

MISE EN ÉVIDENCE DU GLYCOGÈNE DANS LA CELLULE HÉPATIQUE PAR MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

P. DROCHMANS. Laboratoire de Cytologie et de Cancérologie expérimentale, Université Libre de Bruxelles, Belgique

La localisation du glycogène dans les cellules, notamment dans les cellules hépatiques, a pu être précisée grâce à des méthodes histochimiques relativement spécifiques. De nombreux travaux ont conduit à la conclusion généralement acceptée que le glycogène se situe dans le cytoplasme.

Au cours d'études relativement récentes au microscope électronique de divers tissus traités par la technique habituelle de fixation au tétrahydroxyde d'osmium, divers auteurs (3, 1, 4) ont décrit des plages claires situées entre les mitochondries et les éléments du réticulum endoplasmique, et présentant un contour irrégulier en apparence dépourvu de membrane propre. Par analogie avec les résultats de l'histologie et de l'histochimie optique les auteurs ont été amenés à suggérer que ces plages claires, n'ayant pas fixé l'osmium, pouvaient correspondre à des dépôts de glycogène.

A l'aide d'imprégnations aux métaux lourds (hydroxyde de plomb; acide phosphomolybdique), Watson (6) a produit, sur des coupes ultrafines de foie des dépôts de matériel opaque aux électrons, dont la distribution dans le cytoplasme rappelait celle du glycogène. La présence de glycogène à l'endroit du dépôt de plomb ou de composé phosphomolybdique n'a cependant pas pu être prouvée en appliquant le test de digestion enzymatique par la salive. Dans sa note préliminaire sur la fixation des tissus au permanganate, Luft (5) décrit dans les cellules du foie des rosettes et des agglomérats

d'éléments globuleux fort denses de 100 à 150 Å de diamètre. Il suppose qu'il s'agit de glycogène.

Le présent travail a consisté à comparer dans les mêmes conditions de fixation, d'inclusion, et de coloration (a) du glycogène particulaire isolé du foie de rat et purifié par centrifugation différentielle et (b) des coupes de foie de rats alimentés jusqu'au moment du prélèvement et dans lesquelles le glycogène pouvait être démontré par les méthodes histochimiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des rats de souche Wistar ont été utilisés pour la fixation de tissu hépatique et comme source de glycogène particulaire.

Le Glycogène Particulaire: Il a été préparé en se basant sur la méthode d'isolement du glycogène par centrifugation différentielle préconisée par A. Claude (2) avec cette différence que les fractions mitochondrie et microsome ont été éliminées ensemble à basse vitesse de centrifugation grâce à l'agglutination préalable de ces éléments en milieu légèrement acide.

En pratique, l'homogénat de foie obtenu par broyage dans l'eau distillée était acidifié par l'addition d'une solution tampon de phthalate de potassium-hydroxyde de sodium 0,1 molaire à pH 4,8 dans les proportions nécessaires pour atteindre dans le mélange final un pH de 5,2. Après un temps de 5 minutes, nécessaires pour compléter l'agglutination désirée, la suspension est débarrassée des mitochondries et des microsomes par une seule centrifugation de 5 minutes à 1100 g. Le glycogène resté dans le surnageant est concentré, puis soumis à deux lavages successifs dans l'eau distillée par trois centrifugations répétées de 5 minutes à 20.000 g. Toutes les manipulations ont été faites à froid entre 0°C. et

Ce travail a été effectué grâce à l'aide de la Fondation Yvonne Boël.

Reçu le 16 Mai 1960.

4°C. L'analyse chimique élémentaire du dernier culot de centrifugation, a montré que la teneur en azote du glycogène particulaire ainsi purifié était inférieure à 0,03 pour cent.¹

Le glycogène particulaire purifié, a été dispersé dans une solution de gélose (bacto-agar Difco) à 2 pour cent, maintenue à 45°C. Après refroidissement sur lame de verre à la température du laboratoire, des gouttes gélifiées de cette suspension sont débitées en petits blocs réguliers de 1 mm³ environ.

Fixation, Déshydratation, et Inclusion: Deux fixateurs ont été utilisés pour la fixation de blocs de gélose contenant le glycogène purifié: (a) une solution de tétroxyde d'osmium à 1 pour cent dans l'eau distillée non tamponnée et (b) une solution de permanganate de potassium à 2 pour cent dans l'eau distillée non tamponnée (pH supérieur à 7,0).

Le tissu hépatique a été fixé 24 heures dans le tétroxyde d'osmium en solution à 1 pour cent dans l'eau distillée non tamponnée (préconisée par A. Claude). Les petits blocs fixés ont subi de courts lavages (2 fois 3 minutes) dans l'eau distillée suivis d'une déshydratation par passages successifs dans l'éthanol à 70, 94, 100 pour cent pour chaque fois 3 périodes de 20 minutes. L'inclusion a été faite dans un mélange, 95 et 5 pour cent en volume, de butyl- et

de méthyl méthacrylate, polymérisé à 45°C. Les coupes ont été faites à l'aide d'un microtome Servall Porter-Blum, et couteau de diamant.

Coloration des Coupes au Permanganate: Les coupes ultrafines recueillies sur grilles ont été mises en contact avec une solution à 5 pour cent de permanganate de potassium (produit pour analyse, Merck, Darmstadt), préparée extemporanément dans l'eau distillée bouillante et refroidie à la température du laboratoire. La coloration au permanganate a été pratiquée dans une cupule de 5 cc. de capacité dont les parois ont été paraffinées. Cette dernière précaution évite en grande partie la formation d'un précipité d'oxyde de manganèse qui secondairement se fixe sur la grille. Une coloration de 20 à 30 minutes suffit à mettre en évidence le glycogène. La grille rincée a été ensuite recouverte d'une couche de carbone sur chacune des faces. L'examen a été fait à l'aide d'un microscope électronique, Siemens Elmiskop I.

Des coupes semifines (1,5 à 2 μ) de foie entier ou de préparation de glycogène particulaire en gélose ont été traitées par les méthodes histochimiques de Bauer et au PAS utilisées pour la mise en évidence de glycogène (oxydation suivie de coloration par le réactif de Schiff). Ces techniques de coloration, pratiquées sur des coupes prélevées sur les blocs, avant ou après les coupes ultrafines, ont été positives et ont ainsi permis de démontrer la présence du glycogène dans les coupes examinées au microscope électronique.

¹ Les détails de la méthode d'isolement employée, ainsi que le résultat des observations et analyses seront publiés ultérieurement.

FIGURE 1

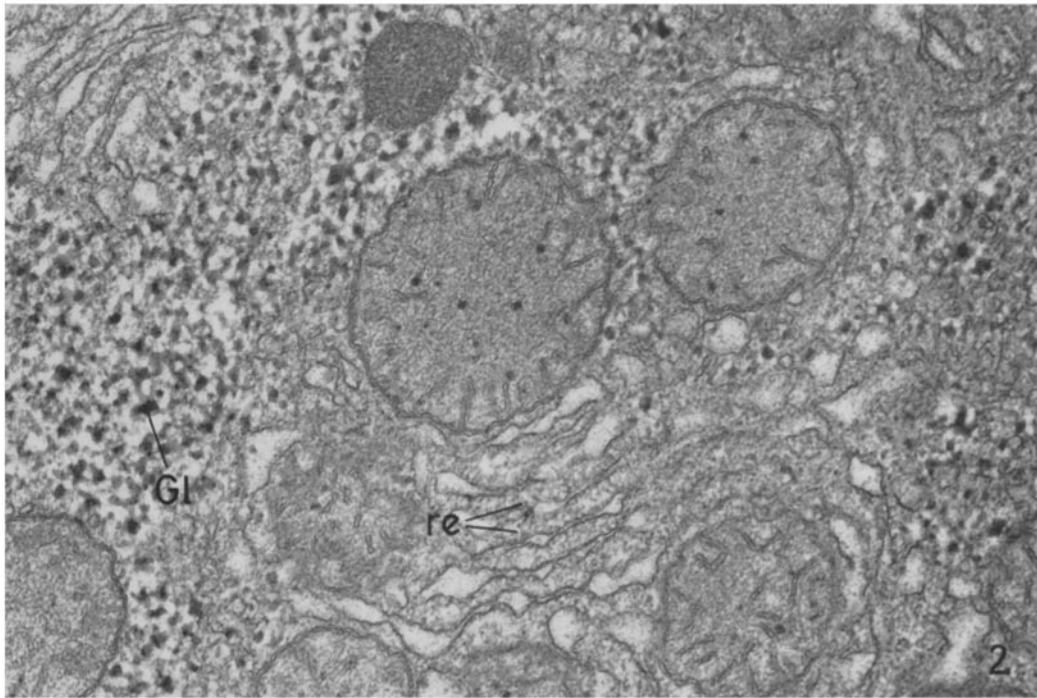
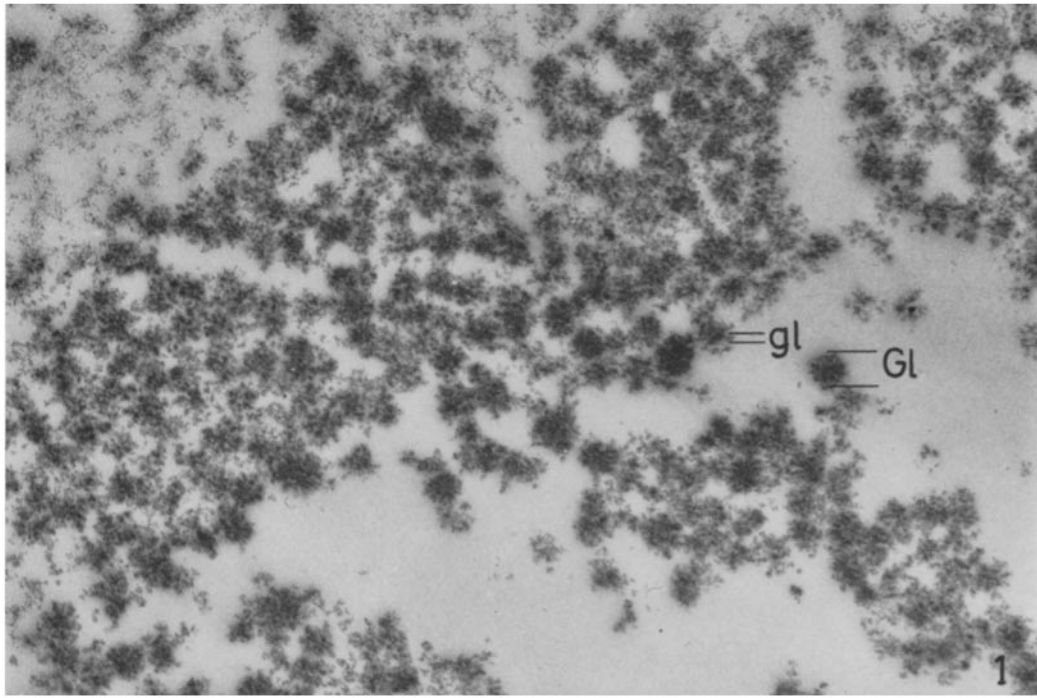
Micrographie électronique d'une coupe dans le glycogène particulaire enrobé dans la gélose et traité par le permanganate de potassium. Les formations arrondies (*Gl*) sont constituées d'une agglomération de particules plus petites (*gl*) de diamètre assez constant. Le long du bord droit de la photo, les grains sont partiellement dissociés en un fin précipité non structuré.

Fixation: solution à 2 pour cent de permanganate de potassium dans l'eau distillée.
Micrographie électronique prise à $\times 14.000$, agrandie à $\times 70.000$.

FIGURE 2

Micrographie électronique à fort grossissement. Elle représente une coupe dans le foie de rat, colorée par le permanganate. Le glycogène est mis en évidence par une coloration intense (*Gl*). La confluence des images donne un aspect caractéristique à la réaction du permanganate avec le glycogène. Dans l'angle supérieur droit et l'angle inférieur gauche, on reconnaît des éléments du réticulum endoplasmique (*re*). Les grains de Palade ont faiblement réagi avec le colorant.

Fixation: Tétroxyde d'osmium à 1 pour cent dans l'eau distillée; imprégnation au PTA dans l'alcool absolu. Coloration sur coupes au permanganate.
Micrographie électronique prise à $\times 20.000$, agrandie à $\times 70.000$.



RÉSULTATS

Les observations qui font l'objet de la présente note se rapportent à l'examen au microscope électronique de deux types de préparations: (a) du glycogène particulaire isolé enrobé dans la gélose et (b) du tissu hépatique normal.

Glycogène Particulaire: Des tests préliminaires ont montré que le tétr oxyde d'osmium ne colore pas le glycogène particulaire *in vitro*. Après traitement au permanganate, les particules de glycogène deviennent apparentes. La Fig. 1 révèle dans la constitution du glycogène particulaire ainsi mis en évidence des éléments de deux ordres de grandeur: (a) des grains principaux (*Gl*) de 60 à 120 m μ de diamètre environ et qui peuvent correspondre, en dimensions, aux particules obtenues par centrifugation différentielle; (b) des éléments moindres (*gl*) de 10 à 15 m μ de diamètre environ. Ces dernières formations sont le résultat de la juxtaposition de grains beaucoup plus fins, qui correspondent vraisemblablement aux points de dépôt du composé de manganèse.

Coupes de Foie Normal: La Fig. 3 donne une vue d'ensemble au microscope électronique, du cytoplasme d'une cellule hépatique après fixation au tétr oxyde d'osmium seul. La plupart des plages claires qui s'observent entre les mitochondries et

les éléments du réticulum endoplasmique correspondent aux amas de glycogène qui n'ont pas été colorés par le fixateur. La présence de glycogène dans ces mêmes régions peut être démontrée par une réaction de PAS-positive faite sur des coupes épaisses de mêmes blocs et voisines de celles examinées au microscope électronique.

Coupes de Foie Traitées au Permanganate: Les Figs. 2 et 4 montrent des coupes de foie normal traitées au permanganate après fixation au tétr oxyde d'osmium. Ces micrographies montrent que les préparations ont fixé le permanganate dans les régions du cytoplasme où le glycogène est présumé être présent. La Fig. 4 est une vue d'ensemble montrant la distribution particulière du substrat ayant réagi avec le permanganate. Le produit de la réaction est représenté par des grains ou des dépôts de grosseurs variables et qui montrent une tendance à confluer. La Fig. 2 est une préparation à plus fort grossissement, identique au grossissement de la Fig. 1 de façon à ce que les images données par le glycogène purifié et le glycogène *in situ* puissent être comparées. Il est apparent que la coloration sur coupes de foie donne des images de grains plus compacts, confluent, et à contours irréguliers tandis que le glycogène isolé (Fig. 1) présente une texture plus délicate.

FIGURE 3

Micrographie électronique d'une coupe de foie de rat non colorée au permanganate. Cette vue d'ensemble montre de gauche à droite une partie du noyau et à droite de celui-ci le cytoplasme dans lequel les mitochondries (*m*) et le réticulum endoplasmique (*re*) sont uniformément répartis. Les grains denses décrits comme corps denses (microbodies) (*mb*) apparaissent avec une structure granuleuse et une zone centrale homogène. Les plages claires à contours polycycliques correspondent au glycogène (*Gl*).

Fixation: Tétr oxyde d'osmium à 1 pour cent; imprégnation au PTA dans l'alcool absolu. Pas de coloration au permanganate.

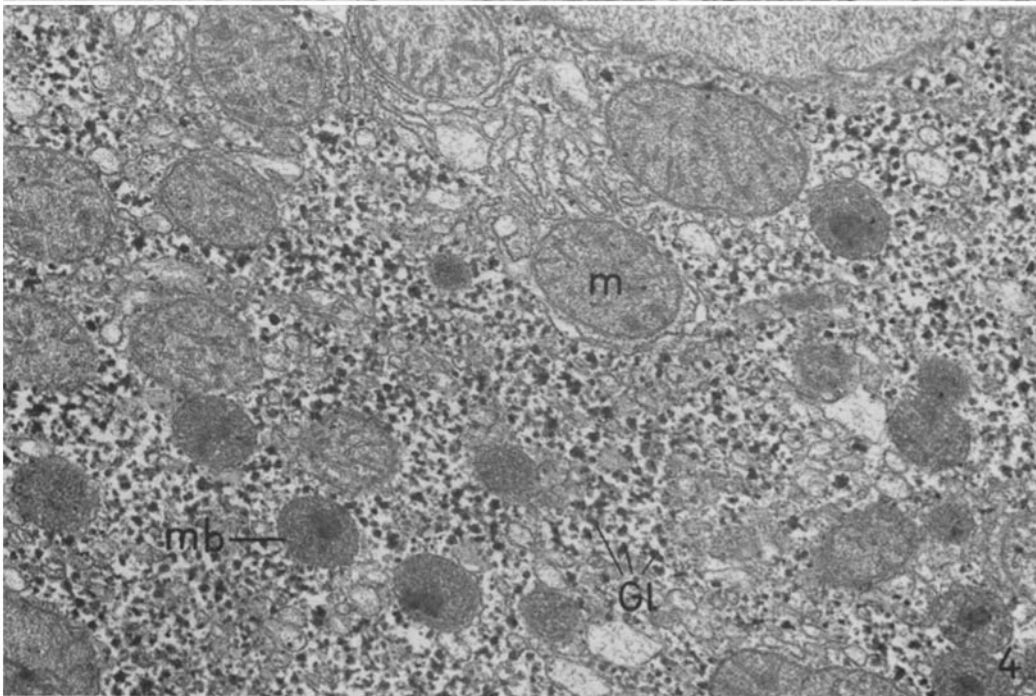
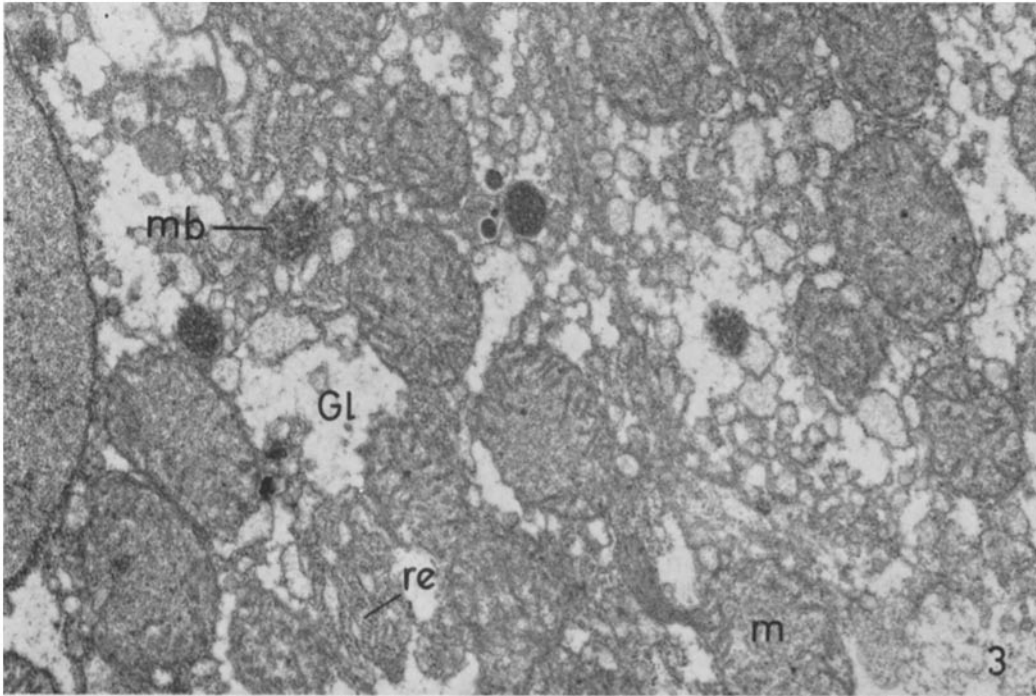
Micrographie électronique prise à $\times 12.000$, agrandie à $\times 18.000$.

FIGURE 4

Cette micrographie électronique prise à un grossissement comparable à celui de la Fig. 3, est destinée à montrer une vue d'ensemble d'une partie de cellule hépatique après coloration sur coupe de glycogène. Toutes les membranes ont augmenté leur contraste, la structure interne des corps denses (*mb*) montre mieux les détails que sur les coupes non colorées. Le glycogène apparaît sous forme d'un précipité opaque (*Gl*).

Fixation: tétr oxyde d'osmium à 1 pour cent, imprégnation au PTA. Coloration sur coupe par le permanganate de potassium.

Micrographie électronique prise à $\times 12.000$, agrandie à $\times 18.000$.



DISCUSSION

La coloration du glycogène par le permanganate n'est pas sélective puisque ce réactif augmente ou modifie d'une manière constante le contraste de nombreuses structures cellulaires, et en particulier les membranes qui ont déjà fixé l'osmium. Cependant, la réaction au permanganate présente une certaine spécificité puisque le glycogène réagit avec le permanganate tandis que dans les mêmes conditions, il reste inerte vis-à-vis de l'osmium ainsi que vis-à-vis de l'acide phosphotungstique. Praticqué avec les témoins et le soin nécessaire le test au permanganate peut constituer une méthode utile pour la recherche et la mise en évidence du glycogène dans les tissus par microscopie électronique.

Je remercie le Professeur A. Claude pour ses suggestions et ses conseils dans la préparation du glycogène particulaire et pour l'intérêt qu'il a pris à ces travaux.

BIBLIOGRAPHIE

1. BERNHARD, W., and ROULLER, C., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1956, **2**, No. 4, suppl., 73.
2. CLAUDE, A., *J. Exp. Med.*, 1946, **84**, 263.
3. FAWCETT, D. W., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1955, **15**, suppl., 1475.
4. HINGLAIS-GUILLAUD, N., *Bull. Assn. franç. étude Cancer*, 1959, **46**, 212.
5. LUFT, J. H., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1956, **2**, 799.
6. WATSON, M. L., *J. Biophysic. and Biochem. Cytol.*, 1958, **4**, 475 et 727.