

Instituto de Fisiología
Facultad de Medicina - Barcelona
(Prof. J. Jiménez-Vargas)

Coloration des coupes histologiques au moyen des sels de diazonium

J. Monche

(Recibido para publicar el 16 de septiembre de 1955)

Dans une publication préalable (4), nous avons donné une nouvelle technique de coloration des coupes histologiques au moyen du chlorure d'*alpha*-anthraquinonediazonium, comme une première phase des études que nous réalisons sur l'emploi des sels de diazonium en histologie.

Nos diazoréactions tissulaires permettent de différencier des structures fines de la maille protéique des coupes histologiques, comme suite de la formation d'une couche de colorant azoïque-protéique sur la surface de la coupe et dans lequel les protéines tissulaires se trouvent intégrées. Les colorations obtenues sont donc très stables et d'intensité variable selon la distribution des groupements aminés, protéiniques ou protidiques, existant dans les cellules (5).

Préalablement à nos travaux quelques auteurs (3), avaient déjà employé les sels diazonium en histologie pour la localisation et l'étude de la distribution des estérases. Ils soumettent les préparations histologiques à l'action des arylphosphates, ou des arylacétates, en présence d'un sel de diazonium.

Ils constatent que ces préparations histologiques se colorent. Ils attribuent cette coloration à la fixation du colorant mono oxyazoïque formé par réaction du sel de diazonium sur les substrats préalablement hydrolysés par les estérases. La coloration traduirait ainsi la richesse enzymatique du tissu.

Nous avons démontré (6) que le mécanisme était différent. Ce qui se passe en réalité c'est une copulation des sels de dia-

zonium *directement* avec les groupes amino-fonctionnels terminaux libres des aminoacides constituant les liaisons peptidiques des protéines. La copulation peut également avoir lieu avec les aminoacides eux-mêmes et leurs dérivés de grandeur moléculaire inférieure à celle des protéines, ces derniers pouvant être présents dans les préparations histologiques étudiées. Ces processus sont d'ailleurs favorisés par les conditions du pH du milieu employé par ces auteurs. Ainsi l'intensité de la coloration des préparations histologiques dépend, non de leur richesse en phosphomonoestérases, mais du nombre de groupes fonctionnels amino terminaux libres présents dans ces préparations.

Nos diazoréactions tissulaires constituent pourtant une nouvelle méthode de recherche histochimique. Elle permet de révéler des structures fines du protoplasme, en donnant des colorations particulièrement stables, et peut être appliquée au moyen de techniques histologiques très simples, dépendantes des propriétés des sels de diazonium employés.

Matériel et techniques

Pour obtenir les préparations histologiques, nous fixons les tissus au moyen de l'alcool de 90°, d'après la technique classique, pendant quarante-huit heures. Ensuite nous effectuons des coupes après congélation et soumettons celles-ci à l'action du sel de diazonium choisi. Enfin les préparations histologiques correspondantes sont montées de la façon habituelle. D'autres détails figurent dans l'une de nos publications (4).

Comme fixateur, l'acétone donne aussi de bons résultats. Par contre, la fixation au formol inhibe nettement la formation du colorant azoïque-protéique, surtout lorsqu'il s'agit de solutions de formol récemment préparées. On observe comme suite une grande diminution de la vitesse de formation du colorant, ce qui oblige à une durée beaucoup plus longue du processus de coloration des coupes.

Les méthodes d'inclusion sont à rejeter ; spécialement les traitements par la paraffine, car ils empêchent la formation ultérieure du colorant.

Nous avons utilisé dans le présent travail, le chlorure d'*alpha*-anthraquinonediazonium, préalablement isolé grâce à sa stabilité, d'après la technique décrite par Seligman et Manheimer (9). Il se conserve très bien dans la glacière, à l'état solide, pendant plusieurs mois. Une altération du produit n'est

pas observée comme suite. Nous le gardons dans des flacons bien fermés.

Mode opératoire

Nous introduisons les coupes histologiques dans des boîtes de Pétri et nous ajoutons ensuite dans chacune 25 cm.³ d'une solution au 1/1000 du chlorure d'*alpha*-anthraquinonediazonium dans un mélange tampon acide acétique-acétate de sodium à pH = 7 (le pH peut être compris entre 6,5 et 7), préparé au moyen de solutions N/10 d'acide acétique et de soude caustique (25 mgr. de sel de diazonium dans 25 cm.³ de tampon par boîte). Dans ces conditions on abandonne les coupes histologiques à la température du laboratoire pendant une heure. Dans certains cas et selon la structure du tissu, la durée totale du traitement peut atteindre un laps de deux heures comme maximum. Pour des pH inférieurs à 6,5, la vitesse de formation du colorant azoïque-protéique devient de plus en plus diminuée.

Les conditions opératoires que nous venons de décrire se sont montrées les plus favorables dans tous les cas. Elles ont été choisies pour une température ambiante du Laboratoire de 15° C. et sont valables pour des températures comprises entre 5° et 20° C. Pour des températures ambiantes supérieures il est avantageux de réaliser le processus de coloration des coupes en disposant au préalable les boîtes de Pétri dans un bain d'eau froide, afin de diminuer la vitesse de formation du colorant et d'obtenir ainsi une couche parfaite de colorant. Cette couche de colorant azoïque-protéique formé sur la surface des coupes, est très solide. Elle est complètement stable lorsque les coupes sont traitées par un mélange d'alcool et d'acide chlorhydrique concentré, chauffé à ébullition. La limite de résistance à ce traitement est donc exactement la même de la stabilité des coupes.

Résultats expérimentaux

(En collaboration avec M. Galofré Folch)

Nous donnons ci-dessous six microphotographies correspondant aux expériences réalisées, qui ont été choisies parmi celles que nous avons considéré comme les plus démonstratives des possibilités de nos diazoréactions tissulaires, comme nouveau moyen d'investigation histochimique, par exemple, dans le domaine de l'histopathologie humaine.

La figure 1 montre une coupe de la partie musculaire d'un

ulcus gastrique. On peut parfaitement observer le tissu musculaire avec une abondante réaction fibreuse, ainsi que les vaisseaux sanguins.

La figure 2 représente une coupe de cancer du rectus. Dans la partie supérieure de la microphotographie et aussi de son côté gauche supérieur, on observe très clairement le tissu

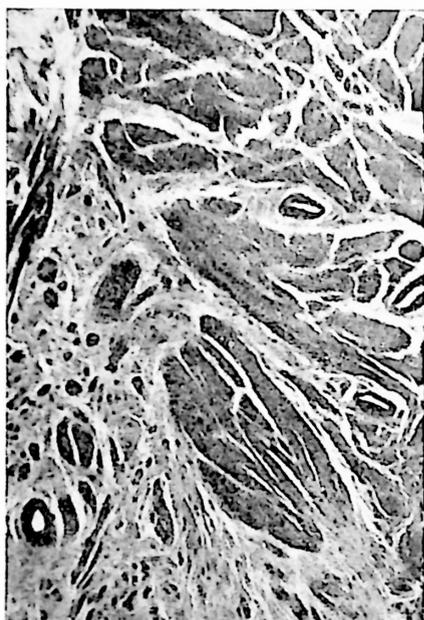


Figure 1

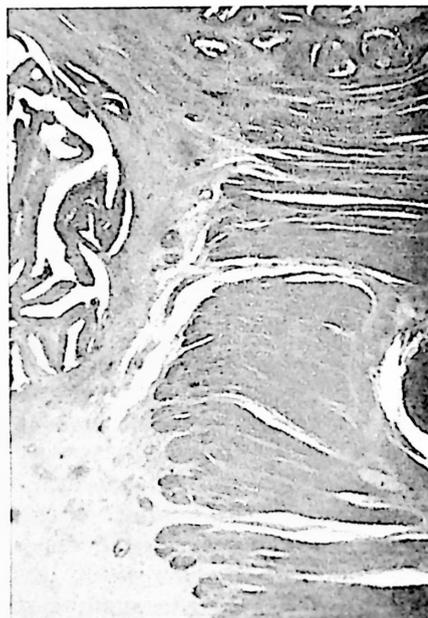


Figure 2

cancéreux, dont la coloration formée est moins intense par rapport au tissu musculaire sain, lequel est très intensément coloré. De son côté droit on observe la paroi d'un vaisseau sanguin, dont la coloration est également très intense. Par contre, dans son angle inférieur, à gauche, on observe le tissu gras, très faiblement coloré, et même incolore.

La figure 3 représente une coupe d'un autre cancer du rectus. On observe dans la partie supérieure droite de la microphotographie le tissu glandulaire normal. Puis à gauche la muscularis muqueuse avec quelques vaisseaux et sous la même, tout le long du côté gauche, le tissu musculaire normal. Dans la partie inférieure on observe le tissu cancéreux, très peu coloré.

La figure 4 montre une coupe de cancer du rectus dans la-

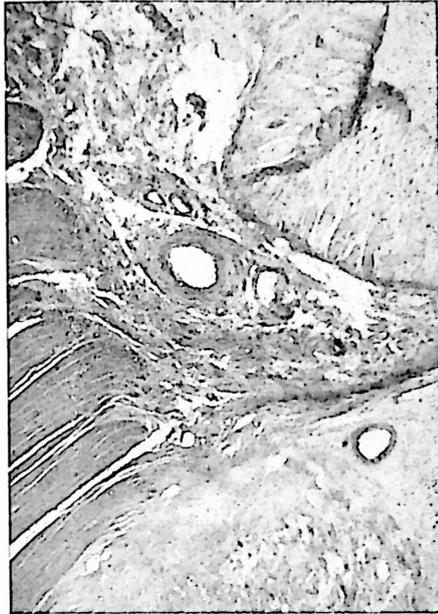


Figure 3

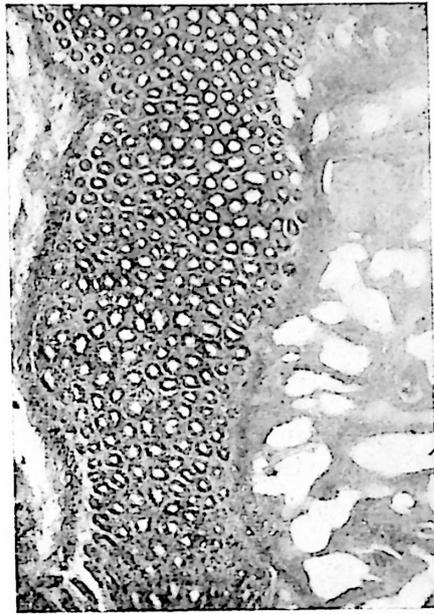


Figure 4

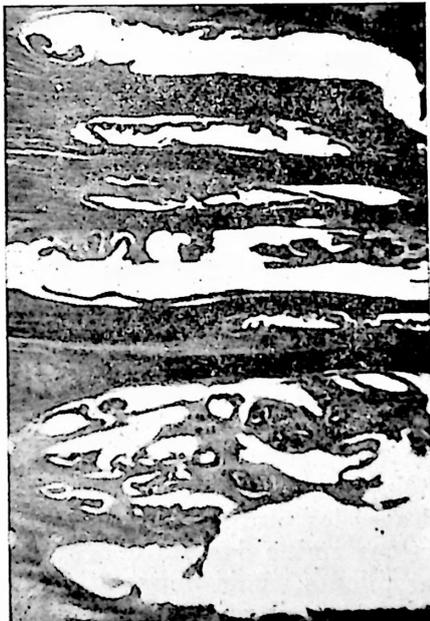


Figure 5

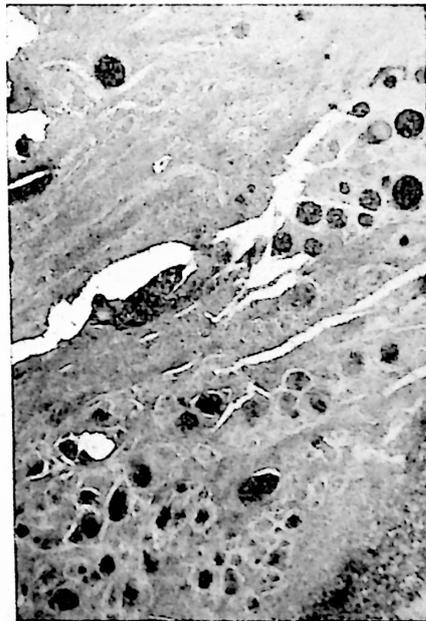


Figure 6

quelle on peut observer le tissu glandulaire normal parfaitement bien coloré, qui fait contraste avec le tissu cancéreux, situé tout au long du côté droit, et dont la coloration est très faible. Du côté gauche on observe des restes de tissu gras, encore moins coloré.

La figure 5 représente une coupe de tissu cancéreux du rectus. Dans cette microphotographie on constate l'infiltration du tissu cancéreux dans le tissu musculaire normal, de façon que seulement quelques myofibrilles sont observées.

La figure 6 montre un épithélioma de globules cornés du larynx. Vers la partie centrale on observe une tache noire plus grande que les globules et qui correspond aux hématies d'un vaisseau. Dans l'angle droit inférieur on peut observer le cartilage thyroïde.

Toutes ces microphotographies ont été obtenues en utilisant un écran bleu, afin d'atteindre dans les mêmes le maximum de contraste.

Discussion

Toutes ces microphotographies montrent les différences de structure de la maille protéique plus compacte des tissus musculaires sains, par rapport à celle des tissus cancéreux. Les groupes amino-fonctionnels terminaux libres des aminoacides constituant les liaisons peptidiques sont donc beaucoup plus compacts dans les tissus sains que dans les tissus cancéreux. Cela donne lieu comme suite à une plus grande concentration de colorant azo-protéique dans les tissus sains, plus riches en groupes amino-fonctionnels directement copulables avec le sel de diazonium. La graisse (glycérides impurs), ne fournit donc presque pas de coloration, selon il est parfaitement mis en évidence, d'une façon très accusée, dans nos microphotographies, comme, par exemple, dans celle de la figure 2.

Les vaisseaux sanguins, ainsi que les hématies, sont très intensément colorés, en accord avec leur richesse en fonctions aminées. Le même phénomène est observé dans les globules cornés de la figure 6. La kératine de ces globules se colore d'une intensité comparable. Le colagène du cartilage de la même figure se colore également, bien que d'une intensité inférieure.

L'action du formol comme net inhibiteur de la vitesse de formation du colorant azoïque-protéique, que nous avons observé, est bien à remarquer en accord avec les propriétés du même comme agent de blocage des fonctions amine des aminoacides. Ces propriétés sont bien connues d'ailleurs, mais pour qu'elles soient mises en évidence quantitativement, il faut opérer dans

des conditions expérimentales tout à fait spéciales en ce but. En outre, pas tous les aminoacides réagissent avec le formol (2). La question se complique, évidemment, lorsqu'il s'agit de protéines. C'est donc à tous ces facteurs ensemble que nous attribuons le fait de l'action du formol comme net inhibiteur de la vitesse de formation du colorant azoïque-protéique, mais pas comme inhibiteur de la formation du colorant lui-même (*).

Beaucoup plus remarquable est l'action de la paraffine, car les traitements préalables des coupes par chauffage, selon les méthodes d'inclusion à la paraffine, inhibent totalement la formation du colorant azoïque-protéique, de façon que les préparations histologiques correspondantes restent pratiquement incolores.

Comme, suite du chauffage des coupes histologiques, des altérations profondes du protoplasme sont à prévoir, et bien que ces altérations puissent être inaperçues au microscope, elles existent quand même et sont susceptibles de provoquer des changements de structure tissulaire, capables d'inhiber la formation ultérieure du colorant azoïque-protéique.

Justement ce sont des questions à considérer, surtout par rapport aux méthodes de recherche histochimique d'estérases, car les fortes inhibitions enzymatiques que provoque la paraffine, comme suite des traitements par inclusion, ont été signalées par divers auteurs, de même que l'action du formol. Une étude critique sur la valeur histochimique des méthodes de recherche des phosphomonoestérases a été faite par Monche et Ferrer-Arenillas (7), et postérieurement par Macary (1).

Un résumé de ce Mémoire a été déjà publié (8).

Bibliographie

- (1) MACARY, J. : Thèse de Doctorat en Médecine, pages 45 et 53 (Imprimerie Carlier-Saumade ; Montpellier, 1953).
- (2) MARENZI, A. D. : *Bioquímica Anal. Cuant.*, pages 459 et 460 (Edit «El Ateneo» ; Buenos Aires, 1947).
- (3) MENTEN, M. L., JUNGE, J., et GREEN, M. H. : *J. Biol. Chem.* ; 153, 471, 1944 ; NACHLAS, M. M., SELIGMAN, A. M., et MANHEIMER, L. H. : *J. National Cancer Institute* ; 9, 415-434, 1949.
- (4) MONCHE, J. : *Annales biologie clinique* ; 12, 553-560 (Paris, 1954).

(*) Les sels de diazonium se copulent en outre avec les amides [G. Oddo et A. Algerino : *Ber.*, 69, 279 (1936)], et sont donc susceptibles de réagir, en lente réaction secondaire, avec les fonctions amide des liaisons amidiques des chaînes peptidiques, tandis que le formol ne réagit pas.

- (5) MONCHE, J. : Actas I Reunión Nacional Sdad. Esp. Ciencias Fisiológicas, 127 et 128 (1953) ; *Annales biologic clinique* ; **12**, 553 et 559 (Paris, 1954).
- (6) MONCHE, J., et FERRER ARENILLAS, M. : *R. Esp. Fisiol.* ; **8**, 228-237, 1952.
- (7) MONCHE, J., et FERRER ARENILLAS, M. : *R. Esp. Fisiol.* ; **8**, 131-147, 1952.
- (8) MONCHE, J. : III Congrès International de Biochimie. Résumés des Communications, page 75 (Bruxelles, 1955).
- (9) SELIGMAN, A. M., et MANHEIMER, L. H. : *Journ. National Cancer Institut* ; **9**, 427 et 428, 1949.