëlle Randuineau, Patricia Cavelier, Lydie Ventéo, Lydie Guigand, Alain Fautrel et Jérôme Amiaud, sans oublier Anna Bencsik et Lucie Fontaine qui ont posé leur candidature pour faire partie de cette longue liste de membres du bureau de l'AFH. Tous ont œuvré et oeuvreront encore pour que vive notre Association.

En attendant de vous rencontrer ou de vous revoir lors de nos prochaines journées de rencontre, nous nous faisons les porte-parole de tous nos membres fondateurs et bénévoles du bureau pour encore une fois vous remercier de votre soutien dans toutes nos actions.

VOUS êtes l'association.

Longue vie à tous pour fêter ensemble nos 40, 50,ans !!!!

(1) TAYOT J. : Discours d'ouverture. *Rev.fr.histotechnol.*, 1988, 1, n°1, p.54-55

(2) COME D : L'Association Française d'Histotechnologie : 20 ans. *Rev.fr.histotechnol.*, 2007, 20, n°1, p.11-15

L'INSTITUT MEDICO-LEGAL DE PARIS

Bertrand LUDES, Isabelle PLU

Institut Médico-Légal
2 Place Mazas, 75012 PARIS

INTRODUCTION

Le bâtiment actuel de l'Institut de Médecine Légale (IML) situé au 2, place Mazas sur le quai de la Rapée a remplacé la Morgue du quai de l'Archevêché. La Morgue était située non loin de l'abside de Notre-Dame et était inappropriée pour remplir les missions d'un tel établissement, qui sont actuellement d'ordre funéraire et judiciaire.

Sur le plan judiciaire, il s'agit de la réalisation d'expertises, le plus souvent pénales. Elles comportent la pratique d'autopsies médico-légales et d'examen externes à la demande des magistrats relevant des Tribunaux de Grande Instance de Paris, Bobigny, Créteil et Melun. Sur le plan de l'activité funéraire, l'IML a une mission de morgue municipale.

HISTORIQUE

L'Institut Médico-Légal a été construit place Mazas entre la boucle de la ligne n°5 du métropolitain et la Seine, près du pont d'Austerlitz (**Figure 1**). Il est initialement constitué de deux étages. Un étage supplémentaire en préfabriqué y a été ajouté pour abriter le laboratoire de toxicologie de l'Institut National de la Police Scientifique.



Figure 1 : Institut Médico-Légal de Paris (copyright Isabelle Sec)

Le Professeur BROUARDEL (1837-1906) réclamait la construction d'un nouvel Institut de Médecine Légale depuis 1882 mais des difficultés budgétaires n'avaient pas permis au projet de se concrétiser. Le Professeur THOINOT (1858-1915), pré-décesseur du Professeur BROUARDEL, avait déjà participé à une commission qui

rédigea un programme de construction d'un bâtiment pour un nouvel Institut Médico-Légal dont l'exécution fut confiée à Monsieur TOURNAIRE, architecte en chef du département de la Seine.

La construction commencée en 1912 par d'importants travaux de fondations en raison du sol fragilisé par des alluvions fut interrompue par la déclaration de la guerre en 1914. Les travaux reprisent en 1920.

L'Institut Médico-Légal de l'époque devait déjà remplir les conditions suivantes :

- assurer la conservation d'une centaine de cadavres et parer aux nécessités résultant des grandes catastrophes ;
- disposer de laboratoires, notamment de toxicologie ;
- disposer d'un amphithéâtre pour l'enseignement de la médecine légale et les démonstrations d'autopsie devant les étudiants ;
- de respecter les meilleures conditions au point de vue de l'hygiène ;
- permettre un traitement décent et digne des corps.

Il comportait à l'époque au rez-de-chaussée :

- des cases frigorifiques, une salle d'autopsie, des salles de conservation des scellés, une salle d'attente pour les familles lors du départ des corps,
- quatre salons funéraires,
- un appareil photographique à poste fixe destiné aux clichés des cadavres.

Quant au premier étage, il comportait :

- deux salles d'autopsie, un musée-bibliothèque (**Figure 2**), un amphithéâtre avec une table d'autopsie pour les démonstrations,
- un atrium et une cour intérieure réservée aux opérations techniques. À cette époque, 3 représentations avaient été reconstituées par le peintre MORISSET sur un mur de briques de l'atrium, grâce aux procédés médiévaux de la peinture sur briques. Le tableau central représentait deux jeunes filles cueillant les pommes d'or de l'arbre de la science (**Figure 3**).

Cet institut permettait d'assurer les trois missions des professeurs, à savoir, l'enseignement, la recherche et les missions judiciaires. L'enseignement était déjà dispensé aux étudiants en médecine, aux médecins désireux de se spécialiser en médecine légale, aux magistrats, aux étudiants en Droit, aux commissaires et inspecteurs de la sûreté. Les cours théoriques étaient enseignés à la faculté de médecine pendant le semestre d'été et l'enseignement pratique à l'IML pendant le semestre d'hiver. Cet enseignement pratique comportait tel que le souhaitait le Professeur BROUARDEL l'assistance à des autopsies judiciaires à raison de 3 séances par semaine et la réalisation de travaux pratiques de criminalistique comportant l'étude des tâches de sang, de sperme, etc..., et des études de toxicologie. Un enseignement pratique de la psychiatrie avec examen de malades et rédaction de rapport étaient organisés à cette époque à l'hôpital Sainte-Anne.



Figure 2 : La bibliothèque de l'Institut de Médecine Légale

Lors de l'inauguration du bâtiment, il était doté de laboratoires permettant les recherches les plus variées en médecine légale et en police scientifique. Il s'agissait non seulement d'un laboratoire de toxicologie mais aussi d'un laboratoire de biologie pour rédiger les examens de tâches de sang, de sperme, des poils, l'analyse des os et de tous les produits d'origine humaine ou animale. Le but étant d'orienter les investigations de police judiciaire dans les enquêtes criminelles.

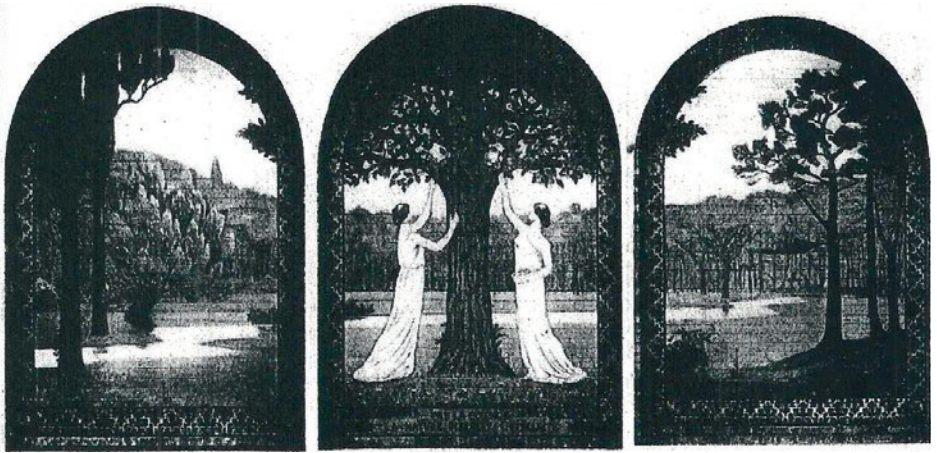


Figure 3 : Les peintures de MORISSET. Le panneau central montre deux femmes cueillant les pommes d'or de l'arbre de la science.

L'Institut Médico-Légal actuel

Pour assurer ses missions, l'IML est équipé de cinq tables d'autopsie dont celles de l'amphithéâtre, de 400 places réfrigérées dont une salle pouvant accueillir 150 corps (indispensable lors de l'accueil d'un grand nombre de décès).

L'imagerie post-mortem standard est réalisée dans les locaux de l'IML, les scanners post-mortem se font au Centre Hospitalier Sainte Anne et à l'Hôtel-Dieu (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP – HP)).

Une salle de présentation permettant d'accueillir les familles est spécialement conçue pour présenter les corps sous scellés judiciaires aux familles, le défunt étant isolé par une baie vitrée.

L'activité actuelle concerne environ 1450 autopsies et 1500 examens externes par an.

Cette activité est réalisée par dix médecins légistes intervenant sur réquisition judiciaire. D'autres spécialistes interviennent pour réaliser les missions judiciaires au quotidien, notamment les odontologistes spécialisées en identification

odontologique, les radiologues, les psychologues cliniciennes. Il convient de souligner qu'un poste d'anthropologiste médico-légal a été créé depuis le 1^{er} septembre 2016 pour réaliser l'identification des personnes admises sous X à l'IML et pour assister le directeur dans l'organisation de l'accueil des défunts en cas de catastrophes collectives et d'afflux de décès en masse (attentats, catastrophes aériennes, catastrophes naturelles).

Au plan technique et administratif, 23 techniciens, 3 secrétaires, 7 agents d'accueil, 4 psychologues cliniciennes, ainsi que 3 agents techniques et 4 personnels chargés de l'entretien concourent au bon fonctionnement de cet établissement.

Les examens complémentaires sur les prélèvements réalisés lors des autopsies concernent notamment les disciplines de bactériologie, virologie, anatomopathologie, toxicologie, et la recherche de diatomées dans le cadre de décès par noyade sont confiés par les magistrats à des laboratoires extérieurs à l'IML. Cette mesure est temporaire puisqu'aucune activité d'analyse biologique n'est possible pendant toute restructuration du bâtiment.

PERSPECTIVES

Les perspectives consistent à effectuer une modernisation du bâtiment et de son fonctionnement afin d'obtenir une accréditation européenne. Ainsi, la première tranche de travaux comporte l'installation d'un scanner qui sera mis en place au courant du premier trimestre 2017 et la modernisation de l'architecture informatique de l'IML pour permettre une traçabilité des opérations médico-légales.

La deuxième phase de travaux comportera une modification de l'architecture interne de l'Institut pour permettre un meilleur isolement des salles d'autopsie et pour contribuer à l'amélioration des conditions d'hygiène.

La troisième phase de travaux comportera l'installation d'un laboratoire de biologie post-mortem adossé à l'équipe CNRS AMIS 5288 qui sera installé dès que les locaux nécessaires seront disponibles.

CONCLUSION

Les travaux entrepris par la Préfecture de Police et l'apport scientifique des Universités Paris Descartes et Pierre et Marie Curie permettent à cet établissement d'accomplir ses missions judiciaires et il sera, dans le futur, un centre d'enseignement et de recherche de référence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CV BALTHAZAR : l'Institut Médico-Légal de l'Université de Paris. Annales de médecine légale tome III, 1926, 1 : 325-345.

LA GESTION DE LA SCENE D'INFRACTION

Major Richard JUNCA

Responsable du Groupe des Unités Spécialisées et de la Maintenance Opérationnelle à la Sous-direction de la Police Technique et Scientifique.

ConsTox, 31 avenue Franklin Roosevelt, 69134 ECULLY Cedex

INTRODUCTION

« La scène de crime ou scène d'infraction, selon la dénomination de la police nationale française s'il ne s'agit pas d'un crime au sens strict, comprend à la fois les lieux où s'est produit un crime, un délit ou un accident d'origine éventuellement criminelle, mais aussi l'état de ces lieux. » (Définition Wikipédia)

Aujourd'hui, les actes de la police technique et scientifique jouent un rôle majeur dans le procès pénal : les personnes condamnées ou disculpées grâce à la preuve scientifique sont légendes. Les constatations sur une scène de crime constituent un acte judiciaire essentiel dont peut dépendre la réussite de l'enquête. Les grandes affaires criminelles de ces dernières décennies, pour lesquelles il n'existe pas encore de dénouement, ont toutes un dénominateur commun : des constatations bâclées.

Lors de ces constatations, les techniciens de l'identité judiciaire (spécialité de la Police Technique et Scientifique) jouent un rôle primordial. Certaines polices occidentales ont d'ailleurs confié aux « experts » la responsabilité juridique des constatations. C'est sans doute la raison pour laquelle les séries télévisées sur le sujet sont aujourd'hui si nombreuses.

La scène d'infraction

C'est le principe d'échange d'Edmond LOCARD selon lequel « une triple interaction se produit entre le milieu ambiant, le criminel et la victime », qui guide les actes des techniciens de la scène de crime. Deux missions essentielles vont prévaloir lors de leurs investigations : « fixer les lieux » c'est-à-dire reproduire l'état des lieux de la scène de crime telle qu'elle est découverte, et rechercher des traces et indices pour identifier les auteurs et les victimes. La méthodologie de gestion de la scène d'infraction par les personnels de la police technique et scientifique, se décompose en quatre phases.

La prise en compte de la scène d'infraction

Les personnels de police primo-intervenants effectuent les premières diligences en établissant notamment un périmètre de sécurité pour préserver les lieux. Cette phase correspond au temps d'observation nécessaire pour comprendre la situation. Avant toute pénétration dans les lieux, le technicien doit avant tout recueillir toutes les informations utiles auprès des témoins, policiers et services de secours déjà sur place et qui assurent la sécurisation des lieux, dénombrent les victimes, les auteurs présumés sans modification de la scène. Il doit ensuite revêtir l'équipement de protection indispensable pour ne pas polluer les lieux et veiller à ce que toute personne entrant sur la scène soit également revêtue. Enfin des photos ou vidéos, dites de sécurité, sont réalisées pour fixer la scène d'infraction. Ces images, éventuellement insérées dans le rapport final lors de scène de crime majeure, peuvent également illustrer un briefing préalable pour adopter la meilleure méthodologie dans la poursuite des constatations. Au-delà des outils conventionnels de capture d'image que sont les caméras et appareils photographiques, le technicien peut utiliser aujourd'hui des appareils intégrés sur tablette ou téléphone (ces derniers pouvant également servir à la prise de note sur des logiciels dédiés), ou plus performants comme des drones ou laser-scanners.

Recherche et matérialisation des traces et indices

Afin de traiter la scène de façon exhaustive, une stratégie de progression est définie. Le technicien examine chaque zone de façon minutieuse, en utilisant des appareils d'éclairage en lumière blanche ou colorée. Ces sources de lumières permettent de

mettre en évidence des traces et indices, grâce aux propriétés de luminescence de la matière. À chaque découverte l'opérateur matérialise avec un cavalier numéroté chaque indice. Ces opérations permettent aussi de traiter la scène dans son ensemble. Aujourd'hui des recherches sont menées afin d'améliorer la mise en évidence de ces traces et indices, par leur caractérisation spectrale individuelle.

Fixation des lieux

Cette phase consiste à photographier la scène dans le détail. Ainsi tous les indices matérialisés sont photographiés dans leur contexte, mais également en prise de vue rapprochée et de détail (macrophotographie). Un plan des lieux est réalisé, présentant le positionnement des victimes et de chaque indice. Le technicien dispose dorénavant d'outils performants, facilitant ces opérations, tout en améliorant le rendu. Au mètre ruban et planche à dessins se substituent aujourd'hui la tablette et le télémètre laser. L'enquêteur peut réaliser une visite virtuelle interactive de la scène, permettant ainsi une meilleure compréhension des faits par les magistrats et lors des audiences des juridictions de jugement.

Prélèvements des traces et indices

Enfin, le technicien doit déterminer l'ordre des prélèvements des traces et indices matérialisés par les cavaliers. Ainsi les traces et indices les plus fragiles sont prélevés en priorité, tels les résidus de tir ou les traces odorantes. La durée de prélèvement des traces odorantes (les supports sont enveloppés de tissus pendant 1 heure au minimum), contraint l'opérateur à commencer sa manipulation dès le début de la deuxième phase. La recherche de traces papillaires par les poudres conventionnelles est le dernier acte accompli sur la scène, de par le caractère très polluant de ce procédé.

CONCLUSION

Si cette méthodologie reste la règle en matière de traitement d'une scène de crime, elle est toutefois adaptée en fonction du type de scène traitée. Ainsi dans le cadre d'attentat, au vu du nombre de victimes et la multitude d'éléments à traiter, une méthodologie spécifique est déclinée, prenant en compte les zones de dispersion

et la nécessaire cohabitation avec les autres entités concourant à la résolution des difficultés engendrées par ce type de crise (services de secours, déminage, ordre public, identification des victimes...).

Les services opérationnels de la police technique et scientifique, sont aujourd'hui les artisans essentiels de l'enquête criminelle. Nul doute qu'avec l'apport des nouvelles technologies, leur travail au quotidien n'en sera que plus efficace.

APPORT DES TECHNIQUES HISTOLOGIQUES EN ANTHROPOLOGIE MEDICO-LEGALE

Catherine CANNET

*Laboratoire d'histomorphométrie, Institut de Médecine Légale
11 rue Humann, 67085 STRASBOURG Cedex*

Mots clés : histologie, anthropologie médico-légale, os secs, paraffine, décalcification, délai post-mortem (PMI), délai post-traumatique, hématoxyline et éosine, picrosirius, safranine-O, martius scarlet red methyl blue, Grocott

RESUME

En anthropologie médico-légale, lors de la découverte de restes osseux plusieurs questions fondamentales se posent :

- s'agit-il d'ossements humains ou animaux ?
- les ossements appartiennent-ils au même sujet ?
- dans le cas d'une origine humaine, quel était le sexe de l'individu, sa stature et à quel âge est-il décédé ?
- quel est le délai post-mortem ?
- si des lésions osseuses sont observées, sont-elles pathologiques ? traumatiques ? quel est le délai post-traumatique ?

Lorsque le squelette est plus ou moins complet, l'anthropologie peut avancer une majorité de réponses. Par contre, lors de la présence de fragments osseux ou pour l'estimation des délais post-mortem et/ou post-traumatique, l'histologie est susceptible d'apporter un complément d'information appréciable. Bien que l'os soit un tissu difficile à traiter dans un laboratoire d'histologie du fait de sa

matrice calcifiée, il constitue, dans un contexte médico-légal, un indice sur lequel il faudra « procéder à toute recherche utile à la manifestation de la vérité ». La technique histologique, dans ce contexte peut ne pas différer de celle utilisée couramment dans un laboratoire d'anatomo-pathologie. La seule contrainte est le traitement des os secs, qui doivent être réhydratés avant tout traitement. De plus une attention particulière sera apportée à la décalcification, surtout en ce qui concerne les fragments osseux d'origine ancienne.

Des colorations spéciales, telles que le picrosirius observé en lumière polarisée, la safranine O conjuguée au vert solide ou la coloration au MSB sont tout à fait réalisables sur coupes d'os même secs. Une technique histologique méthodique et rigoureuse, allant de la fixation aux colorations spéciales peut permettre de révéler de nombreux indices qui aideront au déroulement de l'enquête.

INTRODUCTION

En anthropologie médico-légale, lors de la découverte de vestiges humains, plusieurs questions fondamentales se posent (origine humaine ou animale, âge au décès, stature de l'individu, délai post-mortem des ossements, présence de lésions traumatiques, cause du décès...). Lorsque le squelette est plus ou moins complet, l'anthropologie peut avancer une majorité de réponses par un examen externe minutieux des éléments osseux. Mais en complément de l'analyse des corps squelettisés ou lors de la présence de fragments osseux, l'examen microscopique du tissu osseux peut être mis à profit pour aider à l'estimation de l'âge au décès (1, 2, 3), pour confirmer la nature humaine ou non des fragments osseux (4), pour estimer le délai post-mortem (5, 6, 7, 8), pour mettre en évidence la nature traumatique ou pathologique d'une lésion osseuse (9) et pour évaluer le délai post traumatique (10, 11, 12).

L'os est un tissu difficile à traiter dans un laboratoire d'histologie du fait de sa matrice calcifiée. La technique utilisée pour l'obtention des coupes va dépendre de la taille de l'échantillon, de l'urgence de la réponse anatomopathologique, de la partie osseuse étudiée (matrice calcifiée ou matrice organique), des colorations finales ou de la présence éventuelles d'éléments exogènes (traces de poudre, cristaux...).

En pathologie comme en médecine légale, les fragments osseux entourés de tissus mous (périoste, tendon, muscle...) sont décalcifiés afin de pouvoir être inclus en

paraffine. Dans ces deux cas, l'analyse des réactions cellulaires intervenant dans la matrice biologique est indispensable pour poser un diagnostic soit de pathologie soit éventuellement de cause de mort avec datation des lésions traumatiques.

En anthropologie médico-légale, seule la matrice calcifiée subsiste avec parfois du tissu mou résiduel momifié. De ce fait, des méthodes spécifiques sont employées (13) dont la plus couramment utilisée est l'abrasion. Mise au point par Frost (14) elle a ultérieurement été modifiée par Maat (15). Des fragments osseux de 0,5 à 1 cm d'épaisseur sont inclus en résine (16) ou laissés à l'état sec (17). Ces tranches osseuses sont ensuite amincies par usure progressive sur des abrasifs de grain décroissant jusqu'à une épaisseur de 50 à 125 μm . Les coupes fines sont ensuite déposées sur lame et protégées par une lamelle dans une goutte de résine synthétique. L'observation se fait en lumière polarisée (**Figure 1**) ou en lumière transmise. Les coupes peuvent aussi être micro-radiographiées. Une seule coloration est possible car des coupes sériées ne peuvent pas être réalisées. Cette méthode permet d'obtenir des coupes d'os de grande taille. De plus, c'est la seule technique qui soit applicable aux os archéologiques dont la matrice minérale est très friable ou en voie de fossilisation.

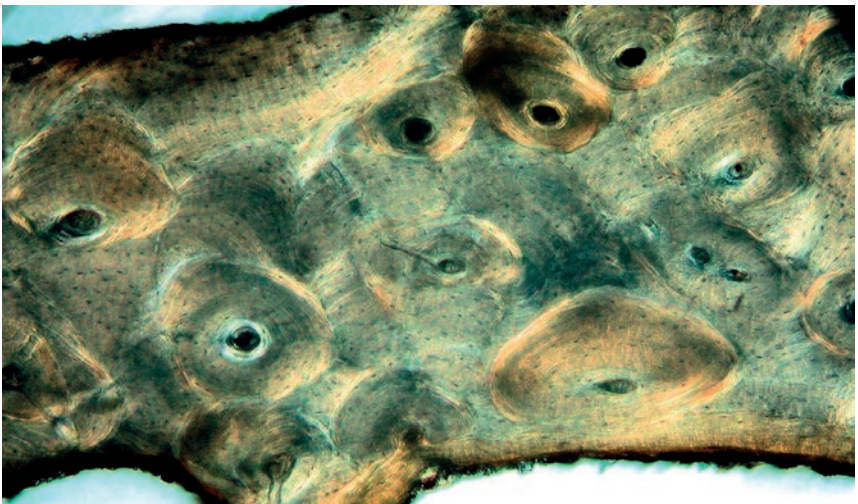


Figure 1 : Corticale costale en absence de coloration histochimique. Aspect de la microstructure osseuse d'une coupe obtenue après abrasion sans inclusion en résine et observée en lumière polarisée.

L'inclusion en paraffine n'est pas habituellement pratiquée en anthropologie médico-légale. Cette méthode a été validée par Telmon (18) en comparant l'estimation de l'âge au décès à partir de côtes décalcifiées et incluses en paraffine et de côtes non décalcifiées et abrasées. Cette technique peu onéreuse et ne nécessitant pas d'équipement particulier est réalisable dans tout laboratoire d'histologie travaillant avec la paraffine. Elle permet d'obtenir des coupes sériées qui pourront être colorées différemment afin de mettre en évidence tout indice qui aidera au déroulement de l'enquête. Cette méthode a été choisie et de nombreuses colorations spéciales peuvent être réalisées même sur fragments osseux desséchés.

MATERIELS ET METHODES

Des tranches osseuses de fémur (n = 17) de 1 à 2 cm d'épaisseur et des fragments de côte (n = 32) d'un maximum de 3 cm de longueur ont prélevées et mis à fixer dans du formol à 10% tamponné, pH 7,2. Si les os présentaient un aspect très sec, ils ont été au préalable réhydratés dans du liquide de Ruffer I composé de formaldéhyde à 37% (1 volume), de carbonate de sodium à 5% (2 volumes) et d'eau distillée (97 volumes) (19). En fonction de l'état de dessiccation de l'os, la réhydratation était effective entre 6 et 48 heures. A l'issue de la réhydratation les fragments osseux ont été fixés. La durée de la fixation, que l'os ait été réhydraté ou non, a été d'un minimum de 21 jours, ceci afin de stabiliser les structures tissulaires fragilisées par les phénomènes d'autolyse et de putréfaction mais aussi en vue de conserver pour observation la présence d'éventuels parasites exogènes.

Une fois fixés, les fragments osseux ont été décalcifiés. La décalcification consiste à retirer les sels de calcium de la matrice extracellulaire afin de pouvoir inclure les échantillons en paraffine pour en faire des coupes fines. La solution de décalcification employée est le liquide de Kristensen, composé d'acide formique et de formate de sodium (20). Cette méthode de décalcification utilise un acide faible et est de ce fait moins agressive pour le tissu osseux, spécialement lorsqu'il se présente sous forme d'os sec. Les temps de décalcification ont varié de 12 heures à 15 jours en fonction de la dureté du fragment osseux.

A l'issue de la décalcification, les fragments ont été rincés 2 heures sous eau courante puis déshydratés selon le schéma appliqué aux organes de routine (cycle de 19h : éthanol de 50% à 100% puis xylène) et inclus dans une paraffine dont le point de fusion est de 62 - 64°C (Peel-a-way paraffin embedding wax, Ref: 19304-

01, EMS, Philadelphia). Cette paraffine à haut point de fusion permet d'assurer une meilleure matrice d'enrobage à l'os et une coupe plus aisée.

Des coupes de 6 µm ont été faites et les colorations suivantes réalisées :

- a. Hématoxyline / Eosine (H&E) pour l'étude de la morphologie générale.
- b. Picrosirius (PS) (21, 22) pour la mise en évidence de la micro-anatomie osseuse observée en lumière polarisée. Le rouge Sirius F3B (Color Index (C.I.) 35782) est un colorant spécifique du collagène dont la longue molécule linéaire vient se fixer parallèlement sur les fibres de collagène, augmentant ainsi leur biréfringence. Cette méthode de coloration permet d'obtenir des images hautement contrastées nécessaires pour l'observation et la quantification des structures microscopiques osseuses (23).
- c. Martius Yellow / Scarlet red / Methyl blue (MSB) (24) pour la mise en évidence de la fibrine. Cette coloration est un tétrachrome qui permet l'observation de l'ancienneté des dépôts de fibrine en fonction de l'état de polymérisation plus ou moins avancée de cette dernière. Les colorants acides utilisés et dont les poids moléculaires sont très différents, vont se fixer sur les fibres de fibrine en fonction de la perméabilité du réseau fibrineux, permettant sa différenciation en fibrine «jeune» ou «âgée».
- d. Safranine O / vert solide (SO/FG) (25) pour la mise en évidence du cartilage en voie de minéralisation. La safranine O (C.I. 50240) est un colorant basique qui possède une forte affinité pour les protéoglycanes constitutives du cartilage. Le vert solide FCF (C.I. 42053) est un colorant acide qui se fixe sur les protéines collagéniques. Cette coloration est importante pour évaluer le stade de réparation osseuse dans le cas de fractures.
- e. Grocott (26) pour la mise en évidence des champignons et levures. Les mucopolysaccharides de la paroi fongique sont oxydés afin de libérer les groupements aldéhydes. Ces derniers vont réagir avec le nitrate d'argent présent dans le complexe d'argent méthénamine, réduisant l'argent à son état métallique.

Les colorations H&E et PS sont réalisées sur toutes les coupes osseuses, les autres colorations sont faites en fonction de la réponse à apporter d'un point de vue médico-légal.

BIOEROSION ET DELAI POST-MORTEM

La bioérosion est la dégradation progressive du tissu calcifié suite à l'action conjuguée des enzymes et bactéries endogènes ainsi que des bactéries et parasites exogènes (5, 7). L'évaluation de la bioérosion se fait en déterminant un degré de dégradation des microstructures osseuses par l'attribution d'un index de préservation histologique (HPI – Histological Preservation Index) tel que défini par Haynes (8). Cet index classe la préservation des microstructures osseuses en 5 catégories de HP 1 : aucune ou pratiquement aucune structure osseuse microscopique reconnaissable à HPI 5 : microstructure osseuse reconnaissable sur au moins 95% de la surface totale de l'échantillon.

En anthropologie médico-légale, le délai post-mortem (PMI) est le temps mis pour la dégradation des tissus calcifiés. C'est le délai entre la mort du sujet et la découverte du corps. Ce délai est un élément très important dans un contexte médico-légal car il permet de discriminer les cas médicaux-légaux, dont la prescription criminelle est de 10 ans en France, des cas archéologiques. La détermination de ce délai est intimement liée aux conditions environnementales de conservation du corps. Une étude microscopique réalisée par Yoshino (6) sur la décomposition post-mortem d'os compacts placés dans différents environnements (sol, eau et air) a mis en évidence une bioérosion osseuse se limitant à la présence de quelques vacuoles consécutives à l'attaque bactérienne après 5-6 ans d'enfouissement dans le sol, après 4-5 ans pour des os immergés, et aucune dégradation microscopique pour ceux exposés à l'air libre pendant 15 ans.

Voici un exemple de bioérosion. Un héli-fémur a été retrouvé dans des vignes. L'observation macroscopique de la section de coupe de la diaphyse montre une absence de dégradation de la corticale qui présente un aspect très compact (**Figure 2**). Par contre, à l'observation microscopique il est noté une bioérosion localisée en région postérieure du fémur se traduisant par une absence multifocale de la coloration (**Figure 3**). A plus fort grossissement il apparait que la détermination de l'index de préservation histologique est différent au sein de la même corticale. Il est de 4 en région sous périostique, ce qui correspond à des structures microscopiques reconnaissables sur plus de 80% de la surface totale, de 5 pour la partie centrale de la corticale et de 3 pour la région sous endostique (**Figure 4**). Ce type de dégradation est caractéristique de la bioérosion d'un sujet en décubitus dorsal. L'intervalle post-mortem est donc estimé comme très largement supérieur à 10 ans.



Figure 2 : Aspect macroscopique d'une coupe transversale de diaphyse fémorale. Noter l'absence de dégradation osseuse de la corticale fémorale qui présente un aspect compact.

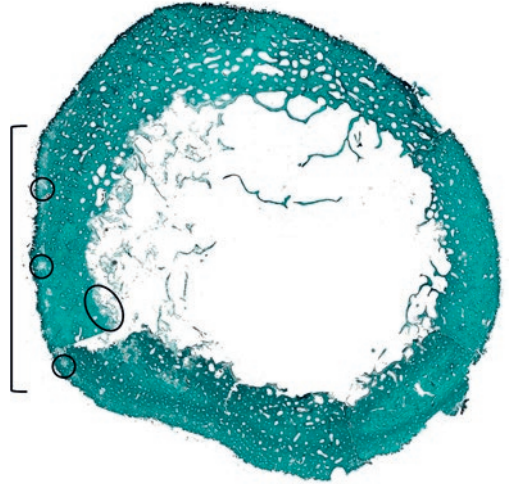


Figure 3 : Aspect microscopique de la même coupe transversale de diaphyse fémorale – Coloration Grocott. La bioérosion est localisée à la face postérieure du fémur (()) et se traduit par une absence multifocale de la coloration (O).

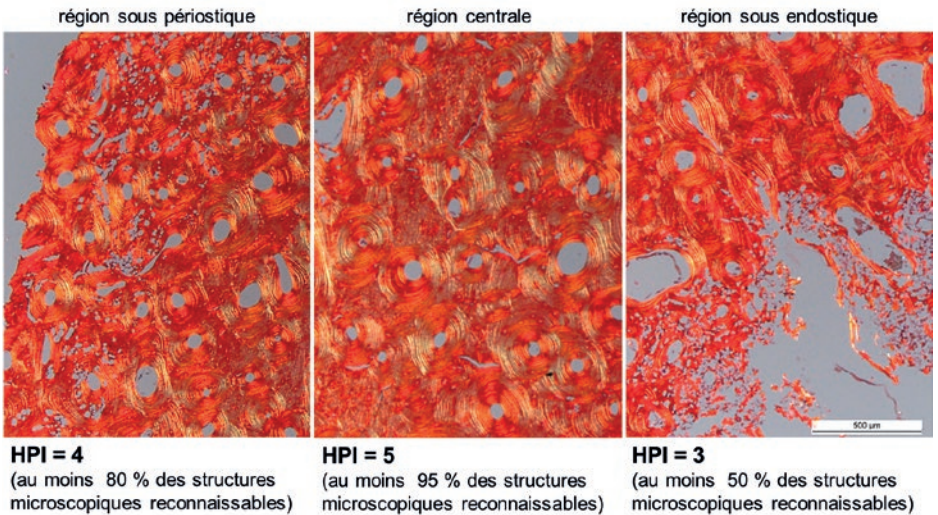


Figure 4 : Différences de préservation des structures microscopiques au sein de la corticale fémorale – Coloration PS + polarisation. Score selon Haynes (8).

A très fort grossissement, deux types de la dégradation du tissu osseux sont observables :

- la bioérosion par les bactéries qui se présente généralement sous forme de vacuoles. Ces vacuoles sont le plus souvent situées au niveau des lacunes ayant renfermé les ostéocytes (**Figure 5**),
- la bioérosion par les champignons qui est par contre moins discrète. Sur cette coupe deux éléments exogènes sont observés, qui pourraient être des champignons, mais qui pourraient aussi être des parasites végétaux, le fémur ayant été retrouvé dans un milieu herbeux. Afin de discriminer les deux hypothèses, une coloration de Grocott a été faite qui a permis de confirmer la présence de champignons (**Figures 6 et 7**).

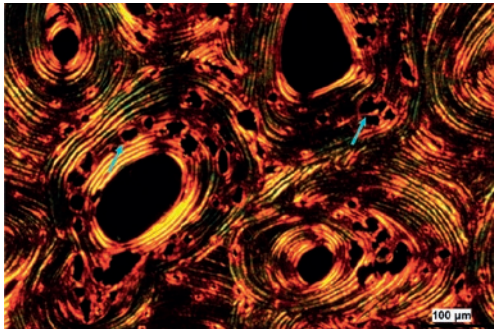


Figure 5 : Bioérosion par les bactéries – Coloration PS + polarisation. Noter la localisation particulière des vacuoles au niveau des lacunes (→).



Figure 6 : Bioérosion par les champignons – Coloration H&E. Présence d'éléments exogènes pouvant être des parasites végétaux ou des champignons (→).

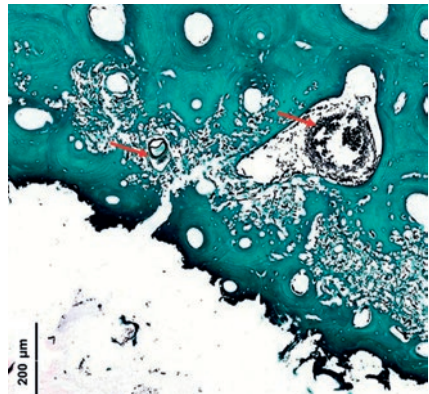


Figure 7 : Bioérosion par les champignons – Coloration Grocott. Confirmation de la présence de champignons par la coloration de Grocott (→).

ORIGINE HUMAINE OU ANIMALE DES OSSEMENTS

La détermination de l'espèce est assez facile lorsque les anthropologues disposent de squelettes entiers ou peu détériorés. En présence d'une diaphyse d'os long par exemple, il est possible de calculer un indice médullaire. Cet indice est égal au rapport du diamètre maximal du canal médullaire sur le diamètre minimal de la diaphyse (27). Cet indice est inférieur à 0,50 chez l'homme et varie entre 0,47 et 0,77 chez l'animal.

Mais lorsqu'il s'agit de fragments osseux les méthodes macroscopiques ne peuvent être appliquées et l'histologie est susceptible d'apporter une réponse (4, 28). En effet, il existe des différences architecturales du tissu osseux qui sont des caractéristiques d'espèce telles que :

- le diamètre des canaux de Havers (29) qui est le plus élevé chez l'être humain adulte,
- la présence d'os plexiforme (30, 31) qui est un type d'os lamellaire absent chez l'homme. Cet os se forme lorsque le tissu osseux doit se constituer rapidement, comme c'est le cas chez les bovins, les ovins ou les caprins. L'os plexiforme est une réponse physiologique à une demande imposée par un développement rapide du squelette (**Figure 8**),
- la présence de bandes d'ostéons (32) dont le nombre, l'alignement et la longueur des bandes constituent un critère de différenciation (**Figure 9**).

Afin de pouvoir comparer la microarchitecture osseuse d'un os inconnu avec une espèce connue, il est utile de se constituer une lamotheque d'os provenant de

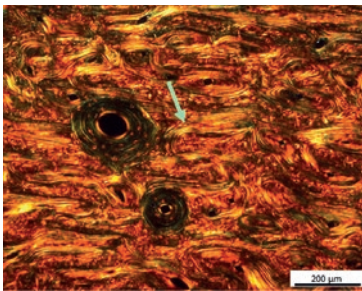


Figure 8 : Corticale de fémur de bœuf – Coloration PS + polarisation. Noter l'aspect sinusoidal des fibres de collagène caractéristique de l'os plexiforme (→).

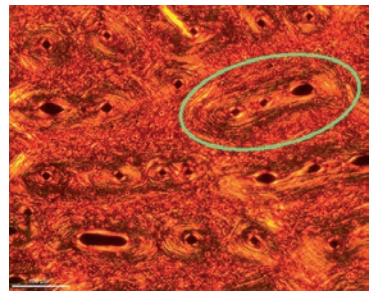


Figure 9 : Corticale de fémur de cygne – Coloration PS + polarisation. Noter l'aspect en « bande d'ostéons » (O).

différentes espèces animales. Cette comparaison systématique permettra d'exclure une origine humaine des fragments osseux.

DATATION DES LÉSIONS OSSEUSES TRAUMATIQUES

Suite à une fracture, le tissu osseux va se réparer naturellement jusqu'à restitution ad-integrum de la structure géométrique et fonctionnel de l'os. La réparation osseuse est une suite d'évènements séquentiels classiquement divisés en quatre phases (33, 12, 34, 11, 9) :

- 1. Le cal hémateux** - immédiatement après la fracture va se constituer un hématome péri-fracturaire accompagné de processus de coagulation. Cette phase dure environ 1 à 3 jours.
- 2. Le tissu de granulation** - le caillot va être envahi par les cellules inflammatoires avec prolifération de fibroblastes, de préostéoblastes et de chondroblastes avec formation d'un cal fibreux. Cette phase dure environ jusqu'à 14 jours.
- 3. Le cal conjonctif** ou **cal mou** - le foyer de fracture est le site d'une métaplasie cartilagineuse avec prolifération de chondrocytes pour former un cal conjonctif ou cal mou qui se constitue à la suite de la phase précédente et se prolonge jusqu'à environ J 28. Parallèlement les ostéoclastes vont commencer à résorber l'os en bordure de la fracture.
- 4. Le cal dur** - le cal conjonctif est progressivement envahi par les ostéoblastes qui vont construire le cal osseux définitif ou cal dur. Ce cal va ensuite se remodeler jusqu'à rétablissement de la structure géométrique et fonctionnelle de l'os. Cette étape est la plus longue puisqu'elle se prolonge sur plusieurs mois voire plusieurs années après la fracture.

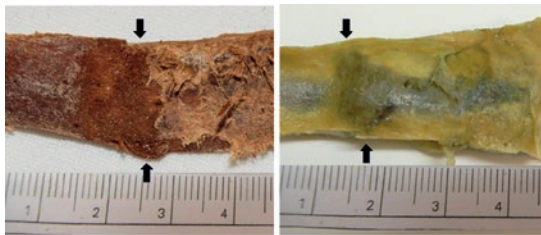
Cette séquence d'évènements va permettre de « dater » une fracture en attribuant un délai post-traumatique. Ce délai correspond au temps écoulé entre l'épisode traumatique et la mort du sujet.

En anthropologie médico-légale, le tissu osseux observé est dépourvu de tout élément cellulaire. Seuls subsistent les composants tissulaires. L'interprétation des lames devra donc se faire en « négatif » c'est-à-dire en interprétant, au niveau du tissu osseux, le résultat de l'activité cellulaire intervenante au cours des différentes phases de la réparation osseuse. De ce fait, il est pratiquement impossible de caractériser la phase du cal hémateux et donc d'attribuer un délai post-traumatique

inférieur à 2-3 jours. Dans ce cas, la fracture sera dite « péri-mortem », c'est-à-dire intervenue aux alentours de la mort.

Le cas suivant constitue un exemple d'application pratique. Le corps d'un sujet féminin est retrouvé totalement momifié.

Des lésions traumatiques sont observées sur de nombreuses côtes. Une analyse histologique a été demandée afin de confirmer la présence éventuelle de fractures ante-mortem et de définir l'intervalle post-traumatique. L'aspect très desséché des prélèvements a nécessité une réhydratation. Il apparaît que le cal osseux est plus visible après réhydratation (**Figure 10**). Une coupe transversale de la côte fait apparaître une fracture transverse déplacée avec de très importants cals périostés sur les faces interne et externe de la corticale (**Figure 11**). La fracture est dite « transverse » car elle concerne aussi bien la face interne que la face externe de la côte et « déplacée » car les deux corticales fracturées de chaque face ne sont plus dans l'axe.



Aspect du cal osseux avant réhydratation

Aspect du même cal osseux après réhydratation

Figure 10 : Aspect macroscopique du même cal osseux costal avant et après réhydratation. Le cal apparaît de façon plus visible après réhydratation.

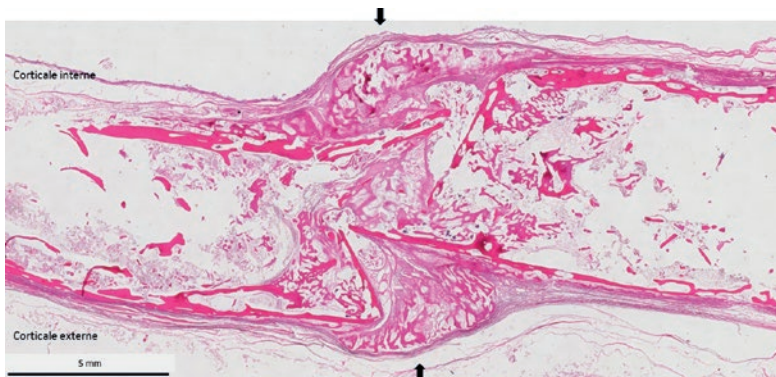


Figure 11 : Cartographie de la coupe transversale de la côte – Coloration H&E. Fracture transverse déplacée montrant de très importants cals périostés sur les faces interne et externe de la corticale (→).

De plus, l'os trabéculaire en regard des fractures présente un aspect fibreux ou fibrineux. Une coloration au MSB a été réalisée. Cette coloration n'a pas mis en évidence la présence de fibrine mais a confirmé le caractère fibreux du remaniement observé dans la cavité médullaire (**Figure 12**). En outre, au niveau des cals osseux il est noté la présence de chondrocytes. Une coloration à la SO/FG a été faite afin de connaître l'état de minéralisation du tissu cartilagineux présent. De nombreux chondrocytes hypertrophiés et non minéralisés sont observés ainsi que la présence de rares territoires de cartilage en voie de minéralisation (**Figure 13**). Un autre indice est la présence d'«encoches» le long des berges de fracture des corticales (**Figure 14**). Ces encoches correspondent à la résorption ostéoclastique des berges de fracture qui intervient généralement vers J14 après la fracture. Elles correspondent aux lacunes de Howship, conséquences de l'activité des ostéoclastes.

L'aspect histologique du cal osseux confirme la présence d'un phénomène de réparation osseuse consécutif à un traumatisme. Ces images correspondent à un cal fibro-cartilagineux en cours de minéralisation résultant d'une fracture antemortem survenue de 2 à 5 semaines avant le décès.

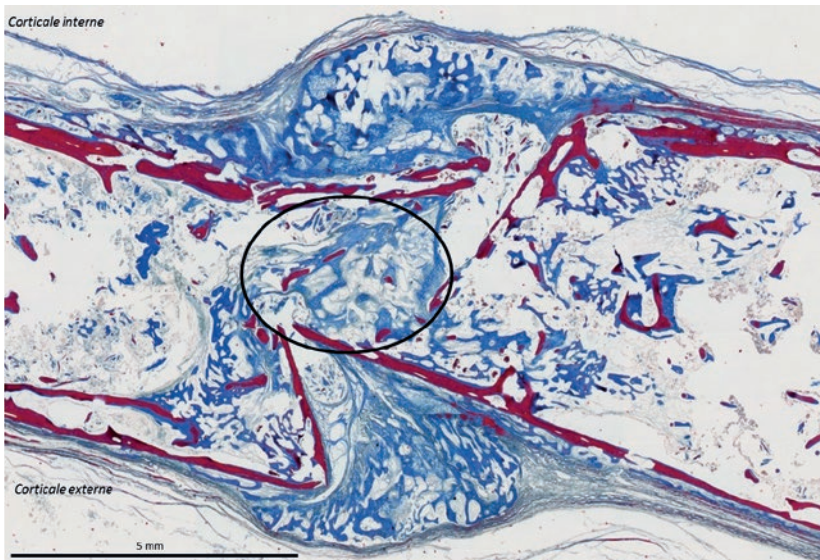


Figure 12 : Cartographie de la coupe transversale de la côte – Coloration MSB. Présence de fibres de collagène correspondant à un remaniement fibreux de l'os trabéculaire (O).

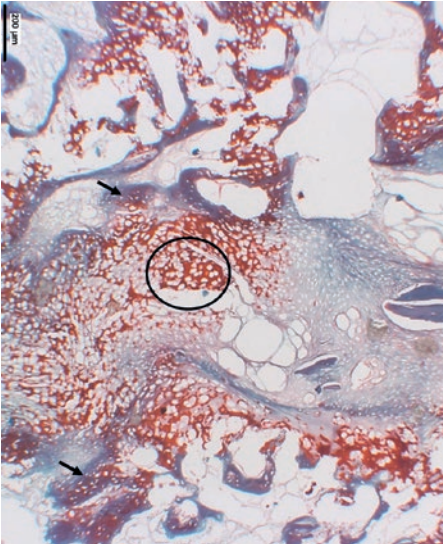


Figure 13 : Cal périosté de la face externe – Coloration SO/FG. Cartilage non calcifié avec chondrocytes (O) et rares territoires de cartilage en voie de minéralisation (→).

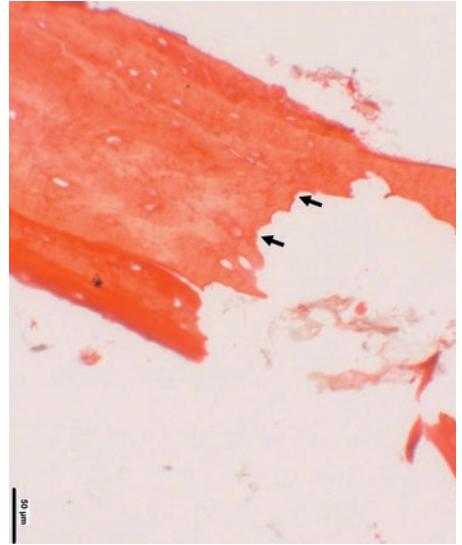


Figure 14 : Berges de fracture costale – Coloration PS. «Encoches» sur le bord de fracture correspondantes aux lacunes de Howship consécutives à l'activité ostéoclastique (→).

Il est à noter que cette fourchette d'estimation est dépendante des conditions de nutrition, de l'âge et des habitudes hygiéno-alimentaires du sujet. Une autre information relative au délai post-mortem peut être apportée. La présence résiduelle de graisses dans le tissu spongieux situe le délai post-mortem en dessous de 5-7 ans (35). Cette estimation est dépendante des conditions de conservation du corps.

Il est aussi important de pouvoir différencier une fracture ante-mortem d'une fracture post-mortem. Dans ce cas, l'observation microscopique attentive des berges de fracture à la recherche d'une réparation osseuse est indispensable. Seule la présence d'une réparation osseuse permet d'établir que la fracture est ante-mortem. En absence de signe d'activité cellulaire la fracture pourra être dite peri-mortem ou post-mortem. La différence se fera sur l'aspect des bords de fracture. Une fracture peri-mortem va présenter des berges « régulières » alors qu'une fracture post-mortem va montrer un aspect déchiqueté et arraché (**Figures 15 et 16**, respectivement). Ceci est dû au fait qu'une fracture peri-mortem intervient sur un os « frais » ayant conservé ses propriétés de souplesse alors qu'une fracture post-mortem intervient le plus souvent sur un os sec, ayant perdu toute élasticité.

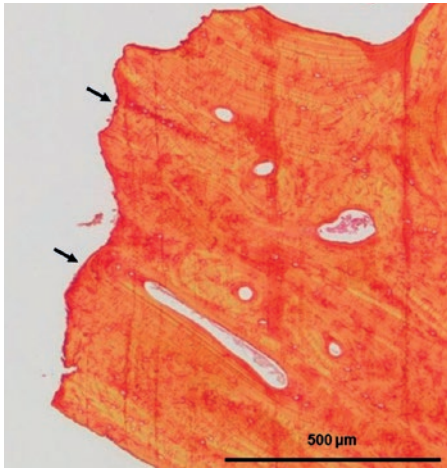


Figure 15 : Berge de fracture peri-mortem – Coloration PS + polarisation. Aspect « régulier » des berges de fracture dû à une fracture intervenant sur os « souple » (→).

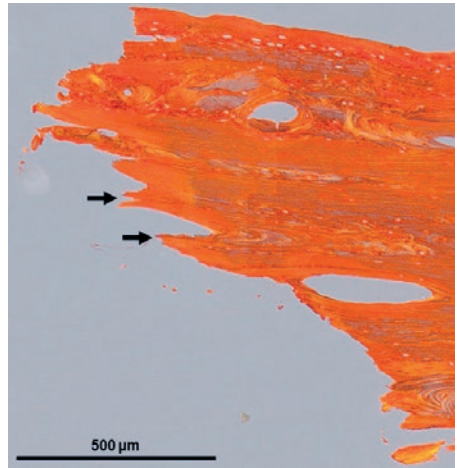


Figure 16 : Berge de fracture post-mortem – Coloration PS + polarisation. Aspect déchiqueté et arraché des berges de fracture dû à une fracture intervenant sur os desséché (→).

CONCLUSION

Dans un contexte d'anthropologie médico-légale, l'inclusion en paraffine des fragments osseux après décalcification permet d'apporter un complément d'informations appréciables. De nombreuses colorations spéciales peuvent être réalisées même sur des coupes d'os secs. Mais seule une technique histologique méthodique et rigoureuse peut permettre de révéler de nombreux indices qui aideront au déroulement de l'enquête.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KERLEY ER. The microscopic determination of age in human bone. *Am J Phys Anthropol*, 1965, **23**, 149-63.
2. STOUT SD, PAINE RR. Brief communication: histological age estimation using rib and clavicle. *Am J Phys Anthropol*, 1992, **87**, 111-115.
3. CANNET C. Histomorphometric estimation of age in paraffin-embedded ribs. *Int J Legal Med*, 2011, **125**(4), 493-502.

4. HILLIER ML, LYNNE SB. Differentiating human bone from animal bone : A review of histological methods. *J Forensic Sci*, 2007, **52**(2), 249-263.
5. BELL LS, SKINNER MF, JONES SJ. The speed of post-mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Sci Int*, 1996, **82**, 129-140.
6. YOSHINO M. Microscopical study on estimation of time since death in skeletal remains. *Forensic Sci Int*, 1991, **49**, 143-158.
7. JANS MME. Microbial bioerosion of bone – a review. Current Developments in Bioerosion, Erlangen Earth Conference Series, 2008, p. 397-413.
8. HAYNES S et al. Bone preservation and ancient DNA; the application of screening method for predicting DNA survival. *J Archaeological Sci*, 2002, **29**, 585-592.
9. KIMMERLE EH, BARAYBAR JP. Skeletal trauma: Identification of injuries resulting from human rights abuse and armed conflict. CRC Press, London, 2008.
10. CATTANEO C et al. The detection of microscopic markers for hemorrhaging and wound age on dry bone: a pilot study. *Am J Forensic Med Pathol*, 2010, **31**(1), 22-26.
11. DETTMAYER RB. Forensic histopathology: Bone fracture and fracture healing. Springer, Berlin, p. 203-209, 2011.
12. DE BOER HH. Assessing post-traumatic interval in human dry bone. *Int J Osteoarchaeol*, 2015, **25**(1), 98-109.
13. DELABARDE T, LUDES B. Manuel pratique d'anthropologie médico-légale. ESKA, Paris, p. 498-507, 2014.
14. FROST HM. Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manuel method. *Stain Technol*, 1958, **33**, 271-276.
15. MAAT GJR, VAN DEN BOS RPM, AARENTS MJ. Manual preparation of ground sections for the microscopy of natural bone tissue. Update and modification of Frost's "rapid manual method". *Int J Osteoarchaeol*, 2001, **11**, 366-74.
16. DE BOER HH et al. Manual for the preparation and staining of embedded dry bone tissue sections for microscopy. *Int J Osteoarchaeol*, 2013, **23**(1), 93-93.
17. DE BOER HH et al. Staining ground sections of natural dry bone tissue for microscopy. *Int J Osteoarchaeol*, 2012, **22**, 379-386.
18. TELMON N et al. Comparaison de méthodes de détermination histologique et scopique de l'âge à partir de l'extrémité sternale de la 4^{ème} côte. *Anthropo*, 2004, **7**, 203-209.
19. MEKOTA AM, VERMEHREN M. Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistological analyses of mummified soft tissues. *Biotech Histochem*, 2005, **80**(1), 7-13.
20. KRISTENSEN HK. An improved method of decalcification. *Stain Technol*, 1948, **23**(3), 151-154.

21. JUNQUIERA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, 1979, **11**(4), 447-55.
22. PUCHTLER H, WALDROP FS, VALENTINE LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-Sirius Red F3BA. *Beitr Pathol Anat*, 1973, **150**, 174-187.
23. DZIEDZIC-GOCLAWSKA A, ROZYCKA M, CZYBA JC, MOUTIER R, LENCZOWSKI S, OSTROWSKI K. Polarizing microscopy of picrosirius stained bone sections as a method for analysis of spatial distribution of collagen fibers by optical diffractometry. *Basic Appl Histochem*, 1982, **26**(4), 227-239.
24. LENDRUM AC, FRASER DS, SLIDDERS W, HENDERSON R. Studies on the character and staining of fibrin, *Journal of Clinical Pathology*, 1962, **15**, 401.
25. SCHMITZ N, LAVERTY S, KRAUS VB, AIGNER T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and cartilage*, 2010, **18**, 113-116.
26. GROCCOTT RG. A stain for fungi in tissue sections and smears. *Am J Pathology*, 1955, **25**, 975.
27. DEBOUIT F. Identification médico-légale : Anthropologie médico-légale. 2010. http://valeriandidot.free.fr/Rofl/Identification_medicolegale_moodle.pdf, consulté le 14 Octobre 2016.
28. MARTINIAKOVA M et al. Histological study of compact bone tissue in some mammals: a method for species determination. *Int J Osteoarchaeol*, 2007, **17**, 82-90.
29. DURIGON M. Pratique medico-légale: Examen d'ossements. Masson, Paris, p. 97, 2004.
30. MARTIN BR, BURR DB. Structure, function and adaptation of compact bone. Raven Press, New York, 1989.
31. CROWDER C, STOUT S. Bone histology : an anthropological perspective. CRC Press, New York, p. 109-134, 2011.
32. MULHERN DM, UBELAKER DH. Differences in osteon banding between human and nonhuman Bone. *J Forensic Sci*, 2001, **46**(2), 220-222 .
33. CRUESS RL, DUMONT J. Healing of bone, tendon and ligaments. Rockwood CA, Green DP: Fracture. JB Lippincott, Philadelphia, p. 97-101, 1975.
34. MAAT GJR. "Histological fracture dating in fresh and dry bone", Forensic aspects of pediatric fractures: differentiating accidental traumas from child abuse. Bilo RAC, Robben SGF, Van Rijn RR, Springer-verlag, Heidelberg, p. 194-201, 2008.
35. DURIGON M. Pratique médico-légale: Examen d'ossements. Masson, Paris, p. 106, 2004.

L'APPORT DES ÉTUDES EN HISTOLOGIE DENTAIRE À LA COMPRÉHENSION DE L'ÉVOLUTION DE L'HOMME

Fernando RAMIREZ ROZZI
E-mail : ramrozzi@yahoo.fr

AMIS UMR 5288 CNRS
Université Paris V. Faculté de Chirurgie Dentaire
1 rue Maurice Arnoux, 92120 MONTROUGE, France

RESUME

L'homme actuel se différencie nettement des autres espèces de primates par un cycle de vie caractérisé par une croissance prolongée et la présence des poussées de croissance à l'adolescence. L'intérêt pour comprendre quand et comment ce cycle de vie est apparu au cours de l'évolution de l'homme se heurtait à l'impossibilité de calibrer les étapes de l'ontogénèse avec une chronologie précise. La redécouverte des lignes de croissance dans les tissus dentaires ont permis aux études en paléanthropologie d'aborder directement la croissance et le développement chez les espèces fossiles. Grâce à la chronologie établie par ces lignes et les nombreux processus de formation dentaire qu'elles permettent d'aborder, nous avons découvert que les caractéristiques propres du cycle de vie de *Homo sapiens* ne sont partagées par aucune autre espèce fossile d'homme, elles se sont mises en place avec l'apparition de notre espèce.

INTRODUCTION

L'homme est l'espèce de primate la plus polymorphe et la seule à habiter un large spectre d'environnements différents. Bien évidemment, la culture y est pour

beaucoup mais elle seule ne suffit pas à expliquer l'extraordinaire adaptation de l'homme à des milieux si variés. En effet, les Yamana de la Terre du Feu et des nombreuses peuplades de l'Afrique équatoriale ne portaient que des pagnes comme seul élément vestimentaire bien qu'habitant des environnements très opposés. En d'autres mots, les processus biologiques de l'homme sont aussi très variés et certainement très divers comme le suggère la morphologie, mais jusqu'à présent cette diversité reste encore à être définie.

Des études récentes sur la croissance des groupes pygmées, lesquels se situent à l'extrémité de la diversité morphologique de l'homme, ont montré que malgré la variabilité de certains processus qui rendent compte de la morphologie pygmée, le cycle de vie était semblable à n'importe quelle autre population non-pygmée (1, 2). Donc, le cycle de vie, qui est caractérisé par deux aspects majeurs, une croissance prolongée et l'existence des poussées de croissance à la puberté, est propre à l'homme et n'est pas lié à la morphologie.

Le cycle de vie humain est unique et se distingue de celui d'autres mammifères en termes relatifs et absolus. La croissance chez l'homme moderne dure deux fois plus de temps que chez le chimpanzé. Par rapport à sa taille et au poids de son cerveau, l'homme est le mammifère qui présente la croissance la plus longue, caractérisée par une étape juvénile prolongée. Quand cette croissance prolongée est-elle apparue au cours de l'évolution des hominins (groupe de primates qui comprend l'homme, ses ancêtres et relatifs qui n'ont pas de rapport avec la lignée des chimpanzés)? De quelle manière s'est-elle mise en place?

Du moment que le cycle de vie humain apparaît comme un trait unique et distinctif de notre espèce, ces questions ont acquis une importance majeure en anthropologie évolutive. Nous présentons ici de façon succincte la contribution que les études en histologie dentaire ont apportée à la paléoanthropologie en révélant des évidences directes sur les modifications de la croissance au cours de l'évolution des hominins.

L'actualisme, un chemin sans issue

L'intérêt pour connaître le type de croissance chez les hominins fossiles s'est manifesté tout de suite après la découverte du premier australopithèque, l'enfant

de Taung découvert en Afrique du Sud en 1923. La première molaire en train de faire éruption révélait son statut d'immaturation, mais quel âge devait-on lui attribuer ? Son découvreur, Raymond Dart, plaidait pour un âge de six ans car les caractéristiques morphologiques rappelaient celles de l'homme actuel et donc il considérait tout naturellement de lui attribuer une croissance semblable (3). Opposé à cette idée, Bolk pensait que le caractère immature de cet individu ne permettait pas de prendre les caractéristiques morphologiques comme un paramètre fiable pour lui attribuer une croissance prolongée ; pour lui, à l'égal de ce qui s'observe chez le chimpanzé, la première molaire faisait éruption chez cet enfant vers l'âge de trois ans (4).

Cet exemple révèle une idée très ancrée à l'époque, que l'éruption dentaire est un bon marqueur pour caractériser la croissance générale de l'individu. Bien que les travaux de Schultz (5) dans les années 1950 aient déjà apporté un fondement à cette hypothèse, ce n'est que dans les années 1980 que le rapport étroit entre éruption dentaire et croissance générale d'un individu a été démontré chez les primates (6-9). Donc, le développement dentaire est un moyen exceptionnel pour calibrer la croissance des individus.

Cependant, le rapport étroit entre développement dentaire et croissance ne résout pas l'attribution d'un âge à l'enfant de Taung. Cette discussion illustre parfaitement la situation à laquelle les études de paléontologie humaine se sont confrontées pendant des années, à savoir l'impossibilité d'attribuer un âge précis à un événement donné de la vie d'un individu. La seule manière d'éviter cet obstacle qui semblait insurmontable était d'assumer une croissance de type humain ou de type chimpanzé pour un fossile donné, mais laquelle ?

Les lignes de l'émail

En 1985, Bromage et Dean (10) ont publié des travaux qui allaient révolutionner les études de la croissance chez les fossiles (homininés et autres). Ils ont déterminé l'âge à la mort de six australopithèques immatures d'il y a 2 millions d'années (Ma). A partir du décompte des périkytmatis à la surface des incisives, ils ont calculé la durée de la formation dentaire jusqu'à la mort de ces individus. Ils portaient de l'idée que les périkytmatis représentent des lignes de croissance de l'émail dentaire et donc leur nombre donne une idée directe du temps de formation de la couronne. Ils reprenaient ainsi les conclusions des études de Schour et

collaborateurs (11-13) qui étaient tombées dans l'oubli faute d'application dans le domaine de la stomatologie. En effet, Schour et ses collègues avaient réalisé des expériences chez l'homme, en injectant des produits fluorés à des enfants atteints d'une maladie mortelle. A la mort des enfants, ils ont observé que des lignes fluorées apparaissaient dans l'émail dentaire et que ces lignes étaient espacées d'un nombre de striations transversales semblable au nombre de jours qui s'étaient écoulés entre les deux injections. Ces expériences ont été réalisées plus récemment sur des babouins avec les mêmes résultats (14). Des analyses sur l'activité des facteurs de transcription des protéines de l'émail et l'oscillation de l'activité des gènes ont fournis les fondements biologiques de la conclusion suggérée par Schour et ses collègues (15), à savoir que les striations transversales sont des altérations dans la composition des prismes de l'émail dues à l'activité circadienne des améloblastes et donc représentent des marques journalières. En d'autres mots, le nombre de striations transversales entre deux points de l'émail dentaire donne une indication du nombre de jours qui les sépare.

D'autres lignes de l'émail dentaire semblent présenter un certain rapport avec le front de formation de la matrice de l'émail (16, 17). Ces lignes, nommées stries de Retzius, se trouvent espacées régulièrement et sont l'expression en deux dimensions des plans à l'intérieur de l'émail (17). Dans les faces latérales de la couronne dentaire, les stries contactent la surface de l'émail et forment des faibles

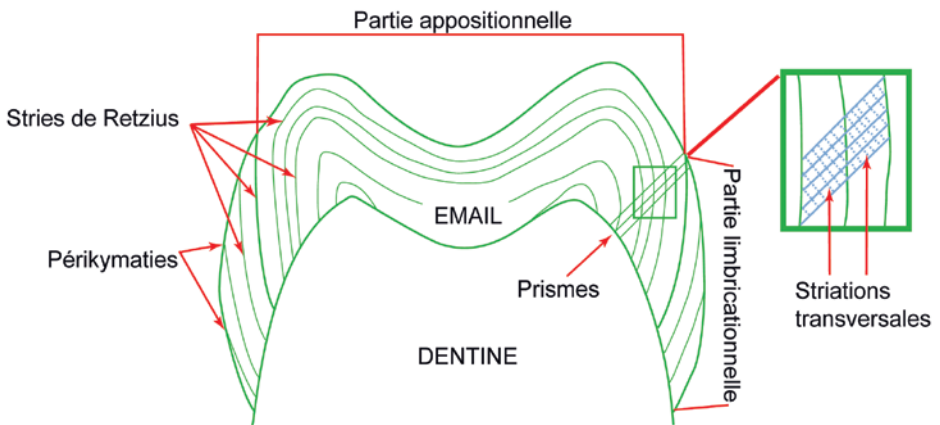


Figure 1 : Coupe schématique d'une molaire montrant la disposition des lignes de croissance dans l'émail et les deux parties de la couronne.

dépressions nommées périkymaties (**Figure 1**). L'examen attentif de la micro-anatomie de l'émail montre que les stries sont séparées par un nombre précis de striations transversales et que ce nombre est constant pour un même individu (18). Donc, les stries de Retzius, à l'égal que les striations transversales, correspondent à des lignes de croissance à l'intérieur de l'émail. Leur périodicité varie chez l'homme moderne entre 6 et 11 jours. Donc, une fois la périodicité des stries établie, le décompte des stries dans l'émail permet de calculer la durée de formation de la couronne dentaire.

Les analyses de la micro-anatomie dentaire allaient donc permettre enfin d'aborder l'étude de la croissance des espèces fossiles de façon directe sans avoir recours à la comparaison avec des espèces actuelles.

Micro-anatomie des tissus dentaires

Les études d'histologie dentaire appliquées à la paléanthropologie ont développé toute une lecture de la micro-anatomie des tissus de la couronne afin d'estimer divers paramètres de la formation dentaire. Nous nous limiterons à décrire les interprétations pour l'émail (les mêmes peuvent être données pour la dentine car elle présente aussi des lignes de croissance équivalentes à celles de l'émail). Schématiquement, on considère que l'émail se forme en suivant deux directions : une verticale et l'autre horizontale. La verticale résulte de la formation des prismes par la sécrétion des améloblastes depuis l'union de l'émail avec la dentine jusqu'à la surface dentaire. L'horizontale suit l'inclusion de nouveaux améloblastes actifs au front de formation de la matrice de l'émail. Plus ou moins transversales à l'axe du prisme, les striations transversales marquent l'activité journalière des améloblastes, donc la distance entre elles correspond au taux de sécrétion de l'émail, c'est-à-dire à la quantité d'émail formé dans une journée.

Le processus qui est à l'origine des stries de Retzius est inconnu mais elles sont associées au front de formation de la matrice de l'émail (16, 17). Donc, elles sont interprétées comme une indication des pas successifs du front de la matrice de l'émail au cours de la formation de la couronne. Elles délimitent des couches successives de l'émail qui se disposent aux alentours des cuspidés d'abord et ensuite, quand les fronts de la matrice des cuspidés s'unissent, de la couronne dentaire. Dans une coupe longitudinale d'une dent, les stries apparaissent

comme des arceaux aux alentours des cuspidés et comme des lignes obliques dans les faces latérales car elles atteignent la surface dentaire. Cette disposition des stries a permis de diviser la couronne en une partie appositionnelle, dans laquelle les stries ne contactent pas la surface de l'émail, et une autre imbricationnelle où les stries arrivent en surface et forment les périkymaties (19) (**Figure 1**).

L'objectif premier des études d'histologie dentaire en paléanthropologie était d'obtenir la durée de formation des couronnes. Cette information est obtenue le plus souvent en employant deux méthodes, une pour chaque partie de la couronne. Dans la partie appositionnelle, la longueur des prismes sur la pointe de la cuspide est divisée par le taux moyen de formation de l'émail (distance entre les striations) tandis que dans la partie imbricationnelle, le nombre de jours est obtenu en multipliant le nombre de stries de Retzius par la périodicité.

L'utilisation des lignes de croissance ne se limite pas à cette seule donnée. L'inclinaison des stries près de l'union de l'émail avec la dentine donne une indication de la vitesse d'avancement du front de la matrice et la longueur des stries renseigne aussi sur la proportion d'améloblastes actifs à un moment précis de la formation dentaire (20, 21). Bref, les analyses des structures internes de l'émail ont rendu possible d'aborder des processus histologiques et physiologiques de la formation dentaire des espèces fossiles. Elles ont ainsi révélé une large diversité des types de croissance chez les hominins.

L'inconvénient majeur des études en histologie dentaire, c'est qu'il faut effectuer des lames minces pour observer l'intérieur de l'émail. Or, il est impossible, ou presque, d'obtenir la permission d'effectuer des coupes de dents à partir des vestiges si précieux que les hominins fossiles. Donc, ce type d'études, sauf rares exceptions dans lesquelles les chercheurs ont obtenu la permission d'effectuer des lames minces, doit être réalisé sur des dents naturellement cassées. Alternativement, il peut se limiter à l'analyse des lignes de croissance à la surface de l'émail. L'utilisation du synchrotron pendant les dix dernières années a révolutionné dans une certaine mesure ce type d'analyse car il permet l'étude des couches internes de l'émail et la dentine sans avoir à couper la dent (22). Mais, l'accès au synchrotron est très limité ; le prix élevé des séances, la mise à disposition peu fréquente et le faible nombre d'appareils n'ont pas permis que ce type d'études s'élargisse.

Homininés du Plio-Pléistocène (4 – 1 Ma)

Le critère longuement utilisé pour rapprocher la croissance des hominidés fossiles à celle du chimpanzé ou à celle de l'homme était le rapport entre les étapes de formation des différents types dentaires. Un des plus utilisés correspondait à l'écart d'éruption entre la première incisive et la première molaire. Chez les chimpanzés, l'éruption de la première molaire est avancée à peu près de 3 ans par rapport à celle de la première incisive, tandis que chez l'homme l'éruption des deux types dentaires est très proche (23). Donc, les étapes de formation de ces deux types dentaires sont beaucoup plus éloignées à un moment donné chez le chimpanzé que chez l'homme.

Pour obtenir la durée de formation de la couronne chez les individus juvéniles d'homininés du Plio-Pléistocène (groupe des australopithèques et premiers représentant du genre *Homo*), Bromage et Dean (10) avaient compté le nombre de périkymaties à la surface de l'émail des incisives des australopithèques. La durée de formation de la couronne plus l'estimation d'autres périodes de formation (d'un petit bout de la racine et de la cuspide dentaire) leur avaient permis d'établir l'âge à la mort des individus. L'âge ainsi obtenu suggérait que la formation des dents était bien en avance par rapport à ce que l'on observe chez l'homme moderne au même âge. En plus, la formation de la première molaire était bien plus avancée ce qui suggérait un grand écart entre la formation des incisives et des premières molaires. Donc, ils ont conclu que la formation dentaire des australopithèques et par inférence, leur croissance, était plus proche de celle des chimpanzés que de l'homme ; en d'autres mots que les australopithèques ne présentaient pas une croissance prolongée comme il avait été assumé jusqu'à ce moment-là.

D'autres études plus approfondies de la microanatomie de l'émail ont révélé que la formation dentaire des hominidés fossiles, bien que certaines caractéristiques soient partagées avec les grands singes, ne peut être considérée comme semblable à celle du chimpanzé car elle se différencie en de nombreux aspects. La couronne des prémolaires est formée en 4 ou 5 ans chez l'homme et le chimpanzé tandis que chez certaines espèces d'homininés du Plio-Pléistocène, la couronne des prémolaires prenait moins de trois ans pour se former (24, 25). En ce qui concerne les molaires, la durée de formation de la couronne montre un large chevauchement entre les espèces d'homininés Plio-Pléistocènes, l'homme moderne et les chimpanzés. Cependant, la morphologie varie d'une espèce sur l'autre

ce qui reflète que les processus histologiques et physiologiques responsables de formation de la couronne ne sont pas semblables. Les analyses des caractéristiques des lignes de croissance ont permis d'apporter une explication (**Figure 2**) (26, 27). Les variations de taille semblent résulter des taux de sécrétions différents entre les espèces (**Figure 2, 3**), les espèces montrant les molaires les plus grandes se caractérisent par un taux de sécrétion extrêmement élevé. En d'autres mots, la grande quantité d'émail ne résulte pas d'une plus longue durée de formation mais d'une plus grande quantité d'émail formé par jour (**Figure 3**) (28).

Des nombreuses études en histologie dentaire ont permis ainsi de caractériser la formation dentaire des hominins du Plio-Pléistocène. Bien que la formation

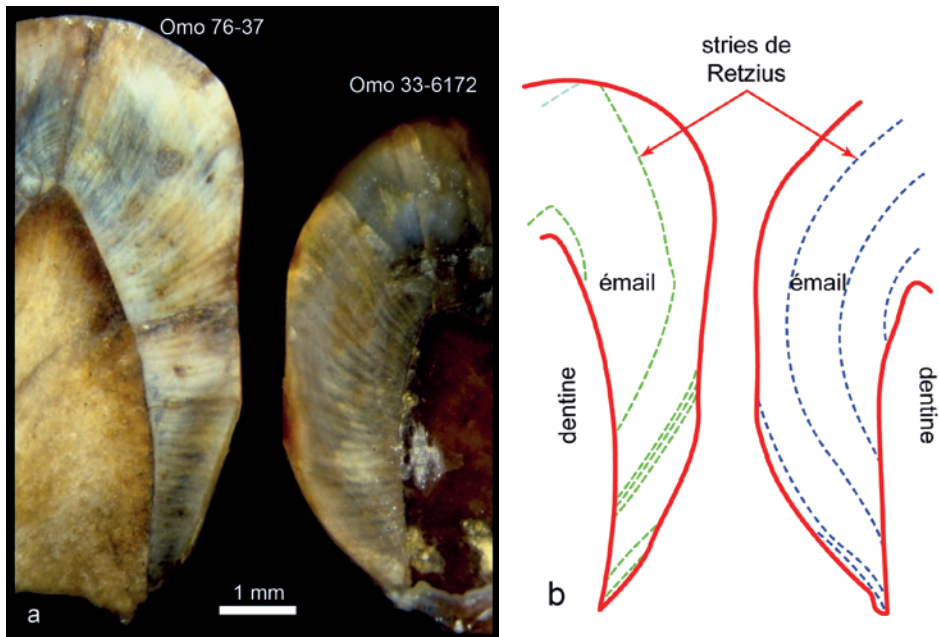


Figure 2 : Face mésiale de deux molaires inférieures naturellement cassées d'hominins du Plio-Pléistocène de l'Omo, Ethiopie. **a.** Omo 76-37, beaucoup plus grand avec un émail plus épais, a été attribuée à l'espèce **Paranthropus boisei**, tandis que Omo 33-6172 appartiendrait à **P. aethiopicus**. **b.** Vue schématique représentant la coupe à la même taille. En plus de la différence de taille, la disposition et le nombre de stries de Retzius sont très différents indiquant des processus de formation dentaire particuliers pour chaque espèce.

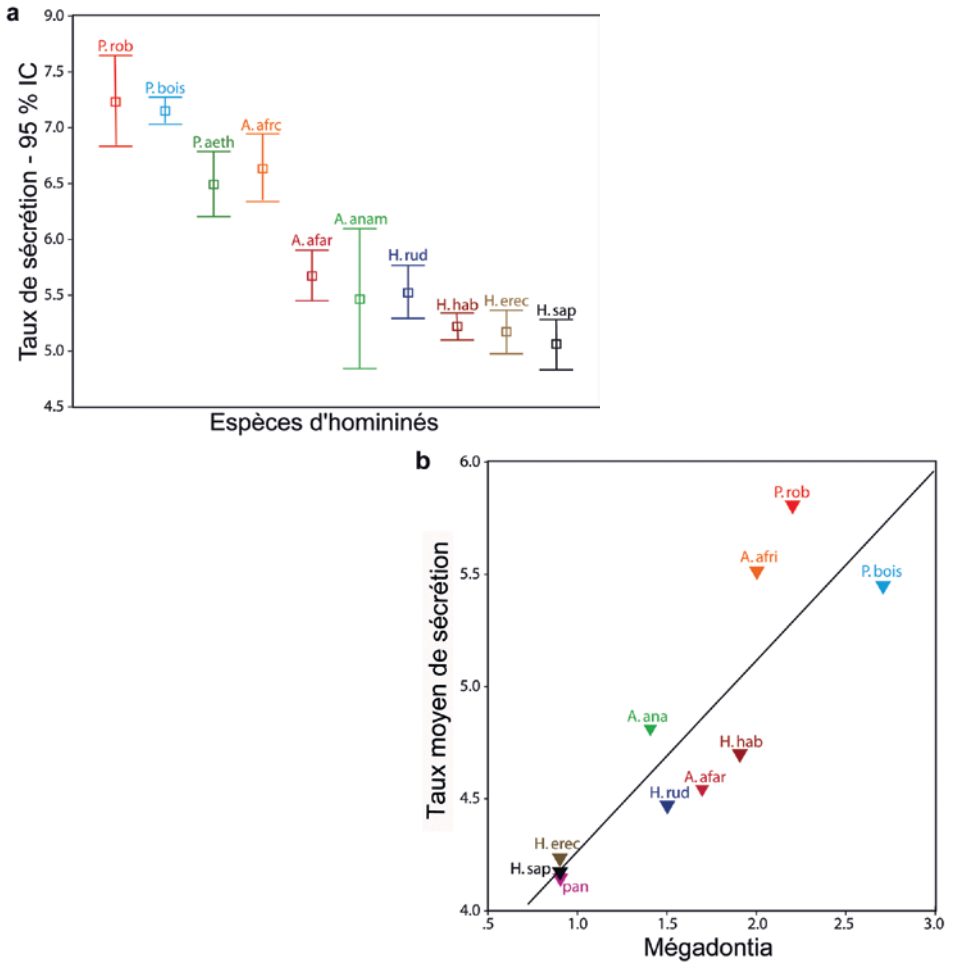


Figure 3 : a. Variation du taux de sécrétion de l'émail selon les espèces d'hominidés. IC : intervalle de confiance. **b.** Rapport entre le taux de sécrétion de la partie appositionnelle et la mégadontie chez les hominidés. P.rob : *Paranthropus robustus*, P.bois : *P. boisei*, Paeth : *P. aethiopicus*, A.afri : *Australopithecus africanus*, A.afar : *A. afarensis*, A.anam : *A. anamensis*, H.rud : *Homo rudolfensis*, H.hab : *H. habilis*, H.erec : *H. erectus*, H.sap : *H. sapiens*, pan : chimpanzé.

La mégadontie est le rapport entre la taille des molaires et la taille du corps ; donc l'augmentation du taux de sécrétion chez P.rob, P.bois et A.afri est encore plus élevée que celle à laquelle on s'attendrait pour l'augmentation de taille corporelle.

Il existe une forte corrélation ($P < 0,01$) entre le taux de sécrétion et la mégadontie, ce qui révèle que le taux de sécrétion joue un rôle plus important que la durée de formation dans la taille des couronnes dentaires (28).

dentaire de ces hominins fossiles soit plus proche de celle de chimpanzé que de celle de l'homme moderne, ces études suggèrent que chaque espèce présente une formation dentaire particulière (29). Le rapport étroit que la formation dentaire présente avec le développement de l'individu permet de suggérer que les espèces d'hominins du Plio-Pléistocène ne présentaient pas une croissance prolongée.

***Homo erectus*, Néandertaliens et hommes modernes**

A la différence des dents des hominidés du Plio-Pléistocène, les dents des hommes fossiles du Pléistocène moyen et final sont rarement cassées. L'étude de la croissance dentaire doit donc être effectuée à partir des périkymaties. La partie imbricationnelle, où les périkymaties sont observables, comprend un pourcentage élevé de la couronne des incisives et des canines. Ces types dentaires sont donc préférés pour effectuer le décompte et l'analyse des périkymaties.

Le squelette du « Nariokotome boy » est un des plus complets parmi les hominins fossiles. Trouvé près du lac Turkana, dans la localité de Nariokotomo (Kenya), cet individu, représenté par 108 os et vieux de 1,5 Ma, a rendu possible la connaissance et la caractérisation de la croissance chez *Homo erectus*. Depuis sa découverte en 1984, une discussion portait sur l'âge au décès de cet adolescent. Les estimations de la taille et du poids de l'individu ainsi que la fusion partielle de la diaphyse et les épiphyses des os longs indiquaient un âge de 14 ans. Par contre, les analyses dentaires, fondées sur le degré d'avancement de la formation dentaire (i.e. un quart de la racine de la M2 formée) pointaient vers un âge entre 10 et 11 ans. Donc, l'utilisation des standards de croissance chez l'homme moderne donnaient des résultats dissemblables. Différemment, si les standards des chimpanzés étaient employés, l'âge à la mort du « Nariokotome boy » variait entre 7 et 7,5 ans.

Les études en histologie dentaire sont venues encore une fois trancher le débat. Dans l'absence des dents cassées et l'impossibilité de réaliser des sections des dents, ce type d'étude devait être effectué à partir du décompte des périkymaties. Etant donné l'âge avancé de l'individu, le décompte des lignes sur une seule dent ne suffisait pas à couvrir toute la période de vie. La présence d'hypoplasies permettait de mettre en relation le développement de différents types dentaires. Ainsi, Dean et Smith (30) ont identifiés des hypoplasies sur la canine qui ont pu être individualisées sur la racine d'autres dents dont la formation n'était pas encore

terminée. Le décompte des lignes de croissance (périkymaties sur la canine et des lignes équivalentes aux périkymaties à la surface des racines de la M2) plus l'estimation du début de formation de la canine ont donné un âge à la mort qui varie entre 7,6 et 8,8 ans selon que l'on considère une périodicité de 8 ou 10 jours entre les lignes de croissance.

Cet âge est beaucoup plus bas que celui proposé avec les standards humains mais il est presque le même que celui proposé en suivant le modèle chimpanzé. Donc, chez *Homo erectus* la croissance prolongée typique de notre espèce n'était pas encore esquissée.

L'absence de croissance prolongée chez les espèces fossiles d'*Homo* a accentué l'intérêt pour caractériser la croissance chez les néandertaliens, espèce proche de nous car elle a habité l'Europe jusqu'à il y a 35.000 ans. A l'absence des dents cassées il faut ajouter le fait que les dents néandertaliennes présentent une forte usure ce qui rend l'analyse des périkymaties limitée. Par contre, à la différence d'autres hominés fossiles, nous disposons d'un nombre élevé de néandertaliens. La formation dentaire des néandertaliens a été comparée à celle de notre espèce par l'analyse des périkymaties dans les dents antérieures (incisives et canines). Cette analyse qui compare le nombre et la distribution des périkymaties en surface a révélé que le nombre de périkymaties était bas et que leur distribution était espacée au long de toute la couronne chez les néandertaliens, condition dissemblable de celle observée chez l'homme moderne dans lequel les périkymaties se resserrent vers le collet (31, 32). Le large espacement des périkymaties indique que le front de formation de la matrice progressait rapidement ce qui révèle un taux de différenciation cellulaire et un taux de sécrétion élevés chez les néandertaliens. Donc, la formation de la couronne était rapide et la taille des couronnes résultait d'une plus grande production d'émail par un grand nombre d'améloblastes (32). Le rapport entre les étapes de formation de tous les types dentaires chez les néandertaliens ressemble à celui chez l'homme moderne (33) ; donc une durée de formation raccourcie dans les dents antérieures doit forcément être accompagnée par une durée de formation courte dans les autres types dentaires.

Les travaux effectués au synchrotron ont confirmé ces observations (34). Ces travaux fondés sur l'analyse des striations, des stries et ayant déterminé la périodicité ont suggéré que les néandertaliens avaient une formation dentaire courte.

Le synchrotron a aussi été utilisé pour effectuer l'étude de l'un des premiers représentants de notre espèce, l'individu de Jebel Irhoud (35). Cet ancien *Homo sapiens*, daté de 160.000 ans ou peut-être plus, présentait une formation dentaire semblable à celle de l'homme d'aujourd'hui.

Donc, chez les néandertaliens, qui ne se sont éteints qu'il y a 35.000 ans, la formation rapide des couronnes indique qu'ils ne se caractérisaient pas par une croissance prolongée. Observation encore plus surprenante du fait que les premiers représentants *Homo sapiens*, plus anciens, montrent déjà une formation dentaire plus longue qui révèle une croissance prolongée.

CONCLUSION

L'application des connaissances de la formation dentaire à l'étude de l'évolution de l'homme a ouvert un champ nouveau. Une fois de plus le croisement de disciplines élargit notre compréhension et débloque des situations qui semblent insurmontables. Dans le cas de la paléanthropologie, l'actualisme qui dans de nombreux cas avait permis de mieux interpréter certains phénomènes, renfermait les études sur la croissance et le développement des espèces fossiles à une dichotomie (homme vs chimpanzé) réductrice. Les études en histologie dentaire en permettant d'aborder la croissance et le développement de façon directe et d'attribuer une chronologie précise aux étapes de l'ontogénèse a rendu accessible la connaissance des processus histologiques et physiologiques chez les espèces fossiles. Grâce à ces études, la paléontologie intègre désormais le champ interdisciplinaire de l'« evo-devo » (evolutionary development).

La formation dentaire est un excellent indicateur du développement de l'individu (7). Les travaux en histologie dentaire appliqués à la paléanthropologie ont permis de caractériser la formation dentaire chez les espèces fossiles d'homininés. Ils nous permettent de suggérer que la croissance prolongée propre à l'homme actuel est apparue récemment pendant l'évolution, avec notre espèce. Bien que des différences entre les espèces fossiles d'homininés soient observées et que des espèces fossiles doivent encore être étudiées, la croissance rapide chez *H. erectus* et les néandertaliens semble indiquer que le cycle de vie humain est apparue soudainement avec l'avènement d'*Homo sapiens*.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Nathalie Accart et Bertrand Ludes pour l'avoir invité à participer au 29^{ème} congrès annuel de la Société Française d'Histotechnologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. RAMIREZ ROZZI F.V., KOUDOU Y., FROMENT A., LE BOUC Y., BOTTON J. Growth pattern from birth to adulthood in African pygmies of known age. *Nature Communications*, 2015, **6**, 7672.
2. RAMIREZ ROZZI F.V. Diversity in tooth eruption and life history in humans : illustration from a Pygmy population. *Scientific Reports*, 2016, **6**:27405.
3. DART R.A. *Australopithecus africanus* : the man-ape of South Africa. *Nature*, 1925, **115**, 195-199.
4. BOLK L. On the problem of anthropogenesis. *Proc. Sec. Sci. Kon. Akad. Wetens. Amsterdam*, 1926, **29**, 465-475.
5. SCHULTZ A.H. Postembryonic age changes. In: Hofer, H., Schultz, A.H., Starck, D. (Eds), *Primatologia*, Volume 1. Karger, Basel, pp. 887-964, 1956.
6. SMITH B.H. Dental development as a measure of life history in primates. *Evolution*, 1989, **43**, 683-688.
7. SMITH B.H. Life history and the evolution of human maturation. *Evol. Anthropol.*, 1992, **1**, 134-142.
8. SMITH B.H., CRUMMET T.L., BRANDT K.L. Ages of eruption of primate teeth : a compendium for aging individuals and comparing life histories. *Yrbk. Phys. Anthropol.*, 1994, **37**, 177-231.
9. ROBSON S.L., WOOD B. Hominin life history : reconstruction and evolution. *J. of Anat.*, 2008, **212**, 394-425.
10. BROMAGE T.G., DEAN M.C. Re-evaluation of the age at death of Plio-Pleistocene fossil hominids. *Nature*, 1985, **317**, 525-528.
11. SCHOUR I., HOFFMAN M.M. The rate of apposition of enamel and dentin in man and others animals. *J. dent. Res.*, 1939, **18**, 161-175.
12. SCHOUR I., PONCHER H.C. The rate of apposition of human enamel and dentin as measured by the effects of acute fluorosis. *Am. Assoc. Dis. Child.*, 1937, **54**, 757-776.

13. SCHOUR I., STEADMAN S.R. The growth pattern and daily rhythm of the incisor of the rat. *Anat. Rec*, 1935, **63**, 325-332.
14. BROMAGE T.G. Enamel incremental periodicity in the Pig-Tailed Macaque : a polychrome fluorescent labeling study of dental hard tissues. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1991, **86**, 205-21.
15. LACRUZ R.S., HACIA J.G., BROMAGE T.G., BOYDE A., LEI Y., XU Y., MILLER J.D., PAINE M.L., SNEAD M.L. The circadian clock modulates enamel development. *J. Biol. Rhythms*. 2012, Jun, **27**(3), 237-45.
16. SHELLIS R.P. Variations in growth of the enamel crown in human teeth and a possible relationship between growth and enamel structure. *Archs. oral Biol.*, 1984, **29**, 697-705.
17. RISNES S. Growth tracks in dental enamel. *J. Hum. Evol.*, 1998, **35** (4-5), 331-350.
18. FITZGERALD C.M. Do enamel microstructures have regular time dependency? Conclusions from the literature and a large-scale study. *J. Hum. Evol.*, 1998, **35** (4-5), 371-386.
19. BEYNON A.D., WOOD B.A. Patterns and rates of enamel growth on the molar teeth of early hominids. *Nature*, 1987, **326**, 493-496.
20. RAMIREZ ROZZI F.V. Teeth development in east african *Paranthropus*. *J. Hum. Evol.*, 1993a, **24**, 429-454.
21. RAMIREZ ROZZI F.V. Le développement dentaire des hominidés plio-pléistocènes. *Bull. et Mém. Soc. Anthropol. Paris*, n.s., 1993b, **5**, 131-142.
22. SMITH T.M., TAFFOREAU P. New visions of dental tissue research : Tooth development, chemistry, and structure. *Evol. Anthropol.*, 2008, **17**, 213-226.
23. DEAN M.C. Retrieving chronological age from dental remains of early fossil hominins to reconstruct human growth in the past. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2010, **365**, 3397-3410.
24. BEYNON A.D., DEAN M.C. Crown formation time of a fossil hominid premolar tooth. *Archives of Oral Biology*, 1987, **32**, 773-780.
25. RAMIREZ ROZZI F.V. Aspects de la chronologie du développement dentaire des hominidés plio-pléistocènes de l'Omo, Ethiopie. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1993c, **316**, 1155-1162.
26. RAMIREZ ROZZI F.V. Hétérochronies dans l'évolution des hominidés. Le développement dentaire des australopithécines « robustes ». *C. R. Acad. Sc. Paris*, 2000, **331**, 571-577.

27. RAMIREZ ROZZI F.V. (éd). Enamel Structure and Development, and its Application in Hominid Evolution and Taxonomy. *J. Hum. Evol.* (special issue), 1998, **35** (4/5), 327-576.
28. LACRUZ R.S., DEAN M.C., RAMIREZ ROZZI F.V., BROMAGE T.G. Megadontia, striae periodicity and patterns of enamel secretion in Plio-Pleistocene fossil hominins. *Journal of Anatomy*, 2008, **213**, 148-158.
29. KUYKENDALL K.L. Reconstructing australopithecine growth and development : what do we think we know? In : Thompson, J.L., Krovitz, G.E., Nelson, A.J. (Eds), Patterns of Growth and Development in the Genus *Homo*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 191–218, 2003.
30. DEAN M.C., SMITH B.H. Growth and development of the Nariokotome youth, KNM-WT 15000. In *The First Humans –Origin and Early Evolution of the Genus Homo* (eds. Grine, F. E., Fleagle, J. G. & Leakey, R. E.). Springer Netherlands, Dordrecht, 101–120, 2009.
31. RAMIREZ ROZZI F.V., BERMUDEZ DE CASTRO J.M. Surprisingly rapid growth in Neanderthals. *Nature*, 2004, **428**, 936-939.
32. RAMIREZ ROZZI F.V., SARDI M. Crown-formation time in Neandertals revisited. *J. Hum. Evol.*, 2007, **57**, 108-113.
33. TOMPKINS R.L. Relative dental development of Upper Pleistocene hominids compared to human population variation. *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1996, **99**, 103–118.
34. SMITH T.M., TOUSSAINT M., REID D.J., OLEJNICZAK A.J., HUBLIN J.J. Rapid dental development in a Middle Paleolithic Belgian Neanderthal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, **104**, 20220-20225.
35. SMITH T.M., TAFFOREAU P., REID D.J., GRUN R., EGGINS S., BOUTAKIOUT M., HUBLIN J.J. Earliest evidence of modern human life history in North African early *Homo sapiens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, **104**, 6128-33.

CELLULES SOUCHES SOMATIQUES ET HEMATOPOÏÈSE CHEZ LE MOLLUSQUE

Patricia CAVELIER^{1,3}, Julien CAU^{1,4}, Jean Marc STRUB^{5,6},
Mohamed JEMAA^{1,2}, Nathalie MORIN^{1,2}, Claude DELSERT^{1,2,7,*}

*claudedelsert@crbm.cnrs.fr

1. Université de Montpellier, 34095 MONTPELLIER, France
2. CRBM CNRS UMR5237, 34293 MONTPELLIER, France
3. IGMM CNRS UMR 5535, 34293 MONTPELLIER, France
4. IGH CNRS UPR 1142, 34396 MONTPELLIER, France
5. Université de Strasbourg, 67081 STRASBOURG, France
6. IPHC CNRS UMR7178, 67037 STRASBOURG, France
7. IFREMER, 34293 MONTPELLIER, France

RESUME

L'origine du renouvellement des tissus fait débat chez le mollusque car aucune évidence de cellules souches n'a été montrée à ce jour au sein de ce vaste phylum.

Cette question est d'autant plus fondamentale que la croissance se fait tout au long de la vie du mollusque et que ce groupe renferme les animaux vivants les plus vieux connus, tels ces spécimens du bivalve *Arctica islandica* âgés de plus de 500 ans. Par ailleurs, l'origine des hémocytes, les cellules sanguines qui participent à la défense immunitaire innée chez l'invertébré, reste inconnue chez le mollusque. Or l'hématopoïèse est le processus physiologique produisant le plus grand nombre de cellules somatiques chez l'animal adulte. Elle se déroule dans un tissu spécifique, appelé glande lymphatique, dans lequel on observe une prolifération de cellules précurseurs. La recherche de cellules souches somatiques chez le mollusque pouvait donc potentiellement se confondre avec la mise en évidence de l'hématopoïèse.

L'analyse histologique a initialement montré que certaines zones de la branchie relâchent dans l'hémolymphe des cellules petites d'une morphologie correspondant aux cellules souches ou précurseurs. Dans ces mêmes régions, le marquage à la bromodéoxycytidine (BrdU) a révélé une très intense réplication de l'ADN. Et en effet, un anticorps anti-phospho histone H3 montre une prolifération cellulaire dans la branchie. Par ailleurs, la détection de Sox2 dans de nombreuses cellules de petite taille prouve l'existence d'une forte population de cellules souches ou précurseurs dans la branchie.

Enfin, l'utilisation des marqueurs d'hémocytes, Superoxyde Dismutase (SOD) et Filamine, montre que des cellules qui prolifèrent dans la branchie, s'y différencient ensuite en hémocytes. L'ensemble de ces résultats démontre donc deux faits fondamentaux qui sont (i) l'existence des cellules souches chez le mollusque et (ii) le déroulement de l'hématopoïèse dans la branchie des bivalves.

INTRODUCTION

Les animaux à très longue durée de vie sont qualifiés de non sénescents (1) car ils ne montrent pas de déclin physiologique au cours de leur vie. Ainsi, les bivalves, groupe de mollusques qui renferme les animaux vivants les plus vieux connus (2), croissent et assurent leur défense immunitaire tout au long de leur vie (3). Chez les mollusques, la défense immunitaire est uniquement innée et elle est essentiellement assurée par les cellules sanguines, les hémocytes, qui assurent également d'autres fonctions (4). Les cellules immunitaires chez l'animal dérivent d'une population de cellules souches et de précurseurs qui se renouvellent constamment et qui sont hébergées dans un organe hématopoïétique (5) aussi appelé glande lymphatique. Chez le mollusque, l'origine des hémocytes et notamment l'existence de cellules souches ou précurseurs, ainsi que le lieu de l'hématopoïèse sont inconnus (6). Le fait que la génétique ne soit pas aisément utilisable chez ces espèces, que la génomique y soit encore peu développée et que la culture de lignées cellulaires stables n'existe pas chez les invertébrés marins, nous a conduit à rechercher des évidences de cellules souches ou précurseurs directement au niveau des tissus. Techniquement, afin d'obtenir des informations au niveau cellulaire, nous avons essentiellement utilisé la microscopie confocale sur des coupes transversales d'huîtres révélées par immunofluorescence.

L'analyse histologique de la branchie d'huître montre qu'en dehors d'une organisation en plis réguliers, connue depuis longtemps (7), il existe des structures d'organisation irrégulière jamais décrites auparavant. Ces structures moins denses ont permis d'observer le relargage de petites cellules arrondies dans l'hémolymphe, cellules qui présentent un fin cytoplasme entourant le noyau, une morphologie typique des cellules souches. Le marquage de coupes de tissus par le BrdU, un analogue du nucléotide thymidine, montre que ces petites cellules sont localisées dans l'épithélium de la branchie ou à sa proximité immédiate, répliquent intensément leur ADN. Ce résultat a été confirmé par la détection du marqueur de mitose H3P, l'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10, dans ces cellules. La branchie est donc le lieu de mitoses abondantes chez l'adulte, un caractère fondamental de l'organe hématopoïétique, bien connu chez les vertébrés (5).

L'existence d'une population de cellules souches ou précurseurs a quant à elle, été établie grâce à la détection de Sox2, un facteur de transcription tissu-spécifique (8), dans les petites cellules épithéliales de la branchie.

La détection conjointe des marqueurs Sox2 et SOD, un marqueur spécifique des hémocytes (9), a révélé que les cellules souches ou précurseurs peuvent se différencier en hémocyte au niveau de la branchie.

Enfin, l'analyse de l'incorporation de BrdU dans les cellules d'un fragment de branchie isolé et la détection concomitante de Filamine, un nouveau marqueur d'hémocyte, a permis de montrer que des cellules ayant proliféré dans la branchie sont aussi capables de s'y différencier en hémocyte (10). La branchie est donc l'organe lymphoïde du bivalve.

MATERIELS ET METHODES

Histochimie et immunohistochimie

Les tissus ont été fixés dans le réactif de Davidson (pour 1 litre : 330 ml d'éthanol à 95 %, 220 ml de formaldéhyde à 37 %, 115 ml d'acide acétique glacial, 335 ml d'eau de mer filtrée) pendant 16 heures à 4 °C. Les tissus sont déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de 70 à 100 % puis clarifiés dans le xylène avant inclusion dans

la paraffine. Des sections de 5 μm d'épaisseur sont réalisées avec un microtome HSM355S (Microm) puis séchées à 37 °C. Les sections sont déparaffinées par traitement au xylène puis réhydratées par des bains successifs d'éthanol de 100 % à 70 % puis dans le tampon TBST (50 mmol/L1 Tris (pH 8,0), 150 mmol/L1 NaCl, 0,05 % Tween 20).

Pour l'histologie, les sections sont incubées dans l'hématoxyline pendant 2 minutes puis contrastées avec de l'éosine G pendant 4 mn puis déshydratées dans l'éthanol et le xylène avant montage dans le milieu Mountex (Histolab).

Pour l'immunohistologie, les sections sont perméabilisées pendant 1 heure dans du TBST contenant 0,2 % Triton X100 et 5 % de lait sans matière grasse. Les sections sont ensuite incubées pendant 16 heures à 4 °C en chambre humide avec une dilution d'anticorps primaire dans du TBST contenant 2 % de sérum albumine bovine.

La détection du BrdU nécessite après l'étape de perméabilisation, une dénaturation de l'ADN par incubation dans HCl 2M pendant 30 minutes à 37 °C puis neutralisation brutale dans le tampon Borax (0,1M, pH 9,0) et plusieurs rinçages dans le TBST avant incubation avec l'anticorps monoclonal anti BrdU.

La double détection d'une protéine et du BrdU nécessite que la dénaturation acide soit réalisée après que la protéine a été révélée par l'anticorps secondaire fluorescent.

Marquage des tissus au BrdU

Un volume de 100 μl de solution à 1,6 mM de BrdU (B5002, Sigma-Aldrich) est injecté dans le sinus du muscle adducteur d'une huître (1,8g de chair, n=3) puis l'animal est replacé dans l'eau de mer à température ambiante pendant 6 h avant fixation de l'animal entier. Alternativement, une section transversale de 10 mm d'épaisseur, du niveau du cœur en direction de la bouche, est incubée dans 50 mL de milieu de culture cellulaire L15 (Invitrogen, USA) ajusté à la pression osmotique de l'eau de mer (1100 mOsm). Le milieu contenant 25 μM de BrdU est agité doucement à 15 °C pendant l'incubation qui varie de 1 à 16 heures.

Anticorps

Les anticorps immunopurifiés commerciaux suivants ont été utilisés : anti-BrdU monoclonal (B8434, Sigma Aldrich) au 1/500 ; anti-H3P de lapin (06-570, Merck Millipore, Allemagne) au 1/1000; anti-Sox2 de lapin (ab97959, Abcam, USA) au 1/1000.

Les anticorps de lapin obtenus et immunopurifiés au laboratoire : anti-SOD d'huître (9) au 1/1000 ; anti-Filamine d'huître au 1/000 (10).

Microscopie et quantification

Les images ont été prises sur un Axioimager Z2 (Zeiss) avec des objectifs x20 (Plan Apo 0.8) et x40 (Plan Apo 1,3 huile) DIC (UV) VIS-IR. Les photos ont été enregistrées avec une caméra Coolsnap HQ2 CCD (Roper Scientific) sous le contrôle du logiciel Metamorph 7,1 (Molecular devices). La microscopie Confocale a été réalisée sur un LSM780 Confocal (Zeiss) avec un objectif 40X PLAN APO 1,3 huile DIC (UV) VIS-IR. Des séries de sections confocales ont été collectées. Les images d'histologie ont été prises au Nanozoomer (Hamamatsu, France) et analysées avec le logiciel NDP View (Hamamatsu).

Le comptage manuel des noyaux positifs pour H3P (Alexa555) versus les noyaux totaux (DAPI, bleu) a été réalisé sur des sections confocales acquises à l'objectif x20 et analysées grâce au logiciel ImageJ. La somme des cellules positives pour H3P et pour DAPI a été faite pour la branchie et pour le manteau de chaque animal (n=3).

RESULTATS

Relargage de cellules de type souche ou précurseur dans l'hémolymphe de la branchie

L'étude des sections colorées en hématoxyline – éosine montre des structures irrégulières dans la branchie (**Figure 1A**) à la différence de l'organisation en plissements réguliers connue jusqu'à présent (7). Ces structures moins denses

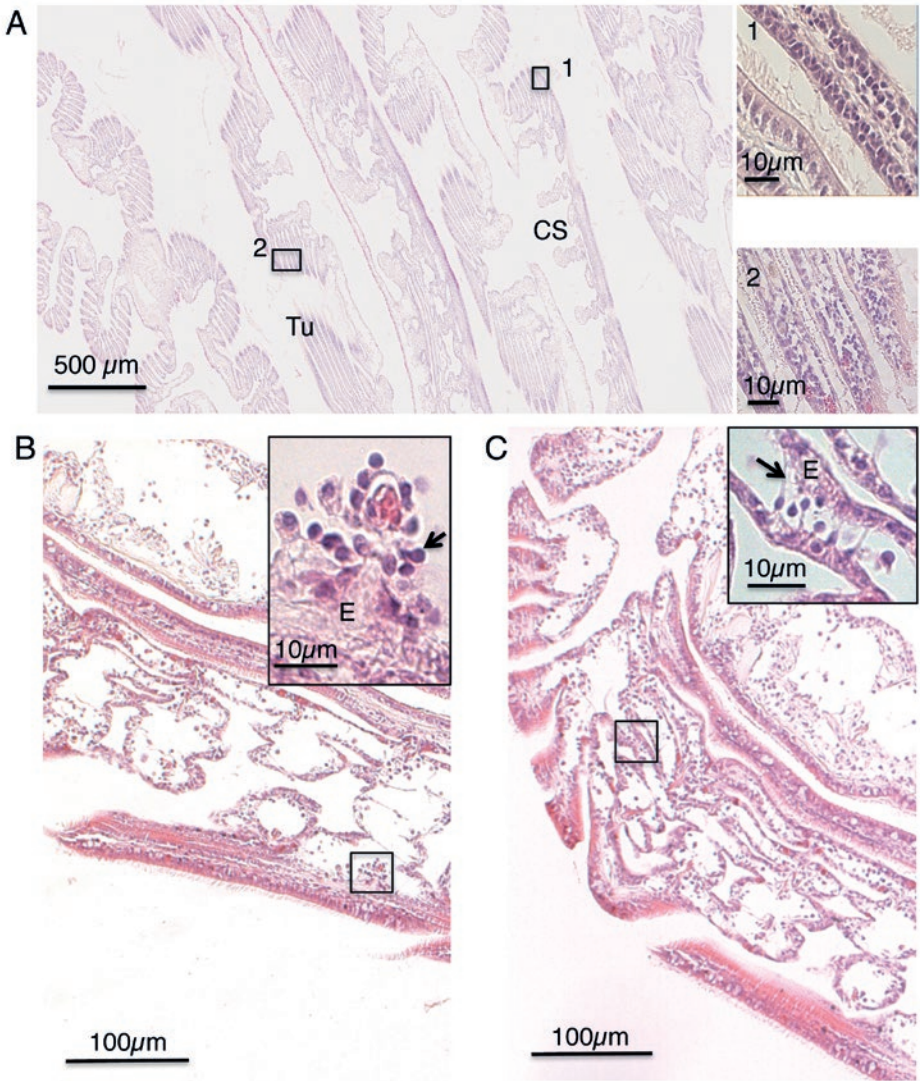


Figure 1 : Détail de la structure de la branchie d'huître. (A) Vue à faible grossissement de l'organisation en empilement de tubules (Tu) et structures irrégulières (Cs). A plus fort grossissement (encarts) des cellules à fin cytoplasme coloré à l'éosine (rose), sont entassées dans la matrice extracellulaire de l'épithélium branchial. (B, C) Détail des zones irrégulières de la branchie. (B) Petites cellules en forme de cil, qui se détachent de la matrice extracellulaire dans l'hémolymphe (encart). (C) Petites cellules à longues extensions cytoplasmiques (flèche, encart) dans l'hémolymphe d'un tubule.

permettent l'observation de petites cellules qui se détachent de l'épithélium de la branchie dans l'hémolymphe (**Figure 1B, encart**). Ailleurs, de longs prolongements cytoplasmiques reliant de petites cellules à la matrice extracellulaire (**Figure 1C, encart**) suggèrent que ces petites cellules sont en train de s'extraire de l'épithélium branchial avant de se détacher dans l'hémolymphe.

Ces cellules dont le cytoplasme est réduit à une mince couche péri-nucléaire possèdent ainsi une morphologie de cellule souche ou précurseur.

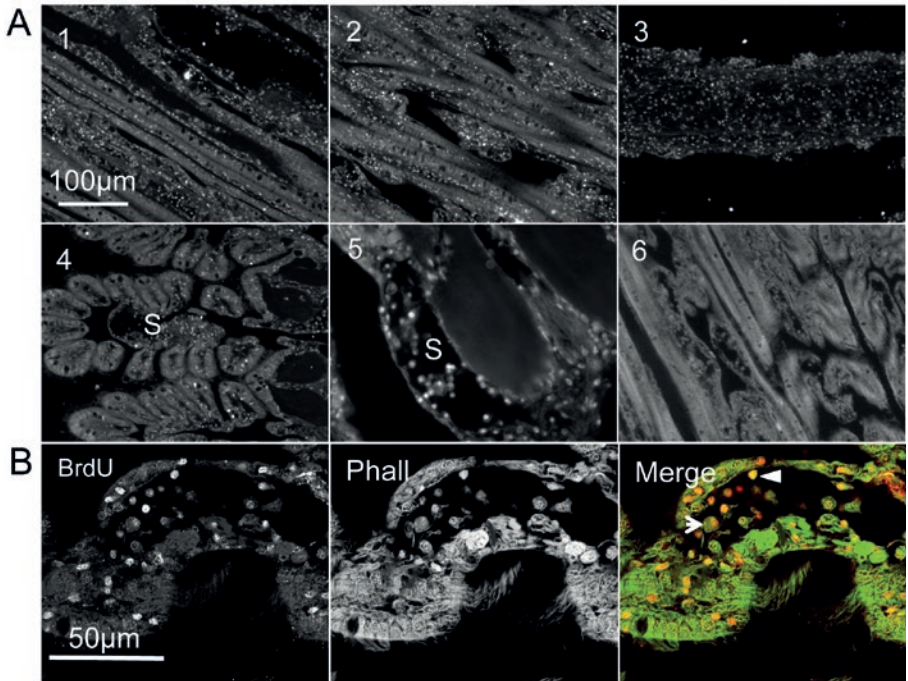


Figure 2 : Intense réplication d'ADN dans les structures irrégulières de la branchie. (A, B) Le tissu a été incubé dans un milieu de culture contenant du BrdU avant fixation et immunohistochimie. (A) Vue en fluorescence à faible grossissement de l'incorporation intense de BrdU dans les structures irrégulières de la branchie (1,2) et dans d'autres zones de la branchie (3,4). (5) Vue à plus fort grossissement d'un vaisseau (S) contenant des hémocytes marqués au BrdU. (6) Contrôle négatif de tissu sans BrdU. (B) Coupe de tissu traitée comme ci-dessus mais en présence d'une coloration du cytoplasme (vert, Phalloïdine-Alexa 488). Cette image confocale révèle de petites cellules à cytoplasme fin, une caractéristique des cellules souches, marquées au BrdU (pointe de flèche pleine) dans un vaisseau. Phall, phalloïdine.

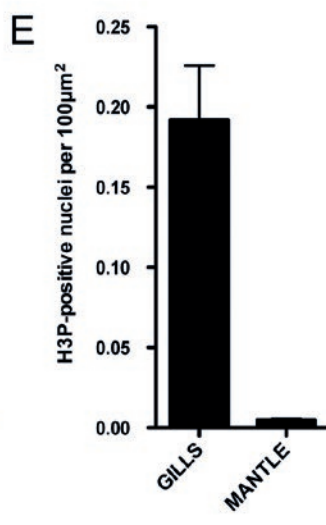
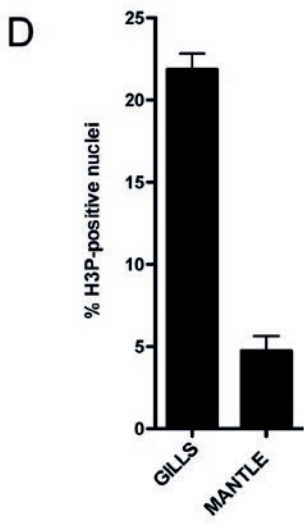
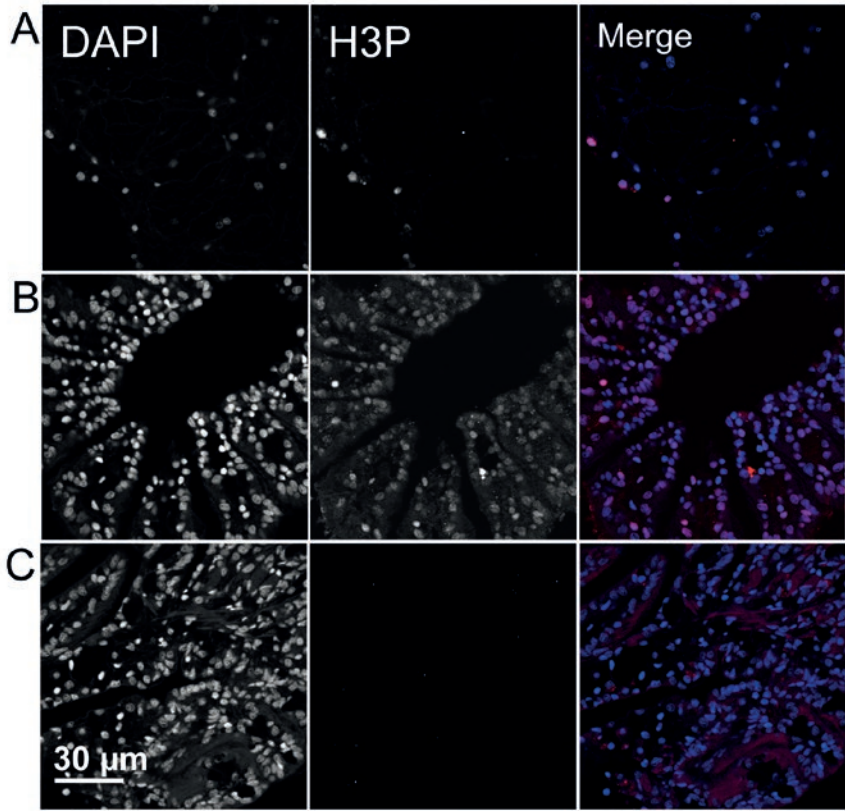
Intense répllication de l'ADN dans l'épithélium branchial

L'examen de sections d'huîtres préalablement injectées d'une solution de BrdU ou de tissus incubés dans un milieu de culture cellulaire contenant du BrdU, montre une fluorescence ponctuée, intense dans le tissu branchial (**Figure 2A**). Cette ponctuation est l'image typique d'une incorporation de BrdU dans l'ADN génomique, ce qui indique une forte répllication de l'ADN dans la branchie. Nos résultats montrent également que cette incorporation est détectable dans la branchie après seulement une heure d'incubation avec le BrdU. Et dans ces conditions, le marquage du cytoplasme avec la phalloïdine fluorescente révèle que seules les petites cellules à haut rapport nucléo-cytoplasmique ont répliqué leur ADN (**Figure 2B**). Ces résultats, confirmés par analyse en cytométrie de flux (voir 10), indiquent (i) une forte dynamique de la synthèse d'ADN dans la branchie, un caractère typique de l'organe hématopoïétique, (2i) une répllication qui se produit exclusivement dans des cellules de petite taille qui rappellent les précurseurs hématopoïétiques.

Prolifération cellulaire dans l'épithélium branchial

L'immunodétection de l'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10, un marqueur de la mitose, en présence de DAPI montre de nombreuses mitoses dans la branchie (**Figure 3 B**). Des comptages réalisés sur des images confocales des 2 tissus les plus abondants de l'huître (n=3), la branchie et le manteau (**Figure 3A,B**), montrent que plus de 20 % des cellules de la branchie sont en mitose contre seulement 4 % dans le manteau (**Figure 3D**). La contribution de la branchie au nombre total de mitoses

Figure 3 : Mitoses dans la branchie et le manteau. Images confocales révélant le marqueur de mitose H3P (rouge) et l'ADN (DAPI, bleu). (A) Section du manteau qui révèle peu de cellules marquées H3P dans ce tissu lacunaire parsemé de grandes cellules. (B) Section de branchie montrant une forte proportion de cellules H3P. (C) Contrôle négatif. (D, E) Quantification des cellules marquées H3P dans des sections de manteau et de branchie. Plus de 1000 noyaux ont été comptés dans des zones représentatives pour chaque animal (n=3). (D) Le pourcentage de cellules mitotiques est de 21,7 % et 4,7 % pour la branchie et le manteau, respectivement. (E) Densité de cellules mitotiques par 100µm². La densité de cellules mitotiques est 38 fois supérieure dans la branchie (0.192+/- 0.034 noyau 100 µm²) par rapport au manteau (0.005+/- 0.0009 noyau 100 µm²).



est par ailleurs accentuée par sa forte densité cellulaire qui résulte en un nombre de mitoses par unité de surface environ 40 fois supérieur par rapport au manteau (**Figure 3E**). L'intense prolifération cellulaire observée dans la branchie, en accord avec un haut niveau de réplication de l'ADN génomique, suggère que la branchie puisse être l'organe hématopoïétique du bivalve.

Des cellules souches et/ou précurseurs dans la branchie

Sox2 est un facteur de transcription qui est spécifique des cellules souches et des précurseurs.

Le marquage de sections d'huître avec un anticorps anti-Sox2 en présence de DAPI révèle en microscopie confocale une abondance de cellules souches et/ou précurseurs dans l'épithélium branchial d'huître (**Figure 4A**). A plus fort grossissement, on peut observer de petites cellules avec une morphologie en virgule (**Figure 4B**) telle qu'habituellement décrite pour les cellules souches, ainsi que des amas d'où se dégagent ces petites cellules à l'intérieur de la lumière de tubules branchiaux (**Figure 4C**). Ces résultats indiquent clairement l'existence de cellules souches ou précurseurs chez un mollusque. De plus, l'abondance de ces cellules dans la branchie d'huître adulte et leur dispersion dans l'hémolymphe, suggèrent à nouveau l'hématopoïèse.

La branchie est l'organe hématopoïétique du bivalve

La Superoxyde dismutase, SOD, est une enzyme spécifique des hémocytes (9). L'utilisation conjointe des anticorps anti-SOD et anti-Sox2 montre au microscope confocal une répartition spatiale bien distincte avec d'une part, les cellules souches ou précurseurs (rouges) dans l'épithélium branchial et d'autre part, les hémocytes (verts) essentiellement localisés dans l'hémolymphe des vaisseaux. Il est important de noter la présence d'un petit nombre de cellules doublement marquées (jaunes), possédant à la fois des caractères de cellule souche et d'hémocyte, dans l'hémolymphe du vaisseau (**Figure 5A**). Ces cellules, également visibles dans la zone entre les épithéliums et les vaisseaux sur d'autres images (10), indiquent que la différenciation des cellules précurseurs en hémocytes se fait au sein de la branchie.

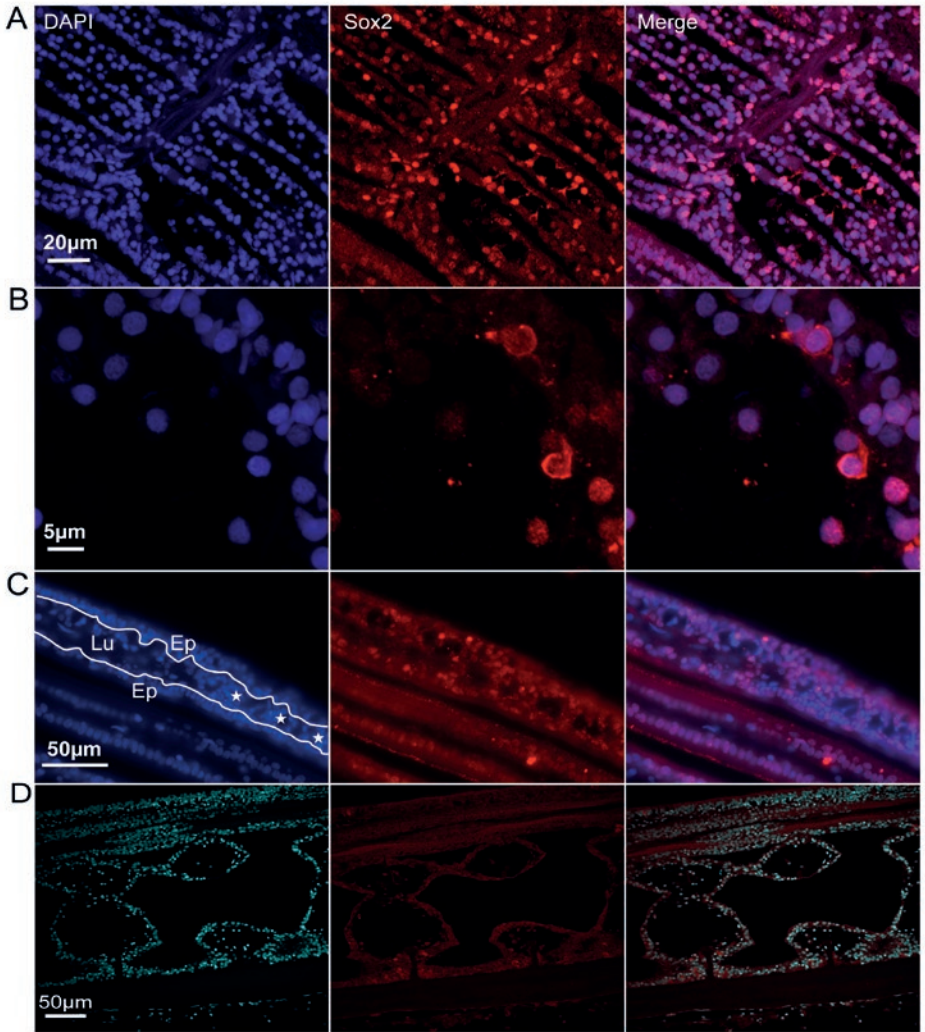


Figure 4 : Abondance de cellules précurseurs dans la branchie. Images de microscopie fluorescente (C) ou confocale (A, B, D) de sections révélées par le marqueur de cellule souche ou précurseur, Sox2 (rouge) et le DAPI (bleu). (A) Nombreuses cellules marquées par Sox2 dans les structures irrégulières de la branchie. Noter que de longues extensions cytoplasmiques marquées Sox2 sont parfois visibles. (B) Sox2 est observé dans le noyau des cellules épithéliales de la branchie mais aussi dans des cellules en virgule. (C) Groupe de cellules marquées par Sox2 (), associées de manière lâche dans l'hémolymphe de la lumière d'un tubule (Lu). (D) Contrôle négatif sans sérum anti-Sox2. Ep, épithélium.*

Par ailleurs, un anticorps anti-Filamine d'huître, une protéine spécifique des lamellocytes (une sous-classe d'hémocytes), a été utilisé sur des sections de branchies préalablement incubées avec du BrdU. On remarquera que la dénaturation acide nécessaire au démasquage du BrdU n'a pas altéré la fluorescence de l'anticorps secondaire révélant la Filamine, mais qu'elle a toutefois quelque peu changé la morphologie des cellules qui apparaissent plus arrondies (**Figure 5C**). Cette expérience montre clairement que de nombreux noyaux sont marqués au BrdU et que parmi ceux-ci, un fort pourcentage est entouré d'un cytoplasme marqué par la Filamine (**Figure 5B-C**). Le fragment de branchie utilisé dans cette expérience a donc été le lieu non seulement de la prolifération de cellules mais également de la différenciation de ces cellules en hémocytes, sans qu'il y ait eu d'interaction avec d'autres tissus.

Cette expérience montre donc que non seulement les cellules souches ou précurseurs sont capables de proliférer dans un fragment de branchie isolé mais qu'ils peuvent également s'y différencier en hémocyte.

DISCUSSION

Le but de ce travail était la mise en évidence de l'existence de cellules souches somatiques chez un mollusque. Le fait que chez l'animal adulte la principale source de cellules souches somatiques soit l'hématopoïèse, a orienté nos recherches dans cette direction. D'autant que les bivalves se sont révélés ces dernières années des modèles d'intérêt en gérontologie à cause de leur durée de vie exceptionnelle (11). Par ailleurs, l'étude des fonctions très variées des hémocytes a fait l'objet de nombreux travaux (revus dans 12) et notamment, l'étude de leur rôle dans la défense immunitaire du mollusque (4). Pourtant, la question fondamentale du renouvellement des tissus et en particulier des hémocytes, une question fondamentale et ancienne (13), est restée à ce jour sans réponse.

Etant donné les connaissances fragmentaires en biologie cellulaire et moléculaire chez le mollusque, il est apparu que l'analyse immunohistologique était l'approche la mieux à même de répondre à nos interrogations. D'un point de vue technique, la forte autofluorescence des tissus de mollusque (notamment à 488 nm) a nécessité l'utilisation d'anticorps primaires très réactifs contre des marqueurs abondants

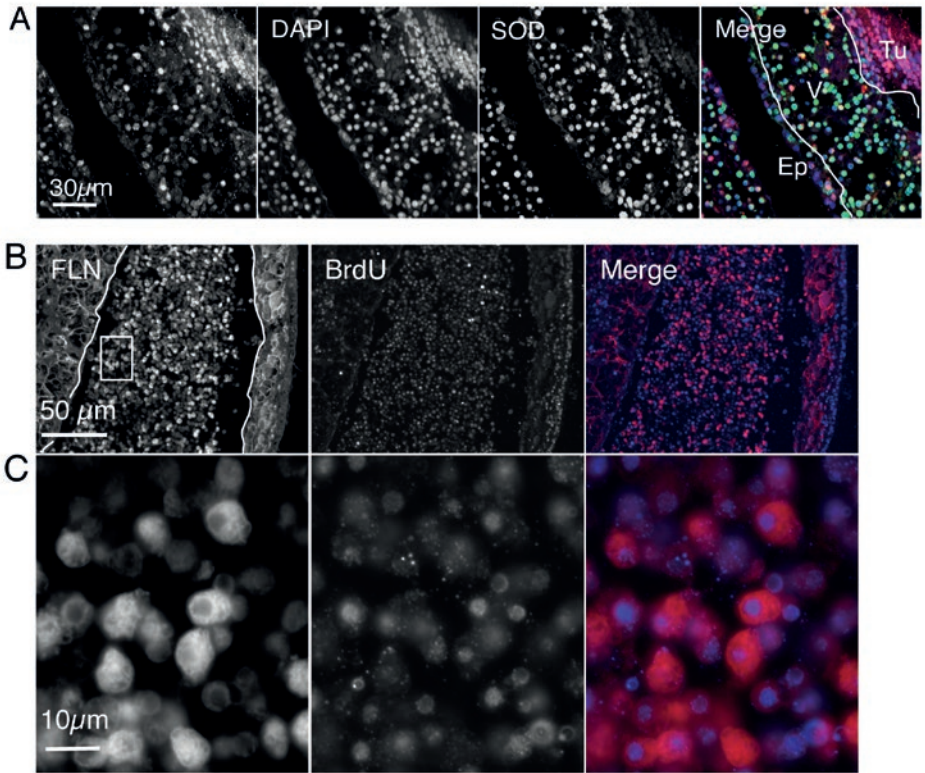


Figure 5 : Petites cellules de la branchie arborant des marqueurs de cellule souche ou de précurseur et d'hémocyte. (A) Progéniteurs d'hémocytes marqués conjointement par Sox2 (rouge), SOD (vert) et DAPI (bleu). La structure irrégulière est composée de plusieurs couches de cellules précurseurs marquées par Sox2 dans la zone des tubules (Tu) alors que les hémocytes, marquées par SOD sont essentiellement dans la zone du vaisseau (V). De façon similaire, les cellules comarquées par Sox2 et SOD sont localisées dans le vaisseau, ce qui suggère que les cellules précurseurs migrent vers le vaisseau dans lequel elles se différencient en hémocytes. Ep, épithélium. (B) Les cellules précurseurs répliquent leur ADN et se différencient en hémocyte dans la branchie. Un fragment isolé de branchie a été incubé dans 25 µM de BrdU pendant 16 h puis fixé et soumis à l'analyse immunohistochimique. Les noyaux marqués par le BrdU (bleu) et la Filamine (rouge) ont été révélés comme ci-dessus. L'analyse montre qu'une abondance de lamellocytes, une classe d'hémocytes arborant la Filamine, présents dans un vaisseau de la branchie ont incorporé du BrdU dans leur noyau, ce qui indique à la fois la réplication de leur ADN et leur différenciation au cours de cette expérience. (C) A plus fort grossissement, on note l'aspect typique de l'incorporation de BrdU dans l'ADN nucléaire d'hémocytes portant le marqueur Filamine.

(H3P, SOD, Sox2 et Filamine), afin d'obtenir un rapport signal/bruit de fond compatible avec l'analyse en microscopie.

La comparaison des images obtenues en histologie et en immunohistologie a été riche d'enseignements. Elle a mis en évidence des structures irrégulières, très différentes du plissement en unités répétitives décrit jusqu'à présent. Ces nouvelles structures ont à leur tour été instrumentales dans l'observation du relargage de petites cellules en forme de virgule, une morphologie de cellule souche ou précurseur, dans l'hémolymph de l'huître. Les différents marqueurs utilisés en immunofluorescence ont permis d'établir (i) que la branchie est le lieu principal de prolifération de cellules dont la morphologie est semblable à celle des cellules souches ou précurseurs (2i) que ces cellules souches et/ou précurseurs sont très abondantes dans la branchie et (3i) qu'elles s'y différencient en hémocyte, (4i) montrant ainsi que l'hématopoïèse se déroule au sein même de la branchie et (5i) que la sous-classe des lamellocytes, des hémocytes spécialisés dans la lutte contre les parasites, existe chez les mollusques. L'ensemble de ces caractères permet notamment d'attribuer la fonction de glande lymphoïde à la branchie de mollusque.

En conclusion, l'analyse immunohistologique a permis de montrer pour la première fois l'existence de cellules souches chez le mollusque et le déroulement de l'hématopoïèse dans sa branchie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. FINCH C. E. and AUSTAD S. N. History and prospects: symposium on organisms with slow aging. *Exp. Gerontol.*, 2001, **36**, 593-597.
2. BUTLER P. G., WANAMAKER A. D., SCOURSE J. D., RICHARDSON C. A., REYNOLDS D. J. Variability of marine climate on the North Icelandic Shelf in a 1357-year proxy archive based on growth increments in the bivalve *Arctica islandica*. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.*, 2013, **373**, 141-151.
3. BODNAR A. Marine invertebrates as models for aging research. *Exp. Gerontol.*, 2008, **44**, 477-484.
4. SCHMITT P., ROSA R. D., DUPERTHUY M., DE LORGERIL J., BACHÈRE E. and DESTOUMIEUX-GARZÓN D. The Antimicrobial defense of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora, *Front. Microbiol.*, 2012, **3**, 160.

5. HARTENSTEIN V. Blood Cells and Blood Cell Development in the Animal Kingdom. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2006, **22**, 677–712.
6. VOGT G. Hidden treasures in stem cells of indeterminately growing bilaterian invertebrates. *Stem Cell Rev.*, 2012, **8**(2), 305-317.
7. GALTSOFF P. S. - The American oyster, ed Udall SL, (US Dept Interior, Washington), 1964.
8. LIU K., JIANG M., LU Y., CHEN H., SUN J., WU S., KU W. Y., NAKAGAWA H., KITA Y. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell. Signal.*, 2013, **25**(5), 1264-1271.
9. GONZALEZ M., ROMESTAND B., FIEVET J., HUVET A., LEBART M. C., GUEGUEN Y., BACHER E. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2005, **338**(2), 1089–1097.
10. JEMAÀ M., MORIN N., CAVELIER P., CAU J., STRUB J.M., DELSERT C. Adult somatic progenitor cells and hematopoiesis in oysters. *J. Exp. Biol.*, 2014, **217**, 3067-3077.
11. PHILIPP E. and ABELE D. Masters of Longevity: Lessons from Long-Lived Bivalves – A Mini-Review. *Exp. Gerontol.*, 2010, **56**, 55-65.
12. CHENG, T. - The American oyster *Crassostrea virginica*, eds Kennedy VS, Newell R. I. E., Eble, A. F. (University of Maryland System, Trenton), pp 299-326, 1996.
13. CUÉNOT, L. Le sang et les glandes lymphatiques. In: Lacaze-Duthiers H, editor. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*. Paris: Académie des Sciences, 1891.

LA PLACE DES DIATOMÉES DANS LE DIAGNOSTIC DE LA NOYADE

Bertrand LUDES

*Institut Médico-Légal, 2 Place Mazas, 75012 PARIS
Université Paris Descartes, Sorbonne Cité,
12 rue de l'École de Médecine, 75005 PARIS*

INTRODUCTION

La recherche et l'identification des diatomées dans les tissus prélevés lors de l'autopsie d'une victime présumée s'être noyée est une des analyses proposées. Ce diagnostic de noyade est l'un des plus difficiles en médecine légale notamment quand le corps est en voie de décomposition. En effet ces algues microscopiques, au squelette siliceux, sont inhalées lors des efforts respiratoires de la victime lors de la noyade. Ainsi de nombreux auteurs (1-4) ont proposé de considérer les diatomées présentes dans tous les cours d'eau comme marqueurs de la noyade vitale. Ces algues, une fois inhalées, passent dans les voies aériennes puis franchissent la barrière pulmonaire alvéolo-capillaire (rompue par l'inhalation d'eau) pour pénétrer dans la circulation sanguine et s'immobiliser dans les organes de la victime. La principale limite de cette méthode est constituée par la contamination du tissu analysé par des diatomées qui ont pénétré dans l'organisme soit du vivant de la victime (par voie aéro-digestive : fruits de mer, éventualité très rare toutefois) ou lors du séjour dans l'eau (pénétration pulmonaire due à la pression hydrostatique selon la profondeur de découverte du corps), ou encore lors de l'autopsie médico-légale par contamination des instruments ou des tubes où sont placés les prélèvements (5). Pour écarter une telle contamination, il est indispensable d'analyser la flore des diatomées du milieu d'immersion et de vérifier que les diatomées trouvées dans les organes appartiennent bien à cette flore.

MATERIEL ET METHODES

LES PRÉLÈVEMENTS

Prélèvements d'eau

Les prélèvements sont effectués sur le lieu de découverte du corps mais également à distance de l'endroit où la victime est supposée s'être précipitée ou avoir été précipitée dans l'eau. Les prélèvements doivent être faits à plusieurs endroits sur un même cours d'eau pour pouvoir mettre en évidence une variation dans la flore aquatique. Ces prélèvements comportent :

- de l'eau superficielle, courante, d'un volume de 1 litre ;
- un prélèvement d'eau profonde pouvant inclure du gravier pour récolter les diatomées fixées sur ce support (la profondeur dépend du cours d'eau).

Les prélèvements les plus utiles pour retrouver la flore des diatomées sont ceux obtenus par grattage d'une surface pierreuse présent sur les berges du cours d'eau. Le produit de grattage est mis dans un peu d'eau venant du cours d'eau dans un flacon de 50 ml à bouchon glissant bleu ou rouge.

Prélèvements tissulaires

Les prélèvements tissulaires seront effectués sur les tissus pulmonaire (**Figure 1**), cérébral (**Figure 2**), rénal (**Figure 3**), hépatique, et sur la moelle osseuse (**Figures 4, 5 et 6**). Il s'agira de prélever des échantillons sous forme de cube de 1 cm de côté et peser 10 g sauf pour la moelle osseuse qui sera retirée des diaphyses fémorales. Il conviendra de prélever deux échantillons par tissus cités précédemment sauf pour les poumons où les prélèvements seront faits aussi bien en profondeur qu'en surface de chaque lobe pulmonaire et ceci en double.

CONSERVATION ET TRAITEMENT DES PRÉLÈVEMENTS

Les prélèvements peuvent être conservés à + 4 °C ou congelés à - 20 °C. Il convient de signaler que les diatomées ne sont pas sensibles à la putréfaction.

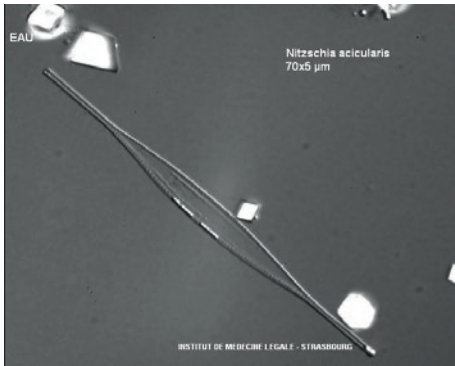


Figure 1

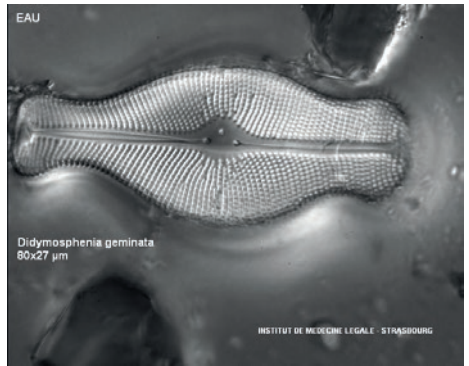


Figure 2

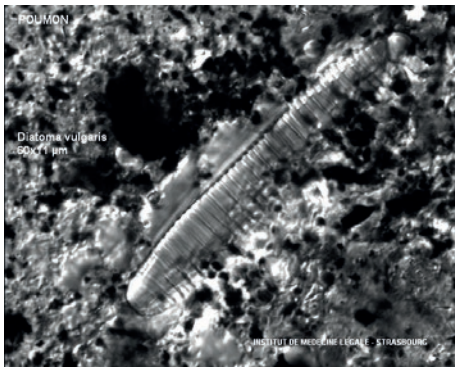


Figure 3

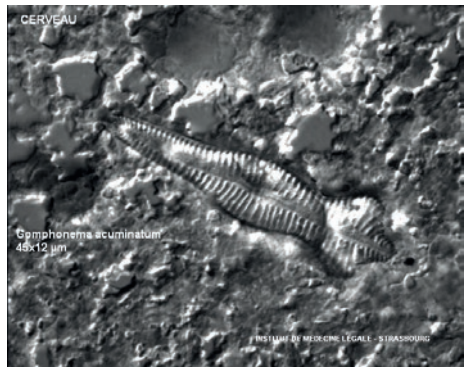


Figure 4



Figure 5



Figure 6



Figure 7

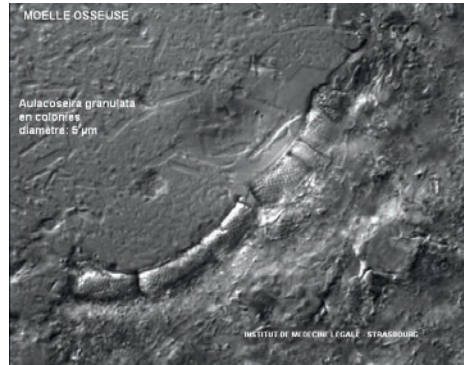


Figure 8

Si les prélèvements sont rapidement acheminés au laboratoire, il n'y a pas lieu d'appliquer une conservation particulière aux prélèvements.

Le prélèvement d'eau est étalé sur lame et les éléments végétaux sont ensuite carbonisés par flambage. Les diatomées résistant à cette carbonisation restent présentes sur la lame de verre et sont fixées par l'alcool avant l'examen au microscope (Figures 7 et 8).

Les tissus sont digérés par la protéinase K. Deux grammes de tissu sont utilisés et sont digérés dans un tampon de 20 ml de Tris-HCl à 0,01 M contenant 2 % de SDS (dodécylsulfate de sodium), 100 ml de protéinase K (concentration finale à 10 mg/ml) qui sont ajoutés au milieu de réaction. Les échantillons sont alors centrifugés à 2000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est retiré et le culot rincé à l'aide de 20 ml d'eau bidistillée. Après une centrifugation finale, le culot est récupéré et étalé entre lame et lamelle.

CRITÈRES DE DIAGNOSTIC POSITIF À LA NOYADE

Des critères de diagnostic positif à la noyade ont été définis par l'analyse de 20 diatomées / 100 µl de culot extrait à partir de 2 g de tissu pulmonaire et de 5 diatomées / 100 µl de culot extrait à partir de 2 g des autres organes cités (6). Les diatomées trouvées dans les tissus doivent obligatoirement être présentes dans la flore du liquide d'immersion. C'est donc l'analyse aussi bien qualitative que quantitative qui permet de poser ce diagnostic en écartant toute possibilité

de contamination des tissus par des diatomées ayant pénétré dans l'organisme indépendamment de l'épisode de la noyade (7, 8).

LE CAS DE CORPS DECOMPOSES

Dans les cas de corps décomposés, les cavités thoraciques ou abdominales sont fréquemment ouvertes, laissant pénétrer l'eau dans laquelle le corps a été trouvé. Les tissus sont donc contaminés et ne peuvent plus être analysés pour établir le diagnostic de noyade. Suivant le degré de décomposition, le cerveau est souvent liquéfié, putréfié, et également en contact avec l'eau environnante. Ainsi, le diagnostic de noyade peut être posé sur un corps décomposé par l'analyse des organes s'ils n'ont pas été exposés au milieu hydrique. Dans le cas contraire, l'analyse ne portera que sur la moelle osseuse. L'analyse quantitative et qualitative des diatomées retrouvées aussi bien dans le tissu médullaire que dans le milieu hydrique permet en cas de positivité du test de poser le diagnostic de la noyade. Il est capital de respecter les critères de positivité proposés précédemment pour écarter toute possibilité de contamination post-mortem des tissus de la victime par des diatomées.

CONCLUSION

La recherche et l'identification de diatomées représente une analyse pertinente pour le diagnostic de noyade notamment dans les cas de corps putréfiés. Elle vient se rajouter aux autres méthodes de diagnostic pour constituer un faisceau d'arguments en faveur du diagnostic de noyade. Les espèces de diatomées seront toujours comparées à la flore des cours d'eau où la victime a été retrouvée, corps ou squelette. Si les critères de positivité sont retrouvés, la noyade vitale peut être retenue.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AUER A, MOTTONEN M. Diatoms and drowning. *Z. Rechtsmed.*, 1988, **101**(2):87-98.
2. DAVIS JH. Bodies found in the water. An investigative approach. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1986, **7**(4):291-7.

3. DIMAIO VJ. Homicidal asphyxia. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 2000, **21**(1):1-4.
4. POLLANEN MS. Diatoms and homicide. *Forensic Sci. Int.*, 1998, **91**(1):29-34.
5. POLLANEN MS, CHEUNG C, CHIASSON DA. The diagnostic value of the diatom test for drowning, I. Utility: a retrospective analysis of 771 cases of drowning in Ontario, Canada. *J. Forensic Sci.*, 1997, **42**(2):281-5.
6. LUDES B, QUANTIN S, COSTE M, MANGIN P. Application of a simple enzymatic digestion method for diatom detection in the diagnosis of drowning in putrified corpses by diatom analysis. *Int. J. Legal Med.*, 1994, **107**(1):37-41.
7. LUDES B, COSTE M, NORTH N, DORAY S, TRACQUI A, KINTZ P. Diatom analysis in victim's tissues as an indicator of the site of drowning. *Int. J. Legal Med.*, 1999, **112**(3):163-6.
8. LUDES B, COSTE M, TRACQUI A, MANGIN P. Continuous river monitoring of the diatoms in the diagnosis of drowning. *J. Forensic Sci.*, 1996, **41**(3):425-8.

CARACTÉRISATION DE L'ALTÉRATION OSSEUSE POST-MORTEM PAR HISTOMORPHOLOGIE DANS UN CONTEXTE MÉDICO-LÉGAL : ÉTUDE TAPHONOMIQUE SUR RESTES HUMAINS

Yann DELANNOY^{*1,2,3,4}, Catherine CANNET^{1,5}, Claire LOURIA¹,
Guillaume PENEL⁴, Thomas COLARD^{3,4}, Bertrand LUDES¹

** Auteur correspondant*

*Institut de Médecine Légale – CHRU de Lille,
rue André Verhaeghe, 59037 LILLE CEDEX, France*

Phone : + 33 320 62 35 05

Fax : +33 320 62 35 12

Mail : yann.delannoy@univ-lille2.fr

*1. Institut Médico-Légal de Paris
Université Paris Descartes Sorbonne Cité, 75000 PARIS, France*

*2. Service de médecine Légale
CHRU de LILLE, 59000 LILLE, France*

*3. EA 7367 Forensic Taphonomy Unit - Lille Forensic Institute
Université de Lille, 59000 LILLE, France*

*4. EA 4490 Physiopathologie des maladies osseuses inflammatoires
Université de Lille, 59000 LILLE, France*

*5. Laboratoire d'histomorphométrie de Médecine Légale
Faculté de Médecine, 67000 STRASBOURG, France*

Aucun conflit d'intérêt de la part des auteurs de cette publication

RESUME

L'altération d'un os en période *post-mortem*, est à l'origine d'une détérioration identifiable en histologie. La dégradation de l'os se caractérise notamment par une altération collagénique observable précocement.

Dans le but de pouvoir caractériser cette altération, deux côtes ont été prélevées sur 6 corps humains et étudiées prospectivement pendant les 2 ans suivant le décès. Chaque os a fait l'objet d'une coupe histologique étudiée après coloration au rouge Sirius afin de mettre en évidence la dégradation du collagène en fonction du temps.

Une altération osseuse temporelle a pu être mise en évidence par une dégradation architecturale de l'os lamellaire, en l'absence de toute attaque microbienne sur cette période *post-mortem*. La coloration pratiquée à l'aide du rouge Sirius a permis d'attribuer cette altération à une dégradation collagénique de type hydrolyse chimique en raison de l'affinité de ce colorant pour les acides aminés Lysine, Hydroxylysine et Arginine.

Notre travail a permis d'affirmer que des échantillons osseux humains étudiés en environnement contrôlé, et analysés pendant 24 mois, subissent une trajectoire diagénétique dont l'élément principal est l'hydrolyse collagénique.

Mots-clés : médecine légale ; anthropologie ; diagénèse ; hydrolyse du collagène

ABSTRACT

The diagenesis of a bone in the post-mortem period causes an identifiable deterioration in histology. More particularly, the degradation of the bone is characterized by a collagenous alteration which is observable very early.

In order to be able to characterize this alteration, two ribs collected from 6 human bodies were studied prospectively during 2 years. Each bone was studied after staining with red Sirius in order to demonstrate the degradation of collagen as a function of time.

A temporal bone alteration could be demonstrated by an architectural degradation of the lamellar bone in the absence of any microbial attack on this post-mortem period. The coloring carried out using red Sirius correlated this alteration to a collagenic degradation by chemical hydrolysis because the affinity of this colorant to the amino acids Lysine, Hydroxylysine and Arginine.

Our work asserts that human bone samples studied in controlled environment, and analyzed for 24 months, undergo a diagenetic trajectory whose main element is collagen hydrolysis.

Keywords : forensic medicine ; anthropology ; diagenesis ; collagen hydrolysis

INTRODUCTION

L'altération *post-mortem* d'un os est influencée par son environnement. Du matériel exogène venant de ce milieu va en effet être incorporé dans l'os et ce dernier va relarguer ses composants endogènes vers le milieu extérieur (1). Pour illustrer les phénomènes d'incorporation ou de relargage entre l'os et son environnement, 5 types de mesures reconnues dans la littérature ont été définies pour couvrir l'ensemble du processus de diagénèse (1,2) : la perte de collagène ; la modification de la cristallinité ; les modifications de porosité ; la teneur en carbonates ; l'index de préservation histologique. Ce dernier est établi à la suite de coupes histologiques examinées au microscope optique ou en microscopie électronique à balayage (3-5). Une bonne préservation histologique permet notamment l'identification des ostéons, de l'os interstitiel, et des trabécules de l'os spongieux. Une mauvaise préservation montrera des lacunes osseuses associées à des remplacements de structures par de la matière minérale appelée « nodules hyperminéralisés » qui à terme disparaissent pour faire place à des porosités. Cette altération structurelle est en partie à mettre en relation avec des attaques microbiennes (3).

L'index de préservation histologique peut être classé selon 6 stades numérotés de 0 à 5. Un autre index de préservation histologique a été défini sur des coupes plus fines par Garland *et al.*, puis adapté par Jans *et al.*, en 5 modifications diagénétiques (6,7) caractérisées par :

- Des destructions focales microscopiques (MFD) ou tunnels (3), correspondant à des pertes collagéniques et d'hydroxyapatite ;
- Des inclusions de matériel exogène inclus dans les espaces osseux (dépôts fongiques, du sable, de la pyrite...) ;
- Des infiltrations de matériel exogène ferreux (colorés par la réaction de Perls) et/ou des cristaux d'hydroxyapatite altérés ;
- Des fissures envahissant le système harversien ou restreintes aux ostéons (microfissures). Leurs différences de tailles sont liées à leurs causes, à savoir l'influence de l'environnement (humidité, température) pour les fissures larges et le remodelage lié aux altérations organo-minérales pour les microfissures ;
- L'intensité de la biréfringence examinée en lumière polarisée sur les ostéons.

Cette étude taphonomique souhaitait s'inscrire dans une temporalité « précoce » à l'échelle de l'anthropologie. L'hypothèse principale de ce travail était constituée par une dégradation organique de l'os sous la forme d'une dégradation collagénique observable très précocement et prospectivement. L'objectif était également de mettre en évidence le mode d'altération organique incriminé.

MATERIELS ET METHODES

Matériels

Les prélèvements osseux ont été réalisés à partir de cadavres issus du don de corps testamentaires à la science.

Notre travail a été effectué sur six sujets humains (quatre hommes âgés de 72, 82, 87 et 88 ans et deux femmes âgées de 80 et 92 ans), exempts de pathologie osseuse connue. Pour chaque individu, deux côtes ont été prélevées le jour du décès (1^{ère} et 4^{ème} côte droite) et les tissus mous environnants (tendons et muscle) ont été immédiatement retirés manuellement sans qu'aucun traitement chimique ne leur soit appliqué, afin d'éliminer de potentiels biais de traitement. Ces côtes étaient ensuite placées dans le milieu de vieillissement. Pour chaque sujet, le choix des os étudiés s'est orienté vers les côtes n°1 et 4, étant donné que celles-ci ont un intérêt médico-légal reconnu, notamment en vue de la détermination de l'âge au décès (12,13) et que leur large surface d'échange associée à la finesse de leur corticale leur confère la particularité d'être très sujettes à la diagénèse (14).

Ces côtes ont été placées dans un milieu extérieur et les données météorologiques ont été relevées quotidiennement par MétéoFrance©. Trimestriellement pendant une année et enfin, ponctuellement à 24 mois, les côtes étaient extraites de leur milieu de conservation, sectionnées transversalement sur une épaisseur de 5 mm au disque diamanté en vue d'une recoupe histologique, et enfin, les côtes étaient replacées dans leur milieu de vieillissement.

Méthodes

Les fragments de côtes osseuses ont été fixés dans du formol à 10% tamponné à pH 7,2 pendant 21 jours, dans le but de stabiliser les structures tissulaires. Une fois fixés, les fragments osseux ont été décalcifiés. La solution de décalcification employée est le liquide de Kristensen, composé d'acide formique et de formate de sodium (15). Cette méthode de décalcification utilise un acide faible, de ce fait, elle est moins agressive pour le tissu osseux. Les temps de décalcification ont été de 17 heures pour l'ensemble des côtes, à l'exception d'un des six sujets, dont le temps de décalcification nécessaire a été de 28 heures. A l'issue de la décalcification, les fragments ont été rincés pendant 2 heures sous eau courante, puis déshydratés selon le schéma appliqué aux organes de routine (cycle de 19h : éthanol de 50% à 100%, puis xylène), et enfin inclus en paraffine. De nombreux protocoles de coloration du collagène existent en pratique histologique à visée médicale. Pour exemples, on peut citer la coloration de van Gieson, les trichromes de Masson, Mallory et Heidenhain, mais surtout, la coloration au rouge Picro-Sirius (PS) dont le colorant est le rouge Sirius F3B qui est la plus spécifique et sensible de ces méthodes (16). Le rouge Sirius colore sélectivement les collagènes de type I et III, et est spécifique des acides aminés Lys, Arg et Hydroxylysine. La coloration est d'autant plus marquée que son observation se fait en lumière polarisée. En effet, les molécules de rouge Sirius s'alignent le long des fibres de collagène et augmentent leur biréfringence. Ainsi, des coupes de 5µm ont été faites et les colorations suivantes réalisées :

- Hématoxyline et Eosine (H&E) pour l'étude de la morphologie générale ;
- Rouge Picro-Sirius (PS) pour la mise en évidence des fibres de collagène observées en lumière polarisée (18).

Une station de vidéo microscopie a été utilisée dans le cadre de cette étude. Celle-ci, équipée d'un ordinateur se compose :

- D'un microscope Axioscope A1 (Zeiss®) équipé d'un tube trinoculaire, d'une tourelle 6 positions avec les objectifs EC Plan-Neofluar (2,5X, 5X, 10X, 20X, 40X), d'un système de polarisation orientable de 0° à 90°, ainsi que d'un objectif 10X muni d'un coulisseau DIC et d'une platine encodée ;
- D'une station d'acquisition d'images, équipée d'une caméra CCD 2 millions de pixels, pour fond clair et polarisation, des logiciels Microvision Instruments® :

Archimed© pour la base de données d'images et l'acquisition, et Histolab© pour la cartographie de grandes coupes tissulaires et la quantification de structures tissulaires (nombre, surface, angles, longueur, couleur...) ;

Pour visualiser les observations microscopiques, différents éclairages ont été utilisés :

- Une observation classique des tissus en microscopie à fond clair ;
- Une observation en lumière polarisée ;
- Une observation avec le «Nomarski Interference Contrast» (NIC), qui permet de visualiser la bio-érosion osseuse (4,19).

Tout d'abord, chaque coupe histologique a été colorée par l'H&E puis cartographiée sur fond clair en utilisant un grossissement x2,5. La cartographie de grandes coupes tissulaires, réalisée par le logiciel Histolab© dans des délais très courts, permet d'obtenir une vue d'ensemble de la coupe et de localiser avec précision toute lésion, même minime présente sur le tissu. Elle nous a ainsi permis de localiser au sein de chaque coupe la position des structures osseuses altérées. A partir de ces cartographies, il a été possible de différencier les zones osseuses altérées des zones non altérées (7). Puis, chaque structure dégradée a été observée sur fond clair, en lumière polarisée, ou en NIC, en utilisant un grossissement x40 sur la coloration PS. Cela nous a permis une meilleure observation des caractéristiques de la dégradation collagénique.

RESULTATS

Au niveau des ostéons non dégradés (à 0 mois *post-mortem*), nous avons observé un aspect continu des lamelles osseuses concentriques parallèles. Elles ne présentent aucune altération architecturale. De plus, la biréfringence est très visible au niveau ostéonique sous la forme d'une croix de Malte (**Figure 1**). A partir de 6 mois (systématiquement) et jusque 24 mois *post-mortem*, on observe une désorganisation de l'architecture lamellaire osseuse. Jusque 12 mois *post-mortem*, ce sont les ostéons qui montrent une érosion de leur partie la plus centrale, témoin de la dégradation osseuse autour du canal de Havers (**Figure 2, tableau 1**). Cette dégradation semble se faire de manière centrifuge, du centre vers la périphérie. A 24 mois *post-mortem*, cette dégradation ostéonique se poursuit et s'associe

à une dégradation de la partie située surtout en région la plus externe de l'os cortical, où la désorganisation de l'architecture lamellaire osseuse apparaît. Cette altération de l'architecture lamellaire ne présente pas les caractéristiques d'une altération de type lacunaire (par des tunnels) liée à des microorganismes. Ces tunnels sont, le cas échéant, habituellement de taille plus importante et bordés de zones hyperminéralisées.

Une réduction de la biréfringence est également observée à partir de 3 mois *post-mortem* avec disparition progressive qui se poursuit jusque 24 mois et témoigne d'une dégradation du collagène.

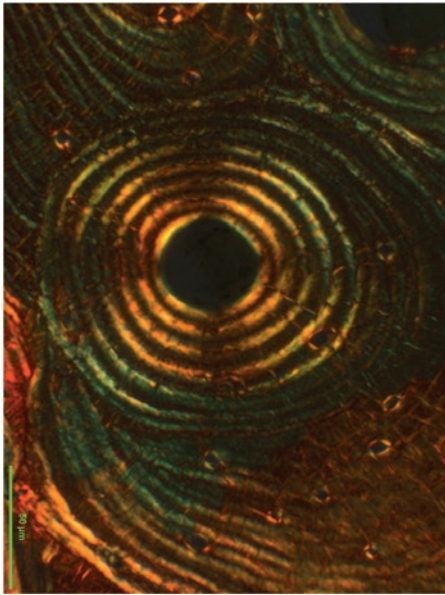


Figure 1 : Aspect microscopique des ostéons présentant une organisation concentrique des lamelles osseuses centrées sur le canal de Havers et montrant une forte intensité de la biréfringence à 0 mois DPM - Coloration au PS visualisée en polarisation.

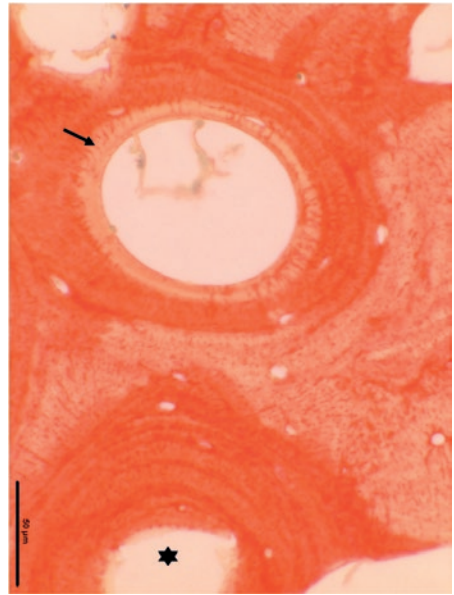


Figure 2 : Aspect microscopique de la bioérosion des ostéons à 12 DPM : perte de la fixation du rouge Sirius en périphérie du canal de Havers (flèche) et comparaison avec un ostéon ne présentant pas de dégradation de la même région (étoile) - Coloration au PS.

N° Sujet	Côte	Temps	Nombre d'ostéons dégradés	Nombre de zones de dégradation des lamelles interstitielles	Nombre de zones de dégradation des lamelles périphériques
709	C4	T0	0	0	0
		T3	N/A	0	0
		T6	0	0	0
		T9	3	0	0
		T12	5	0	0
		T24	6	1	1
715	C4	T0	0	0	0
		T3	1	0	0
		T6	1	0	0
		T9	4	0	0
		T12	8	0	0
		T24	14	2	2
721	C4	T0	0	0	0
		T3	0	0	0
		T6	1	0	0
		T9	2	0	0
		T12	5	0	0
		T24	10	2	4
722	C4	T0	0	0	0
		T3	0	0	0
		T6	0	0	0
		T9	3	0	0
		T12	8	0	0
		T24	10	0	3
746	C4	T0	0	0	0
		T3	2	0	0
		T6	1	0	0
		T9	5	0	0
		T12	10	0	0
		T24	19	2	5
747	C4	T0	0	0	0
		T3	0	0	0
		T6	2	0	0
		T9	5	0	0
		T12	10	0	0
		T24	15	2	4

Tableau 1 : Dénombrement des zones osseuses dégradées en fonction des temps d'étude (exemple de la côte C4).

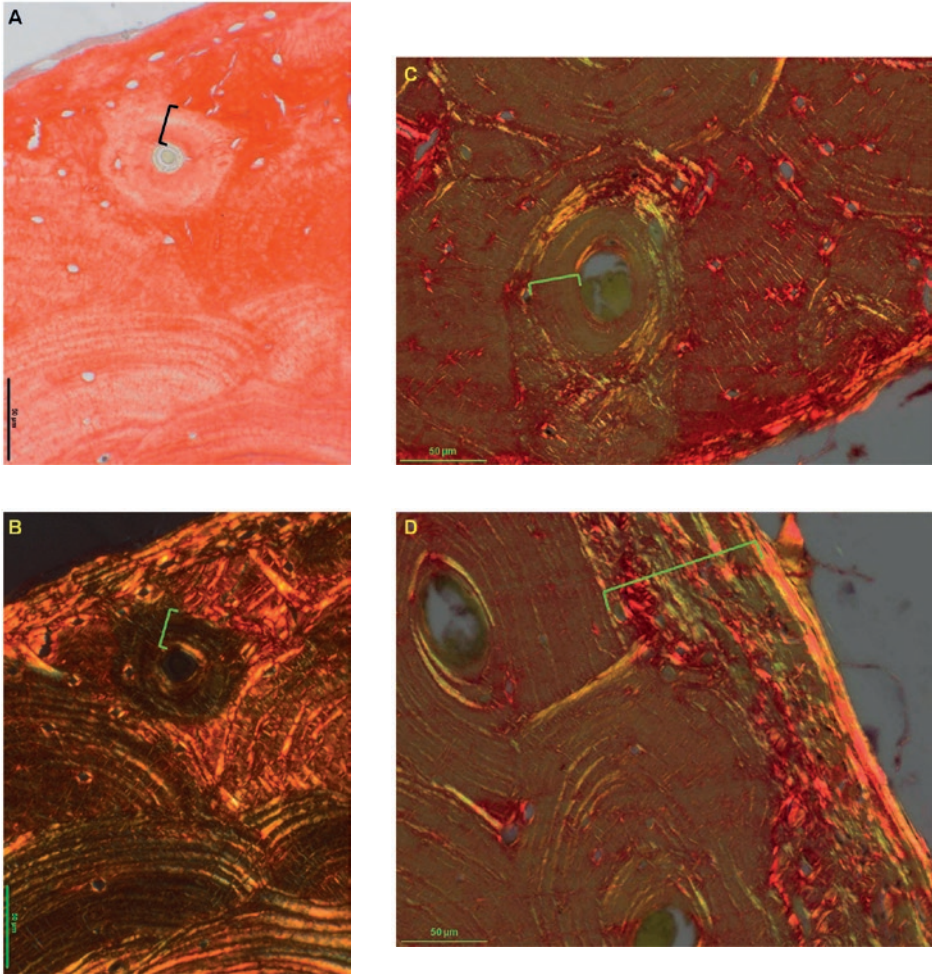


Figure 3 : Aspect microscopique de la dégradation architecturale : Extension de la perte de fixation du rouge Sirius à la totalité de quelques ostéons et disparition quasi totale de la biréfringence des lamelles ostéoniques (crochets) déjà observable à 12 mois DPM - **A** : PS et **B** : même zone visualisée en polarisation. A 24 mois, la perte de l'architecture lamellaire se poursuit avec disparition de la biréfringence des lamelles ostéoniques (crochet). Parallèlement, la dégradation des lamelles osseuses apparaît en périphérie de l'os cortical (crochet), sans qu'il ne soit observé de tunnels ou de lacunes de types bactériens - **C** et **D** : Ps visualisé en polarisation.

DISCUSSION

Notre travail, réalisé sur une période de 2 ans, a permis de mettre en évidence une altération osseuse par une étude microscopique histologique qui a montré l'absence de toute attaque microbienne sur cette période *post-mortem*. Ceci pose la question du mécanisme d'altération organique collagénique mis en cause.

Outre l'index de préservation histologique classiquement décrit où les atteintes osseuses bactériennes sont individualisées en coupes sous formes de lacunes (1), un autre index de préservation histologique a été défini sur coupes fines par Garland *et al.*, et adapté par Jans *et al.*, en 5 modifications diagénétiques identifiables (6,7). Notre travail histomorphologique n'ayant pas mis en évidence de lacunes (ou tunnels ou MFD) évocatrices d'altérations bactériennes, les autres modifications osseuses diagénétiques mesurables selon les travaux de Garland et Jans ont été explorées afin d'identifier le mécanisme en cause dans la dégradation osseuse que nous avons observée. Ainsi, deux de ces modifications histologiques ont été recherchées dans notre travail : l'une qualitative via la modification de l'intensité de biréfringence, et l'autre quantitative par la comptabilisation des lésions architecturales (microfissures).

Quand des sections osseuses sont examinées en lumière polarisée, un patron de biréfringence peut être identifié et se présente sous la forme d'une alternance de bandes lumineuses brillantes et de bandes sombres. Pour l'architecture lamellaire des ostéons, ce patron s'exprime par un aspect en « croix de Malte ». L'intensité de la biréfringence est notamment dépendante de la quantité et de l'orientation des fibres de collagène, mais également de l'épaisseur de la coupe étudiée. Une réduction de cette intensité (voire une absence) peut s'interpréter comme liée à la détérioration du collagène (20). Dans notre travail, cette biréfringence était visible lors des premières coupes à 0 mois *post-mortem*, elle se réduisait à 3, 6 et 9 mois, pour complètement disparaître à 12 et 24 mois. Cette disparition de la biréfringence montre donc une dégradation du collagène sur cet intervalle *post-mortem* « court », sans signe d'altération bactérienne initiale de l'os.

La quantification des microfissures est établie le plus souvent, selon une unité structurelle formée par un ostéon. Dans notre travail, nous avons dénombré les ostéons altérés et montré qu'à partir de 6 mois, des dégradations étaient présentes sur chaque sujet, et qu'elles étaient quantitativement plus nombreuses à 9 mois,

puis à 12 mois et enfin à 24 mois. Bien que nous n'ayons pas visuellement observé ces microfissures, la désorganisation architecturale lamellaire osseuse a été particulièrement mise en évidence sur nos échantillons au pourtour des canaux de Havers jusque 12 mois *post-mortem*, puis s'est associée une désorganisation de la zone corticale la plus externe. Cette observation confirme les données de la littérature s'agissant d'études osseuses prospectives sur de courtes périodes *post-mortem*. L'étude de Peretzschner montrait qu'aucune microfissure n'était expérimentalement produite sur l'os interstitiel (21) et que celles-ci peuvent être temporellement longues à observer en microscopie. C'est ce qui semble être le cas dans notre travail alors qu'elles expliqueraient parfaitement la perte de l'architecture lamellaire que nous visualisons. Ces microfissures sont attribuées dans la littérature (7) aux altérations diagénétiques organo-minérales de l'os, et plus particulièrement au gonflement provoqué par une gélatinisation du collagène (altération collagénique responsable d'une augmentation de sa solubilité) (21).

La coloration pratiquée secondairement à l'aide du rouge Sirius (absence de fixation sur ces zones altérées) a permis d'attribuer cette altération à une probable dégradation collagénique de type hydrolyse chimique en raison de l'affinité de ce colorant aux acides aminés Lysine, Hydroxylysine et Arginine. L'hypothèse que ces microfissures responsables de la perte de l'architecture osseuse lamellaire soient rattachées à une dégradation organique de type chimique est vraisemblable.

CONCLUSION

Notre travail permet donc d'affirmer que des échantillons osseux humains étudiés en environnement contrôlé, et analysés pendant 24 mois, subissent une trajectoire diagénétique évoluant au 2^{ème} stade défini par la littérature (22-25), à savoir celle qualifiée de « accelerated collagen hydrolysis », dans laquelle l'index histologique d'Oxford classiquement décrit reste élevé (1). Ces éléments indiquent que la dégradation organique observée dans notre étude n'était pas provoquée par des bactéries, mais plutôt en rapport avec une hydrolyse chimique. Cette hypothèse représente une des voies de recherche à poursuivre sur une temporalité plus longue, en multipliant les échantillons et les milieux de vieillissement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. HEDGES R. E., & MILLARD A. R. Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *Journal of Archaeological Science*, 1995, **22**(2), 155-164.
2. NIELSEN-MARSH C. M., & HEDGES R. E. Patterns of diagenesis in bone I : the effects of site environments. *Journal of Archaeological Science*, 2000, **27**(12), 1139-1150.
3. HACKETT C. J. Microscopical focal destruction (tunnels) in exhumed human bones. *Medicine, Science and the Law*, 1981, **21**(4), 243-265.
4. GARLAND A. N. A histological study of archaeological bone decomposition. In (A. Boddington, A. N. Garland & R. C. Janaway, Eds) *Death, Decay and Reconstruction*. Manchester: Manchester University Press, 109–126, 1985.
5. BELL L. S. Palaeopathology and diagenesis: an SEM evaluation of structural changes using backscattered electron imaging. *Journal of Archaeological Science*, 1990, **17**(1), 85-102.
6. GARLAND A. N., JANAWAY R. C., & ROBERTS C. A. A study of the decay processes of human skeletal remains from the parish church of the Holy Trinity, Rothwell, Northamptonshire. *Oxford Journal of Archaeology*, 1988, **7**(2), 235-249.
7. JANS M. M. E., KARS H., NIELSEN-MARSH C. M., SMITH C. I., NORD A. G., ARTHUR P., & EARL N. In situ preservation of archaeological bone : a histological study within a multidisciplinary approach. *Archaeometry*, 2002, **44**(3), 343-352.
8. WARNER S. E., SHEA J. E., MILLER S. C., & SHAW J. M. Adaptations in cortical and trabecular bone in response to mechanical loading with and without weight bearing. *Calcified tissue international*, 2006, **79**(6), 395-403.
9. DUCHER G., TOURNAIRE N., MEDDAHI-PELLÉ A., BENHAMOU C. L. & COURTEIX D. Short-term and long-term site-specific effects of tennis playing on trabecular and cortical bone at the distal radius. *Journal of bone and mineral metabolism*, 2006, **24**(6), 484-490.
10. MICHALSKY M., NORRISUAREZ K., BETTICA P., PECILE A., & MORO L. Rat cortical and trabecular bone collagen glycosylation are differently influenced by ovariectomy. *Biochemical and biophysical research communications*, 1993, **192**(3), 1281-1288.
11. MORKO J., KIVIRANTA R., HURME S., RANTAKOKKO J., & VUORIO E. Differential turnover of cortical and trabecular bone in transgenic mice overexpressing cathepsin K. *Bone*, 2005, **36**(5), 854-865.

12. IŞCAN M. Y., LOTH S. R. & WRIGHT R. K. Metamorphosis at the sternal rib end: a new method to estimate age at death in white males. *American journal of physical anthropology*, 1984, **65**(2), 147-156.
13. KUNOS C. A., SIMPSON S. W., RUSSELL K. F. & HERSHKOVITZ I. First rib metamorphosis: its possible utility for human age-at-death estimation. *American Journal of Physical Anthropology*, 1999, **110**(3), 303-323.
14. KING C. L., TAYLES N. & GORDON K. C. Re-examining the chemical evaluation of diagenesis in human bone apatite. *Journal of Archaeological Science*, 2011, **38**(9), 2222-2230.
15. KRISTENSEN H. K. An improved method of decalcification. *Stain technology*, 1948, **23**(3), 151-154.
16. WHITTAKER P., KLONER R. A., BOUGHNER D. R., & PICKERING J. G. Quantitative assessment of myocardial collagen with picosirius red staining and circularly polarized light. *Basic research in cardiology*, 1994, **89**(5), 397-410.
17. STEPHENSON B. A modified Picro-Sirius Red (PSR) staining procedure with polarization microscopy for identifying collagen in archaeological residues. *Journal of Archaeological Science*, 2015, **61**, 235-243.
18. JUNQUEIRA L. C. U., BIGNOLAS G. & BRENTANI R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, 1979, **11**(4), 447-455.
19. BROMAGE T. G., GOLDMAN H. M., MCFARLIN S. C., WARSHAW J., BOYDE A. & RIGGS C. M. Circularly polarized light standards for investigations of collagen fiber orientation in bone. *The Anatomical Record Part B : The New Anatomist*, 2003, **274**(1), 157-168.
20. GIRAUD-GUILLE M. M. Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons. *Calcified tissue international*, 1988, **42**(3), 167-180.
21. PERETZSCHNER H. U. Collagen gelatinization: the key to understand early bone-diagenesis. *Palaeontographica Abteilung A*, 2006, 135-148.
22. HEDGES R. E. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry*, 2002, **44**(3), 319-328.
23. TURNER-WALKER G., NIELSEN-MARSH C. M., SYVERSEN U., KARS H. & COLLINS M. J. Sub-micron spongiform porosity is the major ultra-structural alteration occurring in archaeological bone. *International Journal of Osteoarchaeology*, 2002, **12**(6), 407-414.

24. SMITH C. I., NIELSEN-MARSH C. M., JANS M. M. E. & COLLINS M. J. Bone diagenesis in the European Holocene I: patterns and mechanisms. *Journal of Archaeological Science*, 2007, **34**(9), 1485-1493.
25. NIELSEN-MARSH C. M., SMITH C. I., JANS M. M. E., NORD A., KARS H. & COLLINS M. J. Bone diagenesis in the European Holocene II: taphonomic and environmental considerations. *Journal of Archaeological Science*, 2007, **34**(9), 1523-1531.

LE TECHNICIEN ANAPATH DANS L' HUMANITAIRE

Alhierd ABRAMTCHIK (Alik)

*Association Pathologie Cytologie Développement, 1, rue de la Glacière,
92250 LA GARENNE-COLOMBES*

www.pcdonline.fr

INTRODUCTION

Pathologie Cytologie Développement (PCD) est une association «loi 1901» créée en 1992 dont les buts sont d'apporter une aide matérielle, morale et technique aux confrères pathologistes exerçant ou susceptibles d'exercer dans des pays à faible et moyen revenu, d'intégrer notre spécialité médicale à des actions humanitaires par le biais d'organisations non-gouvernementales, d'induire ou d'aider les associations de lutte contre le cancer et les pathologies infectieuses en favorisant des campagnes de diagnostic précoce. L'association participe aussi à l'enseignement universitaire et post-universitaire.

Cette association est basée sur le bénévolat avec le concours des distributeurs de produits et réactifs dédiés, de médecins, de techniciens de laboratoires, d'électriciens et d'électroniciens, d'informaticiens, d'ingénieurs technico-commerciaux et d'enseignants. Elle est financée par des subventions, des dons, les cotisations des membres, et grâce à l'aide d'autres ONG, ainsi que par l'organisation de concerts.

Les activités de l'association

L'association s'occupe de récupérer du matériel réformé des Hôpitaux, des laboratoires de recherche, de l'industrie pharmaceutique ou des cabinets d'anatomo-pathologie privés. Les matériels collectés sont réparés ou démontés pour pièces détachées (**Figure 1**). Une fois les besoins de nos pays destinataires clairement définis, les colis sont préparés pour être envoyés. Les distributeurs locaux, quand ils existent, sont informés des envois afin de ne pas les léser dans leurs activités commerciales. PCD n'est liée à aucune marque de fabricant de matériel ou de consommables, et redistribue gratuitement les dons qui lui sont faits. PCD aide en priorité les structures publiques sans se substituer aux autorités locales universitaires et hospitalières. Cependant PCD peut également aider les structures privées à condition que ces dernières s'engagent à remplir un rôle social (outils de dépistage, actes gratuits ou à prix coûtant). Les destinataires s'engagent à fournir un rapport annuel de leurs activités et PCD se réserve le droit de vérifier la bonne utilisation voire la reprise du matériel si l'utilisation ne correspond pas à l'éthique de solidarité.



Figure 1 : Récupération par les bénévoles de l'association du matériel réformé. Révision et remise en état avant la mise à disposition dans les centres à équiper.

Outre l'équipement d'Anatomie pathologique, l'association a fondé une école de techniciens à Yaoundé (Cameroun). Elle organise également des stages de formation en immunohistochimie dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie Sud-Est. Ces formations sont dispensées par des techniciens, cadres et formateurs (**Figure 2**).



Figure 2 : PCD assure aussi un rôle de formation. Ici est illustrée une mission d'enseignement à Yaoundé (Cameroun).

Le rôle du technicien en Anatomie Pathologique

Le technicien est amené à assurer toutes les étapes de la création du laboratoire. Après avoir révisé les équipements collectés, constitué les colis et palettes qui sont envoyés, il arrive sur le lieu de destination afin de les déballer, les mettre en place et ensuite de former ses collègues à l'utilisation des machines. Bien souvent, il apprend énormément de choses au contact des personnels qui travaillent dans des situations difficiles et doit faire face à des problèmes inconcevables dans son pays d'origine : coupure de courant, variations de tension, manque d'eau, hydratation des alcools absolus due à l'hygrométrie ambiante, pénurie de solvants ou de réactifs (colorants, paraffine, etc...). Son rôle est de donner la première impulsion puis d'assumer le suivi technique mais en aucun cas d'alimenter le laboratoire en consommables. Avant l'envoi de colis ou de missions, PCD s'assure de la possibilité des laboratoires destinataires de pouvoir subvenir à leurs besoins en consommables.

Quelques missions

PCD a depuis 1992, aidé de nombreux partenaires comme : Algérie, Arménie, Bénin, Biélorussie, Birmanie, Burkina Faso, Burundi, Cambodge, Cameroun, Colombie, Congo, Côte d'Ivoire, Gabon, Géorgie, Guinée, Haïti, Kosovo, Laos, Liban, Madagascar, Mali, Maroc, Mauritanie, Niger, Pologne, République Centrafricaine, République Démocratique du Congo, Roumanie, Sénégal, Slovaquie, Syrie, Tchad, Togo, Ukraine et Vietnam. Deux missions marquantes sont décrites plus en détails.

La première concerne le Kosovo. Cette mission a été organisée par l'intermédiaire d'un des médecins légistes mandatés par l'Organisation des Nations Unies (O.N.U.) pour créer le centre de médecine légale de référence dans le cadre de la recherche des personnes disparues suite aux massacres perpétrés lors de la guerre des Balkans. Dans le cadre de cette coopération internationale, les colis ont été transportés par l'armée suisse jusqu'à Orahovac, petit village dans la montagne situé à 60 km de Pristina. Les colis ont été déballés dans des structures vides et le laboratoire a été équipé totalement (**Figure 3**). La formation des techniciens locaux a été assurée par une bénévole PCD. Nous avons aussi profité de cette mission pour rééquiper l'hôpital de Pristina qui avait été détruit pendant les bombardements (**Figure 4**), ainsi qu'une structure locale à activités sociales.



Figure 3 : Convoyage du matériel.



La seconde concerne la Roumanie où en collaboration étroite, nous avons équipé le centre de lutte contre le cancer de Cluj-Napoca, le laboratoire d'Anatomie pathologique de l'école vétérinaire, une structure privée à activités sociales, l'hôpital de pneumologie des mineurs de Borsha (**Figure 5**) ainsi que le centre de médecine légale de Pietra Neamt. Nous avons pu vérifier l'efficacité des plombiers et électriciens locaux qui ont pu aménager un laboratoire en un temps record (24h).

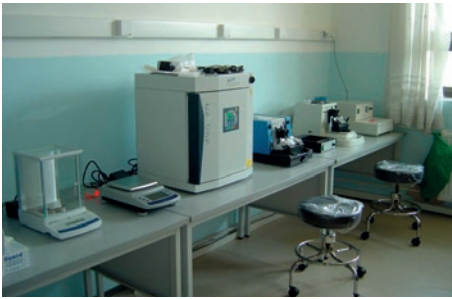


Figure 4 : Ré-équipement de l'hôpital de Pristina.

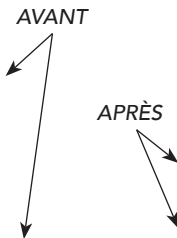


Figure 5 : Hôpital de Borsha avant et après installation du matériel.

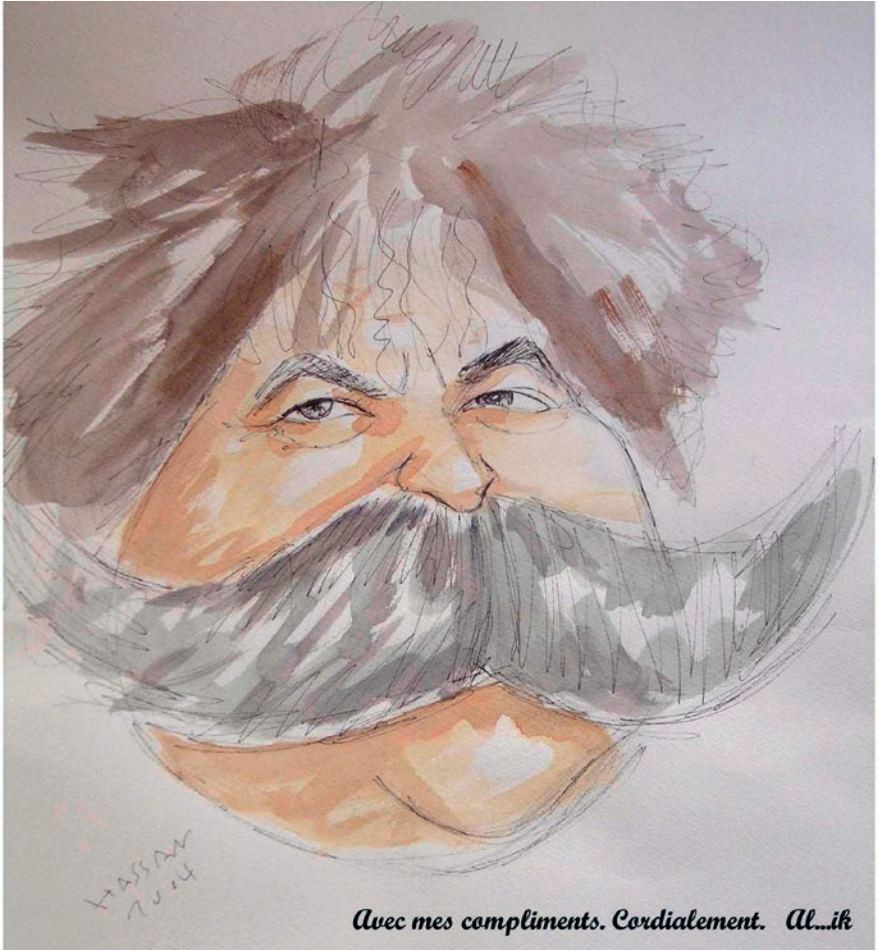
CONCLUSION

Ces expériences humaines sont avant tout extraordinairement enrichissantes par la diversité des personnes rencontrées, l'échange des cultures, le courage et la volonté des personnes pour sortir des situations difficiles dans lesquelles elles travaillent (**Figure 6**).

Si vous vous sentez en accord avec cette philosophie, n'hésitez pas à soutenir l'association par des dons (déductibles à 66 % des revenus imposables), par la collecte des matériels et la confection des colis ou encore à participer à nos missions en tant que formateur avec votre expérience de technicien de laboratoire ou votre bonne volonté.



Figure 6 : Les expériences humaines.



IMMUNOFLUORESCENCE SUR TISSUS INCLUS EN PARAFFINE

Nathalie ACCART

Novartis Pharma, CH-4002 BALE - SUISSE

Anna BENCSIK

*Université de Lyon, ANSES - Unité Maladies Neurodégénératives,
31 Avenue Tony Garnier - 69364 LYON CEDEX 07*

Laurent PENO-MAZZARINO

Laboratoire Bio-EC, 1 chemin de Saulxier - 91160 LONGJUMEAU

RESUME

En 2015, la 2^{ème} journée à thème de l'AFH a réuni six participants venus échanger leurs expériences sur le thème retenu de l'immunofluorescence en coupe paraffine. En effet si le plus souvent la détection d'antigènes par des techniques d'immunofluorescence est pratiquée sur des coupes de tissus congelés, son usage sur des coupes en paraffine est beaucoup plus rare et tient essentiellement au fait de la réputation qu'elle soit limitée par des problèmes d'autofluorescence par exemple. L'application de l'immunofluorescence sur des tissus inclus en paraffine n'en est pourtant pas moins intéressante si ces limites pouvaient être franchies. Aujourd'hui cela est possible avec l'évolution des outils disponibles, moyennant quelques mises au point qui sont rapportées ici et qui résultent du travail d'échanges réalisé par le groupe de participants réuni le 9 octobre 2015 à Paris.

ABSTRACT

Organized in Paris on October 9, 2015, the 2nd AFH thematical workshop brought together six participants who exchanged their experience on the practice of immunofluorescence applied to paraffin embedded tissue sections. Indeed if the detection of antigens by immunofluorescence techniques is generally applied on frozen tissue sections, its use on paraffin-embedded tissue is on the contrary much rarer, because of its reputation of limited applicability due to problems such as autofluorescence. The application of immunofluorescence on tissues included in paraffin is yet no less interesting if these limits could be overcome. Today this is possible with the evolution of the tools available, with a few adaptations too. Here is reported the result of the experience exchanges provided by the group of participants.

INTRODUCTION

L'immunodétection d'antigènes par des techniques basées sur la fluorescence est un outil puissant qui présente certains avantages. L'excellent contraste qui peut être obtenu entre différents fluorochromes de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes, peut être exploité pour des marquages multiples, notamment pour des marquages simultanés de protéines localisées dans le même compartiment subcellulaire. De plus la technique est rapide dans le cas de technique directe par anticorps primaire directement couplé au fluorochrome. Cependant l'immunofluorescence (IF) présente aussi certains inconvénients comme le problème de photoblanchiment pouvant être contrecarré par des incubations en chambre noire et par une analyse rapide des lames. Il est aussi nécessaire de stocker les lames à + 4 °C et de bien choisir son milieu de montage contenant un « anti-fading ». Une autre limitation est la nécessité d'un accès à un microscope à épifluorescence ou confocal pour l'observation des lames. Mais en cas d'application de l'IF sur coupes incluses en paraffine il convient de prendre en compte des problèmes majeurs qui sont 1) l'autofluorescence qui distingue la fluorescence intrinsèque des cellules et tissus, de la fluorescence obtenue par traitement des spécimens avec des marqueurs fluorescents exogènes. L'autofluorescence peut provenir de structures tissulaires (élastine et collagène (1), lipofuscine (2), mélanine,

flavines endogènes, la nicotinamide-adénine dinucléotide réduite et la forme phosphate (3)), ce phénomène pouvant être intrinsèque ou induit par la fixation ou d'autres étapes de la préparation du tissu ; 2) le bruit de fond fluorescent généré par une liaison non-spécifique des différents réactifs fluorescents utilisés lors de l'immunodétection ou les sérums bloquants.

Les tissus et leurs composés autofluorescents

Quelques soient les tissus étudiés (peau, rate, nodule lymphoïde, muscle, cerveau) ou l'espèce d'origine du tissu (souris, rat, lapin, singe, humain), les techniques de préparation pour l'inclusion en paraffine sont quasiment identiques. De même les composés autofluorescents listés ci-dessous sont retrouvés dans de nombreuses espèces (**Figure 1**).

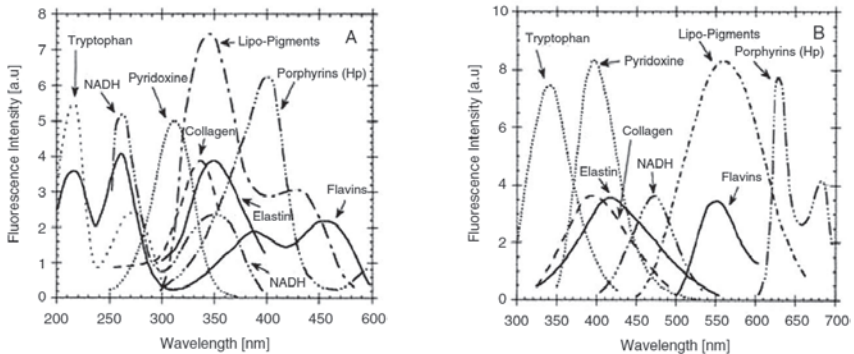


Figure 1 : Spectres d'excitation (A) et d'émission (B) des principaux fluorophores endogènes. Dérivé de Wagnieres et al.

L'élastine contient plusieurs fluorophores, l'un d'eux est un acide aminé tricarboxylique cross-linké avec un anneau de pyridine (4). C'est un fluorophore similaire à ce qui est trouvé dans le collagène. Son excitation entre 350 nm et 480 nm (UV-vert) donne une émission entre 500 et 550 nm (vert-jaune). Typiquement l'élastine est retrouvée autour des vaisseaux sanguins et dans la peau.

La lipofuscine est un lipo-pigment cellulaire composé de débris résiduels lysosomiaux avec une prédominance sur des cellules post-mitotiques. Les neurones, le cœur et la peau contiennent des quantités particulièrement importantes de lipofuscine. Ce pigment est aussi retrouvé dans la coloration de l'iris de certains yeux verts. La lipofuscine présente une fluorescence sous une gamme d'excitation

entre 360 nm et 647 nm. La couleur est orange sous une excitation UV, vert ou jaune sous excitation bleu, ou rouge sous excitation verte. La lipofuscine est moindre dans les animaux plus jeunes et peut être quenchée soit par le sulfate de cuivre soit par le Soudan Noir B (5).

Les mélanines sont des macromolécules biologiques parmi les principaux pigments responsables de la coloration des téguments chez les animaux. On les retrouve chez l'homme dans la peau, les cheveux et poils, l'épithélium pigmentaire de l'iris, la surrénale, la strie vasculaire de l'oreille interne, le cerveau (neuromélanine dans le corps strié et la substance noire). On les retrouve aussi dans les plumes des oiseaux, de nombreux champignons et certains protozoaires. Les mélanocytes sont les principales cellules productrices par addition ou condensation de monomères formés à partir de la tyrosine (eumélanine) ou de la tyrosine et de la cystéine (phéomélanine), avec le concours de l'enzyme tyrosinase.

Les flavines endogènes sont des co-enzymes impliquées dans les réactions d'oxydo-réduction intracellulaires menant à la production d'ATP. Elles sont une source d'autofluorescence quand elles sont dans leur état oxydé. A contrario, c'est dans leur état réduit que la nicotinamide-adénine dinucléotide devient une source d'autofluorescence intracellulaire (6).

La nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD) réduite (NADH) est une coenzyme d'oxydoréduction présente dans toutes les cellules vivantes. La NAD phosphate est aussi une source d'autofluorescence. La NAD⁺ possède un maximum d'absorption en ultraviolet à 260 nm et la forme réduite NADH quant à elle possède deux maxima d'absorption en UV, un premier à 260 nm et un second à 340 nm.

Pour assurer le succès d'une IF sur des tissus inclus en paraffine, plusieurs éléments sont à considérer : en dehors de la nature de l'échantillon, comme par exemple la forte autofluorescence de la peau, le traitement des échantillons a également une grande importance. Notamment la fixation, l'imprégnation en paraffine, le déparaffinage. Les éléments directement en lien avec l'application du protocole d'IF lui-même, telles que les étapes de démasquage, de saturation et blocages des sites non spécifiques ont aussi leur importance. Il n'y a pas une méthodologie spécifique pour l'IF sur coupes en paraffine, mais plusieurs protocoles pour lesquels les points techniques qui fonctionnent sont résumés dans cet article. Ces divers points techniques sont illustrés avec l'exemple de prélèvements de peau, sur

laquelle comme pour de nombreux autres types d'échantillons, l'autofluorescence est problématique (**Figure 2**). Cependant on peut relever que l'autofluorescence des tissus n'a pas que des côtés négatifs puisqu'elle est maintenant exploitée grâce à l'imagerie de spectroscopie, et a permis de développer un véritable outil de diagnostic et de recherche biomédicale (7, 8).

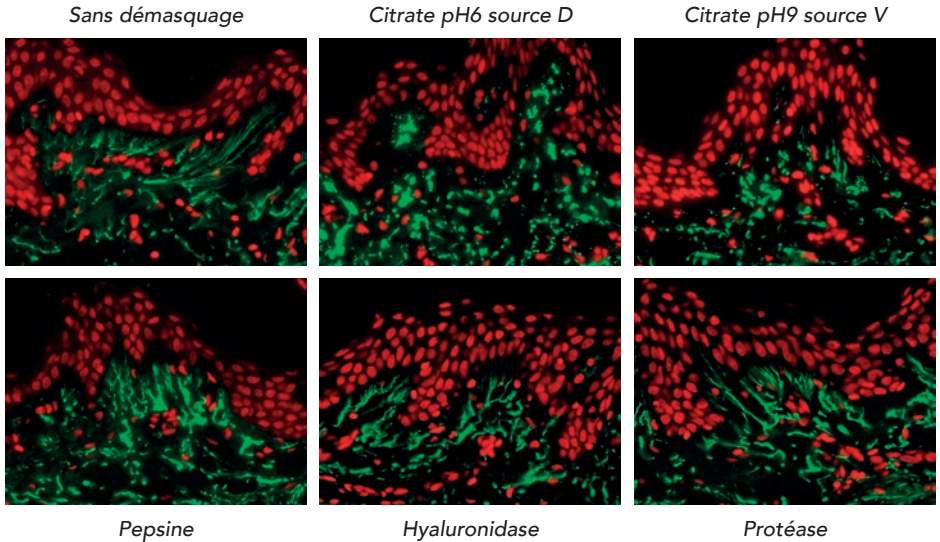


Figure 2 : Influence du démasquage antigénique sur une expérience d'immunomarquage de l'élastine dans la peau. Anticorps primaire dilué au 1/100^{ème} et incubé pendant 1 heure, révélation par un système couplé à l'AlexaFluor® 488.

La fixation des tissus

La fixation peut être faite après perfusion de l'animal entier par injection intracardiaque ou par immersion directe après autopsie. Globalement elle doit être rapidement réalisée après la mort de l'animal. Les fixateurs utilisés usuellement pour une inclusion en paraffine sont soit un tampon à 10 % formaline (incubation maximale de 48 heures à température ambiante sauf pour des tissus particuliers comme le tendon), soit une solution de formol tamponnée préparée selon Carson. Malheureusement la fixation par une solution contenant un aldéhyde entraîne une autofluorescence des tissus accrue par réaction des aldéhydes avec les amines des protéines, formant des bases de Schiff (9). Le glutaraldéhyde accroît l'autofluorescence de manière

plus importante que le formol. L'autofluorescence observée apparaît alors comme un marquage diffus et plus généralisé qu'un marquage spécifique.

Il est possible d'éliminer ou de diminuer l'autofluorescence des aldéhydes en réduisant les bases de Schiff formées. Différents réactifs peuvent être utilisés et éventuellement être combinés pour une meilleure efficacité. Cependant il faut garder en tête que ces réactifs peuvent inhiber ou masquer partiellement l'immunoréaction.

Un autre moyen de réduire la fluorescence induite par les aldéhydes est d'éviter leur utilisation (10). Ce protocole alternatif décrit une fixation avec 50 mM diméthyl suberimidate (DMS) dans un tampon contenant 100 mM de tampon sodium borate (pH 9,5) et 1 mM $MgCl_2$ pour 1 heure. Après lavage les tissus sont incubés dans du PBS pH 7,4 additionné de 2 % de paraformaldéhyde (PFA) pendant 15 à 30 minutes. La réaction est arrêtée par la glycine à 0,1 M en PBS pH 7,4 pour 1 heure à température ambiante.

Une autre alternative consiste à utiliser d'autres fixateurs de pourcentage de formaldéhyde inférieur comme le Periodate Lysine Paraformaldéhyde (PLP) dont le pourcentage est égal à 0,25 % ou encore un tampon de formaldéhyde à 2 % et 0,2 % d'acide picrique. Le tissu fixé est clarifié par une série d'alcools jusqu'au DMSO ou xylène. Ou encore des fixateurs ne contenant pas d'aldéhydes comme le Carnoy, le Methacarn, ou le fixateur Tris Zinc. Une fixation à l'acide picrique est aussi possible pour la diminution de l'autofluorescence de la lipofuscine.

Les conditions de fixation comme le temps et la température sont liées. Le temps de fixation sera réduit à température ambiante et plus long à + 4°C. La durée de la fixation est aussi liée à la taille des échantillons. La théorie de Medawar donne une profondeur de pénétration de 1 mm par heure de fixation pour une solution à 4 % de formaldéhyde mais cela varie en fonction du fixateur. Cela signifie qu'il faudra approximativement 25 heures pour pénétrer au centre d'un échantillon d'une épaisseur de 10 mm. Il est possible d'améliorer le processus de fixation par fixation sous vide ou par chauffage aux micro-ondes.

Les réactifs permettant de réduire ou d'éliminer l'autofluorescence liée aux aldéhydes

Parmi ces réactifs on trouve l'éthanol 70 % ammoniacé (0,25 % NH_3), le borohydrure de sodium à 0,1 % ou 10 mg/mL et le Soudan Black B à 0,1 % en éthanol 70 % qui

ont été testés sur des coupes de tissus fixés en formaldéhyde ou glutaraldéhyde et inclus en paraffine (2).

L'éthanol ammoniacal est considéré comme réduisant l'autofluorescence par extraction des molécules fluorescentes et par inactivation des fluorochromes sensibles au pH. Une étape dans l'éthanol à 70 % contenant 0,25 % d'ammoniacal est intercalée lors de la réhydratation des coupes en paraffine dans des concentrations d'éthanol décroissantes. Puis la réhydratation se poursuit par de l'éthanol à 50 % et se termine dans le tampon utilisé pour la réaction d'immunofluorescence.

Le borohydrure de sodium est connu pour son efficacité liée à sa capacité à réduire les bases de Schiff formées et à l'origine d'émissions de fluorescence, par dégagement d'hydrogène. Les sections déparaffinées sont immergées avant l'immunomarquage dans de l'eau distillée (ou du tampon) contenant 10 mg/mL de NaBH_4 pendant 40 min à 0 °C. La solution doit être préparée extemporanément. Il est à noter que le borohydrure de sodium est explosif et présente une réaction exothermique au contact des tampons phosphate (PBS) ou tris (TBS), entraînant la production de gaz extrêmement inflammable. Il est donc nécessaire de travailler sous hotte, le flacon doit être fermé et les conditions de protection doivent être extrêmement bien respectées.

Le Noir Soudan B agit en masquant les composants tissulaires autofluorescents comme la lipofuscine dont le spectre de fluorescence est similaire à celui de la fluorescéine. Cependant cette technique ne réduit pas le signal émis par le FITC et l'AlexaFluor® 594 de manière notable (11). La technique présentée est dérivée de Schnell et al. 1999 ou Baschong et al. 2001. Après l'immunomarquage, les coupes sont immergées pendant 10 à 30 minutes dans une solution à 0,1 – 1 % de Noir Soudan B dans 70 % d'éthanol (ou de méthanol) préparée 2 heures avant utilisation. Après différenciation à l'éthanol 70 % (ou méthanol), les coupes sont réhydratées jusqu'au tampon de montage des coupes.

Il existe des méthodes plus spécifiques pour inhiber l'autofluorescence de certaines molécules. Nous citerons en exemple :

Le sulfate ou chlorure de cuivre, le réactif principal d'une technique proposée par Schnell et al. 1999 pour réduire l'autofluorescence des lipofuscines, se fait après le marquage immunohistologique. Le CuSO_4 (ou CuCl_2) est utilisé à la concentration de 1 à 10 mM en tampon acétate d'ammonium (50 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 5,0) pendant 10 à 90 minutes.

Le borohydrure de sodium est utilisé pour la réduction de l'autofluorescence induite par le glutaraldéhyde. Pour cela, une solution fraîchement préparée de NaBH_4 à 0,1% dans le tampon d'immunomarquage (PBS, TBS, etc.) est appliquée pendant 10 à 30 minutes à température ambiante ou à froid.

Le tétroxyde d'osmium peut être inclus dans une post-fixation. L'observation de coupes de blocs de tissus fixés au glutaraldéhyde et à l'osmium, montre une forte autofluorescence au centre du tissu et pas d'autofluorescence sur les bords. Cela s'explique par la différence de vitesse de diffusion plus faible du tétroxyde d'osmium par rapport à celle du glutaraldéhyde. Une post-fixation des tissus au tétroxyde d'osmium est donc un moyen très efficace pour réduire l'autofluorescence due au glutaraldéhyde.

Il n'y a malheureusement pas de recette générale pour le contrôle de l'autofluorescence et chacun doit appliquer ces réactifs sur ses propres préparations.

D'autres réactifs ont été décrits précédemment, comme l'Eriochrome Noir T (12), la Pontamine Sky Blue (13) appelée aussi 6,6'-((3,3'-diméthoxy(1,1'-biphényl)-4,4'-diyl)bis(azo))bis(acide 4-amino-5-hydroxy-1,3- Naphthalenedisulfonique), sel tétrasodique) utilisée pour la réduction de l'autofluorescence engendrée par l'élastine et le collagène. Leur spectre d'émission est similaire à la fluorescéine et l'incubation dans une solution à 0,5 % de Pontamine Sky Blue 5BX (C.I. 24400) dans PBS ou TBS pendant 10 minutes. Ce réactif entraîne un décalage de l'autofluorescence de l'élastine dans le vert vers une émission rouge. Une autre suggestion pour la réduction de l'autofluorescence des vaisseaux est basée sur l'utilisation du Bleu de Toluidine à 0,1 % pour 1 à 5 minutes mais cette technique n'est pas efficace sur tous les vaisseaux.

Enfin le Bleu Trypan à 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH 4,4 ((13), (14), (5)) et le Bleu Evans ont été utilisés pour l'immunofluorescence directe et l'étude des auto-anticorps. Chacun a été utilisé sur tissus et cellules à 0,001 % jusqu'à 0,1 % dans l'eau ou dans un tampon pendant 1 minute. Ils sont solubles en milieu de montage aqueux et diffusent rapidement. Cela réduit le bruit de fond de manière significative aussi bien que la fluorescence due au conjugué. Les colorants fluorescent en rouge, évitant le marquage non-spécifique du conjugué par transfert d'énergie mais a peu d'effet sur le marquage spécifique. Cependant cette technique n'est pas envisageable pour les expériences de marquages multiples (14).

Les traitements des tissus et l'inclusion en paraffine

Les tissus sont généralement déshydratés dans des bains d'alcool successifs de pourcentage croissant jusqu'à atteindre 100 %. Puis la déshydratation est poursuivie par des bains dans des solvants de la paraffine comme le Toluène ou le Xylène, ou des alternatifs comme l'OTIX Plus et l'OTIX Shaper. Ces étapes sont ensuite suivies par des étapes d'imprégnation à la paraffine. Il est possible de baisser ces temps d'imprégnation en utilisant une méthode sous-vide. L'inclusion se fait ensuite en paraffine qui peut être de différentes qualités avec des températures de fusion de 55 °C à 58 °C. Il est aussi possible de traiter des cellules en culot en utilisant des cassettes à biopsie à pores nanoscopiques.

Le stockage des blocs à court terme peut se faire à température ambiante ou à + 4 °C pour un stockage à plus long terme. Un point important concerne le stockage des blocs à long terme après coupe : il est conseillé de recouvrir le tissu coupé par une fine couche de paraffine pour le préserver de l'oxydation des tissus par l'air ambiant.

On retiendra que pour une application en IF, le déparaffinage qu'il soit classique par solvants ou combiné avec le démasquage, comme ce qui est réalisé avec certains automates de marquage, fonctionnent bien.

Démasquage antigénique

Pour illustrer l'influence des paramètres propres au démasquage, la **figure 2** montre l'exemple de la détection de l'élastine par un anticorps dilué au 1/100 et incubé pendant une heure puis révélé par un système couplé à l'AlexaFluor®488 sur des

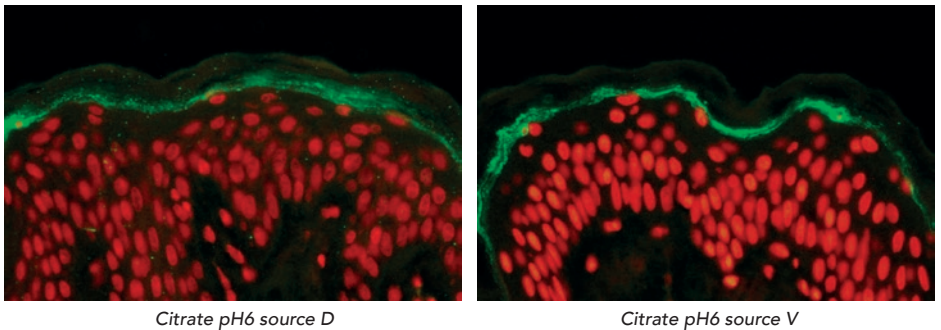


Figure 3 : Influence de la source du tampon de démasquage antigénique sur une expérience d'immunomarquage de IDE dans la peau. Anticorps primaire dilué au 1/25^{ème} et incubé pendant 1 nuit, révélation par un système couplé à l'AlexaFluor® 488.

échantillons de peau. Elle compare l'effet sur la réussite de l'immunomarquage d'un démasquage enzymatique (pepsine, hyaluronidase, protéase) au démasquage chimique dans des conditions de pH acide ou basique (pH6 versus pH9). La nature des solutions de démasquage peut influencer le résultat final. La **figure 3** démontre qu'une solution tampon du fournisseur D donne de moins bons résultats qu'avec la même solution du fournisseur V. Pour d'autres immunomarquages, cela peut être l'inverse. Il faut donc ne pas hésiter à essayer plusieurs solutions identiques de fournisseurs différents.

Blocage des sites de fixation non spécifiques

Pour une application en IF, les principes classiques en termes de réactifs, temps et conditions d'application peuvent être appliqués. On peut relever l'utilisation de sérum bloquant, de l'albumine, de caséine, du Blocking reagent (source R) dilué au 1/10 dans un tampon d'acide maléique pour une bonne saturation dans le cas d'anticorps de souris sur tissu murin. Il est possible d'ajouter de la gélatine de poisson pendant tout le protocole, ou du lait en poudre (là encore, il faut faire attention à la marque).

Réduction des réactions non spécifiques par réduction des activités enzymatiques endogènes

De même pour une application réussie en IF, lorsque l'on utilise des traceurs enzymatiques il est indispensable de s'assurer que ce que l'on observe n'est pas dû à la présence d'enzymes endogènes, par le recours à des contrôles de spécificité appropriés. Si ces réactions sont gênantes pour l'observation des marquages spécifiques, on peut tenter de les inhiber en utilisant l'une ou l'autre des techniques suivantes :

Le blocage des peroxydases endogènes est souvent pratiqué pour améliorer l'aspect des images. En fait il n'est vraiment indispensable que si les marquages dûs aux activités peroxydasiques endogènes peuvent être confondus par leur forme et leur intensité avec les marquages spécifiques, ou s'ils se superposent aux marquages spécifiques. On met en effet très facilement en évidence ces réactions parasites en comparant une coupe immunomarkuée avec une coupe contrôle traitée uniquement avec la solution de révélation de la peroxydase.

De nombreuses recettes de blocage ont été proposées. Les plus courantes

consistent à traiter les coupes pendant 10 min à 1 heure avec l'un des inhibiteurs suivants :

L'eau oxygénée peut être utilisée en excès, par exemple à 0,3 % dans le tampon de réaction (15). Il existe une variante de ce traitement, par la dilution de l'eau oxygénée dans du Méthanol absolu. Dans ce cas, le traitement est réalisé au cours de la réhydratation des coupes, incluse après les étapes de déparaffinage et le premier bain d'Ethanol absolu. On poursuit ensuite par un deuxième bain d'Ethanol absolu puis par la réhydratation graduelle des coupes.

Le Méthanol/Nitroferrocyanure (16) est préparé par un ajout de Nitroferrocyanure de sodium dans du méthanol absolu.

La Phénylhydrazine peut être utilisée à 0,5 % dans le tampon de réaction (17).

La méthode de Li (18) permet d'inactiver les activités peroxydasiques par un bain de 10 à 30 minutes d'eau oxygénée à 0,3 % et d'azide de sodium à 0,1 %. A noter que dans cette technique seule l'eau oxygénée est probablement efficace car l'action de l'azide de sodium est en effet réversible.

La méthode de Heyderman et Neville (19) est considérée comme le procédé le plus puissant pour inactiver les activités peroxydasiques endogènes. Il s'agit de rincer les coupes à l'eau après déparaffinage et hydratation puis d'inactiver les activités peroxydasiques endogènes avec 2,28 % d'acide périodique dans l'eau distillée pendant 5 minutes, suivi d'un lavage à l'eau.

Le blocage des aldéhydes formés par l'acide périodique est possible avec 0,02% de borohydrure de potassium dans l'eau distillée pendant 2 minutes, induisant la transformation des groupements aldéhydes en alcools.

Le blocage des phosphatases endogènes peut être réalisé par l'action du levamisole (240,76 daltons) ajouté à des concentrations allant de 0,1 à 10 mM dans le milieu de révélation de la phosphatase alcaline. Le levamisole bloque les phosphatases endogènes mais n'a pas d'effet inhibiteur sur la phosphatase alcaline utilisée comme traceur.

Choix de l'anticorps primaire

Primordial, le choix de l'anticorps (Ac) primaire est facilité par l'accès à des sites de recherche d'anticorps comme Labome, BioCompare, Human Protein Atlas ou directement chez les fournisseurs. Le groupe a recensé les Ac primaires qui fonctionnent

dans leurs entités et la liste est donnée à titre indicatif (**Tableau 1**). On recense tous les types de marquage possible, -nucléaire, -cytoplasmique, -membranaire, -extracellulaire, de toute nature (espèce animale, -polyclonal, -monoclonal).

Les utilisateurs font non seulement appel à des anticorps primaires directement couplés au fluorochrome mais aussi à l'utilisation de systèmes de révélation ou d'amplification variés (**Tableau 1**). De même, plusieurs types de tampon de dilution sont possibles, les utilisateurs ayant une expérience positive avec des tampons de compositions variables, avec colorant vert intégré ou non, que le tampon soit fait maison ou commercial.

Choix de l'anticorps secondaire et système de révélation

En tout premier lieu il convient de bien choisir le type de fluorochrome, on peut distinguer les fluorochromes de 1^{ère} génération : FITC, PE... ; les fluorochromes de 2^{ème} génération : alexa, cy, dye...et plus récemment le quantum dot (QD). Sans être exhaustif voici les fluorochromes évoqués par le groupe : AlexaFluor®350, 488, 546, 594, 647, FITC, R-PE, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5 et Quantum dots.

La **figure 4** illustre un immunomarquage obtenu à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un AlexaFluor® et la **figure 5** illustre un immunomarquage révélé par un anticorps secondaire biotinylé suivi d'une streptavidine couplée au FITC.

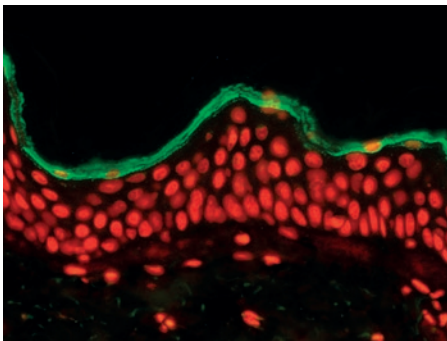


Figure 4 : Immunomarquage de flaggrin 2 dans le stratum corneum. Démasquage antigénique au tampon citrate pH6 de source V, anticorps primaire dilué au 1/800^{ème} et incubé pendant 1 heure, couplé directement à l'AlexaFluor® 488.

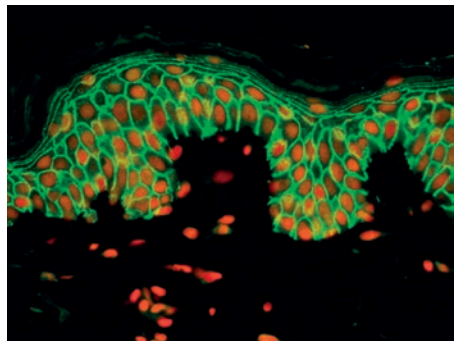


Figure 5 : Immunomarquage de desmogleine dans l'épiderme. Démasquage antigénique au tampon citrate pH de source D, anticorps primaire dilué au 1/800^{ème} et incubé pendant 1 heure, révélation par un anticorps secondaire biotinylé suivi d'une streptavidine-FITC.

Cible	Marquage (nucléaire, cytoplasmique, membranaire...)	Monoclonal- ou Polyclonal (clone)	Espèce	Dilution	Incubation
Béta-actine	Cytoplasmique	Polyclonal	Lapin	1/50	1 h
Béta-endorphines	Cytoplasmique	Monoclonal	Souris	1/25	1 nuit
				1/300	2 h (Autostainer)
Desmogléine	Membranaire	Polyclonal	Lapin	1/800	1 nuit
				1/800	2 h (Autostainer)
Fibronectine	Matrice extracellulaire	Monoclonal	Souris	1/600	1 nuit
				1/200	2 h (Autostainer)
Filaggrine	Membranaire	Monoclonal	Souris	1/100	1 h
				1/3200	1 h (Autostainer)
Filaggrine 2	Membranaire	Monoclonal	Souris	1/800	1 h (Autostainer)
IDE	Cytoplasmique	Polyclonal	Souris	1/25	1 nuit
LEKTI	Membranaire	Polyclonal	Lapin	1/200	1 nuit
		Monoclonal	Souris	1/200	1 nuit
Mucin 4	Membranaire	Polyclonal	Souris	1/50	1 nuit
Pro-collagène 1	Matrice extracellulaire	Monoclonal	Rat	1/50	1 nuit
Vinculine	Membranaire ± Cytoplasmique	Monoclonal	Souris	1/100	1 h
				1/400	1 h (Autostainer)
GFAP	Cytosquelette	Polyclonal	Lapin	1/200	
Oligodendrocytes	Cytoplasmique	Polyclonal	Lapin	1/1000	
α-Synucléine	Cytoplasmique	Monoclonal (clone 42)	Souris		
α-Synucléine (phospho Sérine129)	Cytoplasmique	Monoclonal	Lapin	1/300	
Iba-1	Cytoplasmique	Polyclonal	Lapin	1/500	
NeuN	Nucléaire	Polyclonal	Lapin	1/500	
F4/80	Membranaire et cytoplasmique	Monoclonal (clone A3)	rat	1/100	
GFP	selon promoteur	Polyclonal	Lapin		
CD4 humain	Membranaire	Monoclonal (clone 4B12)	Souris	0,1 µg/ml	1 h
CD3 humain	Membranaire	Monoclonal (clone F7.2.38)	Souris	0,1 µg/ml	1 h
CD163 humain	Membranaire	Monoclonal (clone EDHu-1)	Souris	0,1 µg/ml	1 h
HLA-E humain	Membranaire	Monoclonal (clone MEM-E/02)	Souris	0,05 µg/ml	1 h

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés en routine dans les laboratoires d'accueil des participants et dont certains ont servi à illustrer cet article.

Dans tous les cas les paramètres techniques à considérer sont à nouveau le tampon de dilution, la durée et la température d'incubation.

Les systèmes d'amplification tels que les systèmes polymères (Envision), HRP + Tyramide (TSA) ou Biotine (ABC) sont compatibles avec la mise en œuvre de l'IF sur coupes de tissus inclus en paraffine.

Le groupe relève la possibilité d'utiliser un Anticorps anti-HRP-DyLight (source J. I.), qui nécessite une étape préalable de blocage des HRP à l' H_2O_2 .

De même la technique Opale (P. E.) peut être utilisée mais il faut faire attention pour les marquages multiples avec une saturation intermédiaire par traitement aux micro-ondes (possible jusqu'à 5 fois). La **figure 6** illustre un exemple de co-marquage appliqué à de la rate humaine, et utilisant ce système. L'UltraMap de source V. est un anti-goat polymer qui est très puissant et est très concentré. Dans ce cas il faut faire attention à la durée d'application qui doit être très courte (12-16 min) et attention à l'utilisation de détergent dans le tampon de lavage.

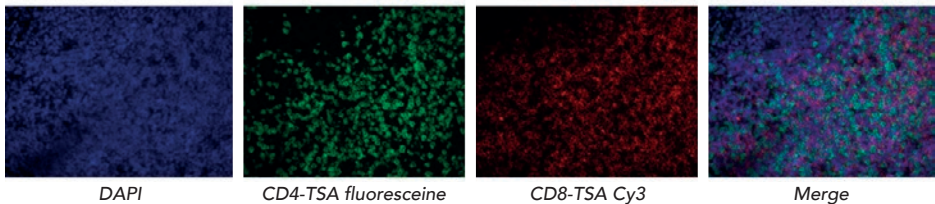


Figure 6 : Co-marquage de CD4 et CD8 sur de la rate humaine avec deux anticorps de la même espèce (mIgG1), révélation avec le système OPAL et contre-coloration au DAPI.

Pour la contre coloration, on peut utiliser des marqueurs comme le DAPI qui se lie de façon sélective à l'ADN double brin. Le Hoeschst qui se lie de façon spécifique sur des régions riches en bases A/T de l'ADN double brin. L'iodure de propidium qui s'intercale entre les bases sans préférence de liaison, est un très bon colorant nucléaire pour les fluorochromes verts ou UV. D'une façon générale, il faut faire une étape spécifique pour la contre coloration et éviter le mélange dans le milieu de montage. On peut noter un retour d'expérience dans l'utilisation de la coumarine plus puissant que le DAPI dans les longueurs d'onde UV.

Par ailleurs la **figure 7** montre un bel exemple de double marquage utilisant de la TSA (amplification du signal avec la tyramide). Cette technologie TSA permet d'utiliser un marquage HRP et de le convertir en marquage fluorescent.

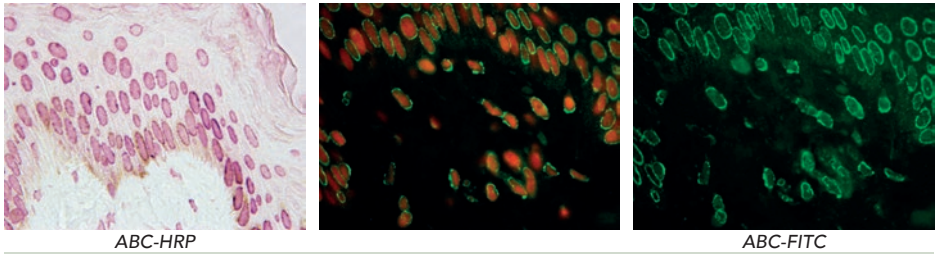


Figure 7 : Immunomarkage de la vinculine dans la peau. Démasquage au tampon citrate pH6 (source V), anticorps primaire au 1/50^{ème} pendant 1 nuit, révélation par le système ABC-HRP ou ABC-FITC.

Milieux de montage et conservation des lames

Le groupe de travail a recensé plusieurs milieux de montages qui sont utilisés avec succès, qu'ils soient commercial ou maison.

ProLong Gold	Commercial, cher
Vectashield (hardset)	Commercial
Fluoromount (hardset)	Commercial
Fluoromount G	Contient le DAPI
Aquamount	Contient le DAPI mais nécessite un luttage au vernis à ongles
Mowiol®	A préparer soi-même, bon marché Excellente conservation

En ce qui concerne la conservation des lames, il y a plusieurs usages : à + 4 °C ou à -20 °C en fonction du milieu de montage.

Spécificité-sensibilité

L'immunofluorescence en paraffine est tout aussi spécifique qu'un marquage réalisé en peroxydase. La **figure 7** montre un bel exemple du marquage de la vinculine. Celui-ci apparaît identique dans la peau qu'il soit révélé en peroxydase ou en fluorescence.

Par contre il peut y avoir des problèmes de sensibilité entre une expérience d'immunofluorescence sur coupe congelée ou en paraffine, comme l'illustre la **figure 8** avec des marquages de bêta-actine dans la peau.

Il est ainsi primordial d'adapter la durée d'incubation de l'anticorps primaire pour obtenir le même résultat, avec le même anticorps comme l'illustre la **figure 9**. On retrouve le même niveau de détection en passant d'1 heure d'incubation à 1 nuit.

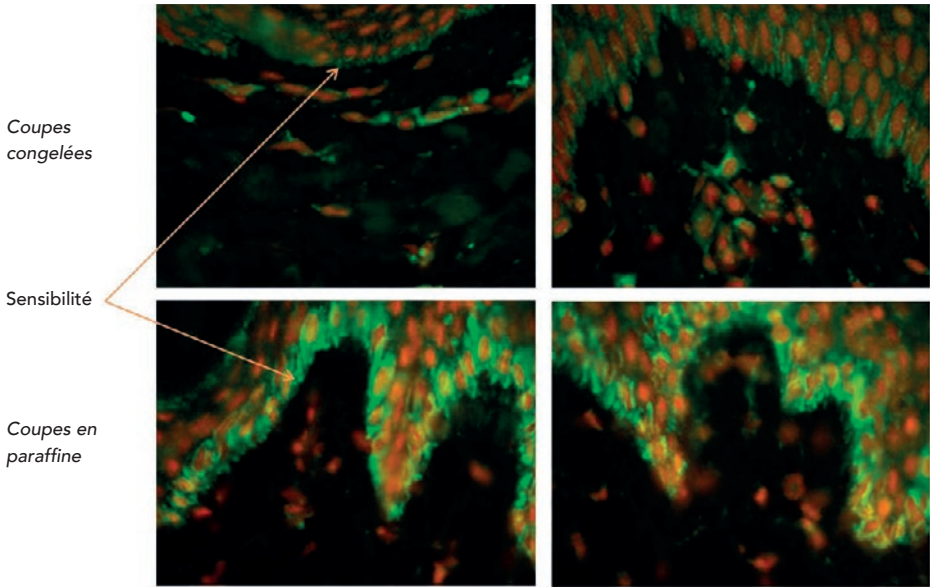
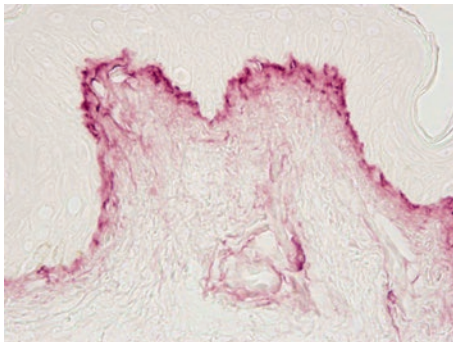
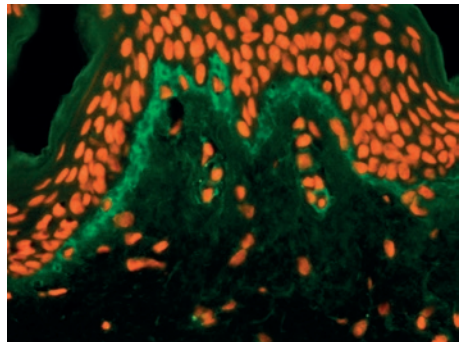


Figure 8 : Immunomarquage de la bêta-actine dans la peau sur coupes congelées et coupes en paraffine, anticorps primaire au 1/25^{ème} pendant 1 heure ou 1 nuit, révélation ABC-FITC.



Incubation 1 nuit - révélation ABC-HRP



Incubation 1 heure - révélation ABC-FITC

Figure 9 : Influence de la durée d'incubation. Immunomarquage du pro-collagène I, démasquage protéase, anticorps primaire au 1/200^{ème} pendant 1 heure ou 1 nuit, révélation ABC-HRP (VIP) ou ABC-FITC.

CONCLUSION

Cet article repose sur le partage des connaissances des six participants (Arnaud Dujardin, Innate Pharma, Marseille, Anna Bencsik, ANSES – Unité Maladies Neurodégénératives, Lyon, Laurent Peno-Mazzarino, Laboratoire Bio-EC, Longjumeau, Alhassan Casse, Sanofi, Paris, Catherine Rochereau, Citoxlab, Evreux, Nathalie Accart, Novartis, Bâle). Ainsi nous avons pu dégager quelques points importants qui feront le succès de votre IF sur coupes paraffine. Les principaux points à retenir pour réussir une IF sur coupes incluses en paraffine sont :

- la fixation à froid ne doit pas être trop longue (48 heures),
- les coupes doivent être plutôt fines (4-5 micromètres d'épaisseur)
- le déparaffinage classique par bain de solvants donne de meilleurs résultats qu'en automate (éviter le bain unique déparaffinage/démasquage)
- des temps de 6 min/bain donnent de meilleurs résultats que 3 min/bain
- le démasquage contribue à diminuer l'autofluorescence (enzymatique, protéasique, traitement chimique, et/ou à la chaleur)
- le tampon citrate pH6 préparation maison est parfois plus efficace que le tampon pH6 de source D ou de source V.
- l'utilisation de tensioactifs (Tween 20...) permet de perméabiliser les membranes et d'augmenter le facteur de dilution de l'anticorps primaire
- il est profitable de travailler sur des fenêtres de fluorescence hors réémission dans le vert
- il est important de bien faire une dose réponse pour trouver la meilleure concentration de l'anticorps primaire
- enfin, pour les co-marquages, il faut tester l'ordre des marquages comme l'indique un retour d'expérience pour l'exemple du triple marquage CD4-CD8-CD3 qui présente un problème si le CD3 est le dernier à être détecté.

Le travail collecté au cours de cette journée à thème a démontré que l'application de l'IF sur des tissus inclus en paraffine est non seulement possible mais très intéressante car elle offre plusieurs avantages. Elle produit des images

d'immunomarquage de qualité supérieure par rapport à l'application de l'IF sur du tissu congelé avec une très bonne spécificité et une bonne sensibilité. Grâce à cette préservation des tissus, elle représente également un avantage sérieux pour les marquages multiples. Les auteurs de cette restitution écrite espèrent que ce compte rendu saura être profitable aux lecteurs de la Revue en stimulant l'envie de pratiquer l'IF sur des tissus inclus en paraffine.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'AFH pour avoir proposé cette journée à thème et tout particulièrement Sophie Luccantoni pour l'organisation de cette journée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BILLINTON, N. and KNIGHT A.W. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem.*, 2001, **291**(2), 175-97.
2. BASCHONG W., SUETTERLIN R., and LAENG R.H. Control of autofluorescence of archival formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue in confocal laser scanning microscopy (CLSM). *J. Histochem. Cytochem.*, 2001, **49**(12), 1565-72.
3. ANDERSSON H. et al. Autofluorescence of living cells. *J. Microsc.*, 1998, **191**(Pt 1), 1-7.
4. DEYL Z., et al. Studies on the chemical nature of elastin fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, **625**(2), 248-54.
5. SCHNELL S.A., STAINES W.A., and WESSENDORF M.W., Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, **47**(6), 719-30.
6. CROCE A.C. and BOTTIROLI G. New light in flavin autofluorescence. *Eur. J. Histochem.*, 2015, **59**(4), 2576.
7. CROCE A.C. and BOTTIROLI G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *Eur. J. Histochem.*, 2014, **58**(4), 2461.
8. MONICI M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 2005, **11**, 227-56.

9. BEISKER W., DOLBEARE F., and GRAY J.W. An improved immunocytochemical procedure for high-sensitivity detection of incorporated bromodeoxyuridine. *Cytometry*, 1987, **8**(2), 235-9.
10. TOKUMASU F. and DVORAK J. Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J. Microsc.*, 2003, **211**(Pt 3), 256-61.
11. ROMIJN H.J. et al. Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, **47**(2), 229-36.
12. DAVIS A.S. et al. Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 2014, **62**(6), 405-423.
13. Cowen T., HAVEN A.J. and BURNSTOCK G. Pontamine sky blue: a counterstain for background autofluorescence in fluorescence and immunofluorescence histochemistry. *Histochemistry*, 1985, **82**(3), 205-8.
14. MOSIMAN V.L. et al. Reducing cellular autofluorescence in flow cytometry: an in situ method. *Cytometry*, 1997, **30**(3), 151-6.
15. BURNS J. Background staining and sensitivity of the unlabelled antibody-enzyme (PAP) method. Comparison with the peroxidase labelled antibody sandwich method using formalin fixed paraffin embedded material. *Histochemistry*, 1975, **43**(3), 291-4.
16. STRAUS W. Inhibition of peroxidase by methanol and by methanol-nitroferricyanide for use in immunoperoxidase procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1971, **19**(11), 682-8.
17. STRAUS W. Phenylhydrazine as inhibitor of horseradish peroxidase for use in immunoperoxidase procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1972, **20**(11), 949-51.
18. LI C.Y., ZIESMER S.C. and LAZCANO-VILLAREAL O. Use of azide and hydrogen peroxide as an inhibitor for endogenous peroxidase in the immunoperoxidase method. *J. Histochem. Cytochem.*, 1987, **35**(12), 1457-60.
19. HEYDERMAN E. and NEVILLE A.M. A shorter immunoperoxidase technique for the demonstration of carcinoembryonic antigen and other cell products. *J. Clin. Pathol.*, 1977, **30**(2), 138-40.

- NOTES -

- NOTES -

- NOTES -

SOMMAIRE

EDITORIAL :

L'Association Française d'Histotechnologie fête ses 30 ans

Marc ANDREU, Nathalie ACCART page 11

ARTICLES :

L'Institut Médico-Légal de Paris

Bertrand LUDES, Isabelle PLU page 15

La gestion de la scène d'infraction

Major Richard JUNCA page 23

Apport des techniques histologiques en anthropologie médico-légale

Catherine CANNET page 27

L'apport des études en histologie dentaire à la compréhension de l'évolution de l'homme

Fernando RAMIREZ ROZZI page 43

Cellules souches somatiques et hématopoïèse chez le mollusque

Patricia CAVELIER, Julien CAU, Jean Marc STRUB, Mohamed JEMAA,
Nathalie MORIN, Claude DELSERT page 59

La place des diatomées dans le diagnostic de la noyade

Bertrand LUDES page 75

Caractérisation de l'altération osseuse post-mortem par histomorphologie dans un contexte médico-légal : étude taphonomique sur restes humains

Yann DELANNOY, Catherine CANNET, Claire LOURIA, Guillaume PENEL,
Thomas COLARD, Bertrand LUDES page 81

Le technicien anapath dans l'humanitaire

Alhierd ABRAMTCHIK (Alik) page 97

Immunofluorescence sur tissus inclus en paraffine

Nathalie ACCART, Anna BENCSIK, Laurent PENO-MAZZARINO page 105

ILLUSTRATION DE LA PREMIERE PAGE

Coupe de peau de souris marquée par un anticorps permettant la détection de desmogléine.
Source Laurent PENO-MAZZARINO – Laboratoire Bio-EC- Longjumeau.