Rev. Fr. Histotechnol., 1990, **3**, n° 1, p. 49-60

UTILISATION DE LA MORPHOMÉTRIE DANS L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ PHARMACOLOGIQUE CUTANÉE DES RETINOIDES

P. ROSSIO - M. DANGE - J. FERRACIN - A. CHATELUS

CIRD GALDERMA
Route des Lucioles - Sophia Antipolis - 06565 VALBONNE CEDEX

MOTS CLÉS

Analyse d'image, acné, souris rhino, rétinoides.

RÉSUMÉ

Les effets comédolytiques et hyperplasiques des rétinoides sont quantifiés grâce à un modèle animal appelé : « La Souris Rhino ». Une technique histologique classique est utilisée pour la visualisation des différentes structures cutanées à mesurer. L'étude morphométrique est réalisée par un appareil semi-automatique : le MOP-Vidéoplan.

INTRODUCTION

Le Centre International de Recherche Dermatologique Galderma (CIRD GALDERMA) a pour vocation la recherche de nouveaux produits actifs dans le traitement des maladies dermatologiques. L'acné fait partie d'un de ses thèmes de recherche. La famille des rétinoides est déjà connue dans le **traitement de l'acné** avec comme précurseur l'acide tout-trans rétinoique utilisé depuis plus d'une vingtaine d'années.

De nombreux tests pharmacologiques sont nécessaires pour l'évaluation de ces produits. L'étude de l'**effet comédolytique des rétinoides** est un des tests retenus pour mettre en évidence l'effet pharmacologique cutané de cette gamme de

produit (1). Ce test utilise un modèle animal particulier, la **souris Rhino.**

L'utilisation de techniques nouvelles telles les **mesures morphométriques** nous permet de quantifier l'effet pharmacologique des différents traitements.

Après une présentation de la souris Rhino, l'étude morphométrique va être développée afin de justifier l'utilisation, la validité et l'intérêt de cette méthode. On s'appuiera sur l'exemple de l'acide tout-trans rétinoique qui fait figure de produit de référence actuellement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèle animal

La souris Rhino hr^{rh}/hr^{rh} doit son appellation à Howard en 1940 (2). C'est une souris mutante, le gène Rhino étant un allèle récessif du gène hairless. Nous ne pouvons pas distinguer les souris mutantes homozygotes des souris hétérozygotes, de la naissance jusqu'à l'âge de 15-17 jours. Leur aspect physique à l'âge adulte est caractérisé par une peau très plissée, l'absence de poils et un tégument anormal.

Lors de l'observation histologique de la peau de cette souris, on note la présence de **comédons épidermiques et de kystes dermiques** (figure 1). Il est à noter que d'autres anomalies histologiques sont décrites sur certains organes après l'âge de deux mois (foie, rate, thymus, nœux lymphatiques, glomérules rénaux, œil).

L'intérêt de ce modèle réside dans la présence de ces comédons, utricules remplis de matériel corné et dont l'aspect histologique est proche des lésions rétentionnelles acnéiques humaines, sans avoir toutefois les symptômes majeurs de l'inflammation. En effet cette souris est dépourvue de bactéries « Propionibacterium acnès ».

Traitement

Le but de cet article n'étant pas de donner des résultats sur l'effet de produits, mais de décrire l'utilisation d'une technique morphométrique, nous présentons le traitement avec l'Aberel gel® afin de visualiser l'expression des résultats quantitatifs.

- Produit : 50 µl d'Aberel gel® commercialisé à 0,025 %. P/P (témoin positif).
- Zone traitée : milieu du dos (2,5 cm^2).
- Nombre d'animaux par lot : 6 (animaux mâles et femelles).
- Durée : 3 semaines à raison de 5 jours de traitement par semaine.

Technique histologique

- Les « punch-biopsies » de 6 mm de diamètre sont fixés pendant 24 heures minimum dans le formol à 10 % tamponné à pH 7.2-7.4 (10 ml de formaldéhyde solution à 36-40 % pour 90 ml de tampon soude-phosphate-fixateur de Carson).

- Les biopsies sont coupées en deux par le milieu, avant d'être incluses en paraffine (la jonction dermo-épidermique doit être incluse bien perpendiculairement à l'angle de coupe).

- Pour chaque bloc on réalise 3 coupes de 5 µm d'épaisseur espacées de 150 µm + ou − 5 µm, étalées sur une même lame.

- On réalise une coloration à l'Hémalun-Phloxine-Safran (réf. Histochimie

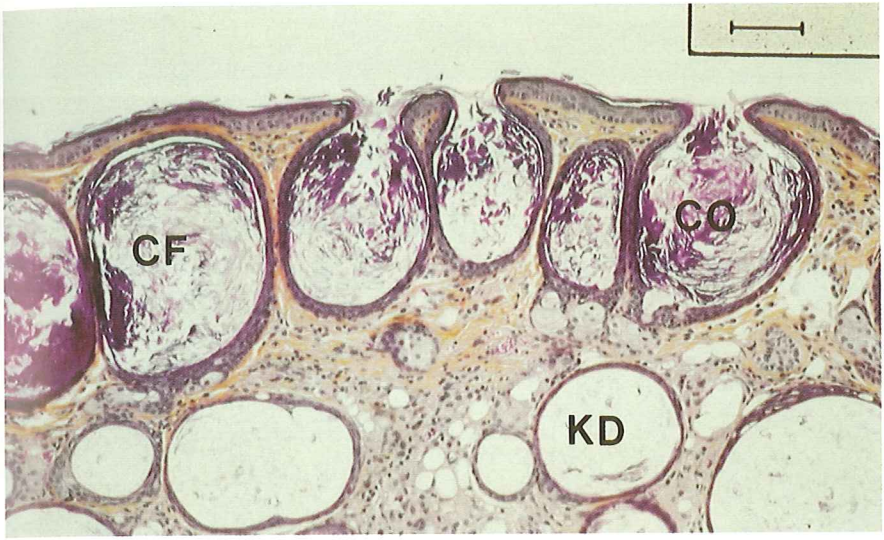


Figure 1 : **Histologie de la peau du dos de souris rhino (H.P.S./X 125)**
CO comédon ouvert - CF comédon fermé - KD kyste dermique.

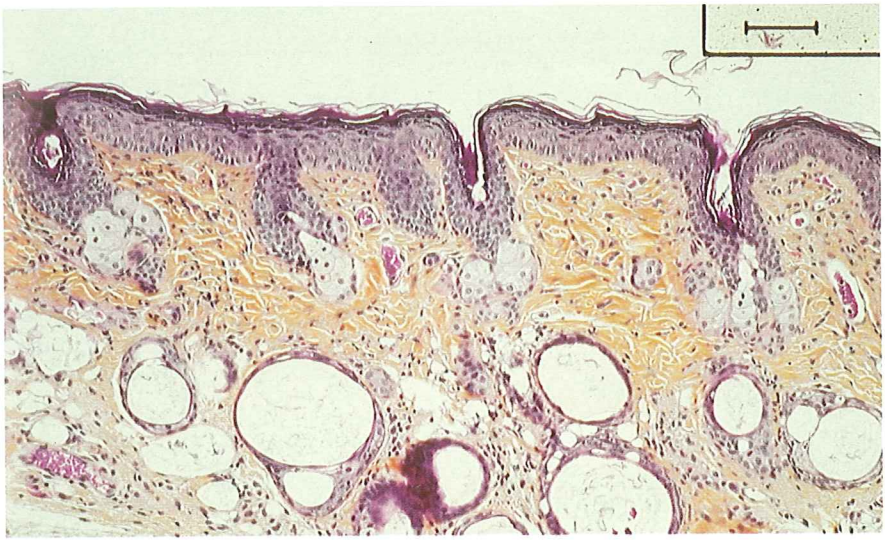


Figure 2 : **Histologie de la peau de souris rhino après traitement topique à l'Aberel® 0,025 % pendant 3 semaines (H.P.S./X 125)**

Figure 3 : **Photographie de l'écran vidéo lors de la mesure de la jonction dermo-épidermique**

Figure 4 : **Photographie de l'écran vidéo lors de la mesure de l'épaisseur épidermique**

normale et pathologique. P. Ganter-G. Jolles).

Appareillage morphométrique

L'analyse quantitative à l'aide de micromètres a déjà été utilisé par les équipes de C. Bonne (3) et R. Ashton (4) pour évaluer l'effet d'agents comédolytiques. La particularité de notre étude est d'avoir réalisé des mesures semi-automatiques, avec un appareillage de type MOP-Vidéoplan commercialisé par Kontron.

On peut voir sur la figure 7 les différents appareils nécessaires connectés entre eux :

- Microscope,
- Caméra,
- Ecran vidéo,
- Ordinateur MOP-Vidéoplan,
- Table à digitaliser,
- Imprimante.

On fait la mise au point sur la lame placée sur la platine du microscope. Son image est visualisée sur l'écran par l'intermédiaire de la caméra vidéo. En déplaçant le curseur sur la table à digitaliser, on souligne les éléments à mesurer. L'ordinateur intègre ces mesures et les restitue en mesures métriques grâce à une calibration faite préalablement à l'aide d'abaques.

PARAMÈTRES MESURÉS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les rétinoides, dérivés de la vitamine A, ont pour effet de réduire le matériel corné présent dans le canal folliculaire (propriétés kératolytiques). (5).

Les mesures sont destinées à établir ce pouvoir comédolytique dans le modèle animal souris Rhino, en utilisant comme témoin positif l'Aberel gel®. En pratique un produit est dit comédolytique lorsqu'il provoque la diminution de la taille des utricules ; le stade suivant étant celui d'une expulsion progressive du comédon (comédo-expulsion. Figure 2). Lorsque le produit est très actif on peut arriver à une disparition quasi-totale des comédons épidermiques. Les rétinoides provoquent parallèlement une acanthose épidermique.

Pour rendre compte de ces différents changements morphologiques, les paramètres suivants sont mesurés :

- *soit visuellement au microscope*

Nombre de comédons épidermiques ouverts à la surface (figure 1).

Nombre de comédons épidermiques fermés à la surface (figure 1).

Nombre de kystes dermiques (figure 1).

- *soit à l'aide du vidéoplan*

Longueur de la jonction dermo-épidermique (figure 3).

Epaisseur de l'épiderme (figure 4).

Diamètres comédoniens d et D (figures 5 et 6).

Pour une biopsie, les mesures sont faites sur les trois coupes espacées de 150 µm et cumulées, de façon à limiter les artéfacts de coupe.

A partir de ces données brutes les paramètres calculés sont les suivants :

- **Nombre de comédons épidermiques par unité de longueur basale,**
- **Profil comédonien r = d/D** (reflet de la taille et de la forme des utricules),
- **Epaisseur de l'épiderme** (reflet de l'hyperplasie).

En pratique les mesures sont faites lot par lot et animal par animal. A 1 animal

correspond 1 lame, soit 3 coupes à mesurer sur toute leur longueur.

On respecte l'ordre suivant :

1. L'appareil est calibré en fonction de l'objectif utilisé, à l'aide d'un abaque.

2. Mesure de d et D sur une première coupe (tous les comédons ouverts).

3. Mesure de la longueur basale correspondante.

4.On fait successivement les mêmes mesures sur les deux autres coupes de la même lame.

5.Visuellement au microscope, on compte sur l'ensemble des trois coupes le nombre de comédons épidermiques ouverts à la surface, le nombre de comédons fermés et le nombre de kystes dermiques. On saisit ces valeurs dans l'ordinateur.

6. Ensuite l'appareil intègre ces différentes données et cumule le nombre de comédons ouverts et la longueur totale mesurée sur les trois coupes.

7. Mesure de l'épaisseur épidermique pour les trois coupes correspondant aux longueurs de basales mesurées.

Ces mesures sont transférées sur un ordinateur qui va permettre de faire les moyennes par lot d'animaux et les calculs statistiques.

La figure 8 montre les paramètres exploités qui sont :

- Le nombre de comédons ouverts/cm de longueur basale (N.O.C./CM).
- Le nombre de comédons épidermiques/cm de longueur basale (N.E.C./CM).
- Le nombre de comédons dermiques/cm de longueur basale (N.D.C./CM).
- Le nombre total de comédons/cm de longueur basale (N.T.C./CM).
- L'épaisseur épidermique (thick).
- Les diamètres d (orifice) et D (utricule).
- r = d/D calculé sur chacun des comédons.

VALIDATION DU TEST

On doit prendre toutes les précautions pour s'assurer que le test est reproductible et représentatif de l'effet observé. Pour cela nous avons :

• standardisé au maximum :

- Le prélèvement en faisant un « punch-biopsie » ;
- La préparation histologique de l'échantillon (la longueur mesurable est à peu près toujours la même, ainsi que l'angle de coupe) ;
- La mesure (façon de souligner les éléments à mesurer à l'aide du curseur) ;

• Limité les artéfacts de coupe en mesurant 3 coupes espacées de 150 µm ;

• Fait systématiquement des lots témoins appropriés (témoin négatif, témoin positif) ;

• Contrôlé, à la mise en place du test, que les mesures étaient cohérentes avec les observations histologiques visuelles.

• Fait des tests de variabilité dans le temps sur différentes études (figure 11).

• Fait les tests statistiques appropriés.

EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Sur les figures 9 et 10 on peut voir un exemple d'exploitation des résultats (effet de l'Aberel gel®).

La figure 9 montre l'effet de l'Aberel gel® sur le nombre de comédons épidermiques par unité de longueur basale.

Mesure de d et de D
Photographie de l'écran vidéo

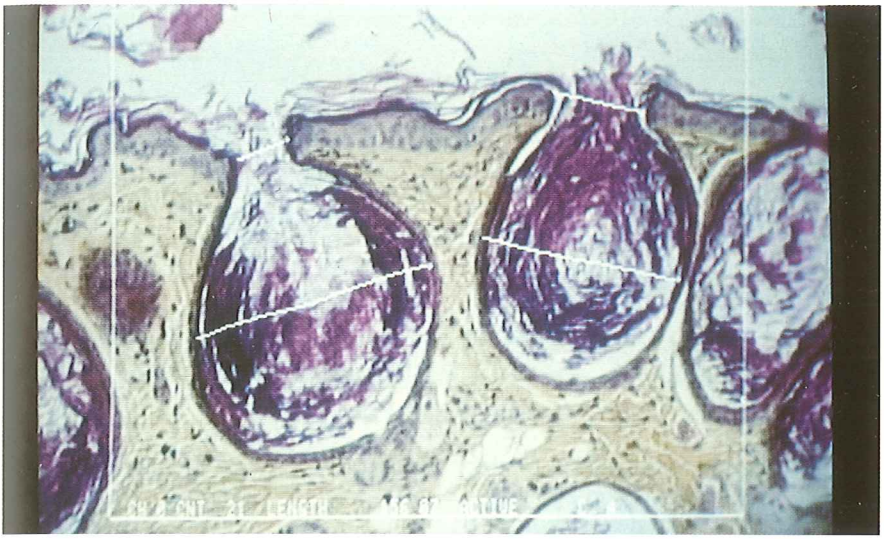


Figure 5 : **Souris rhino témoin**

Figure 6 : **Souris rhino traitée à l'Aberel gel®**

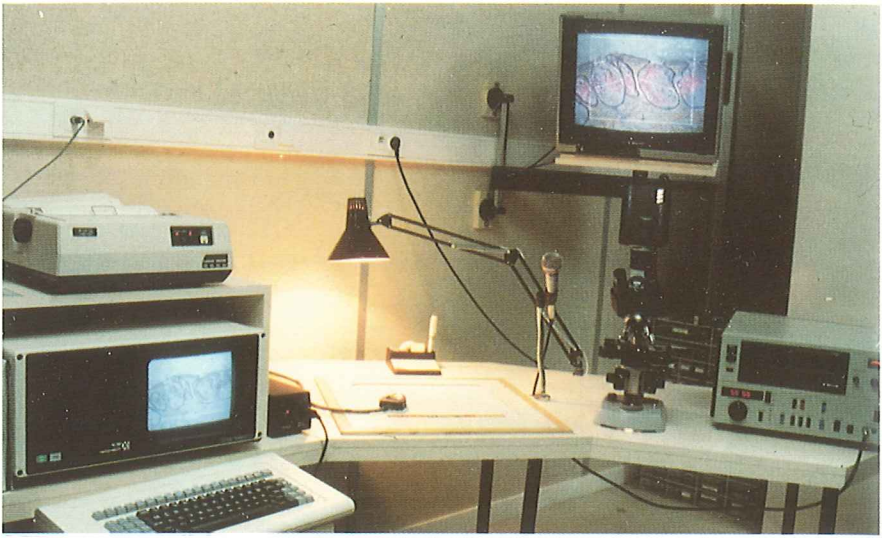
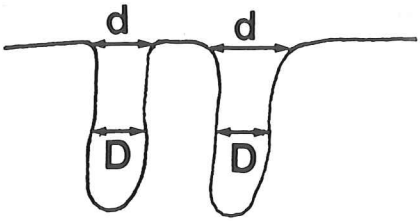


Figure 7 : **Appareillage de mesure MOP-Vidéoplan**

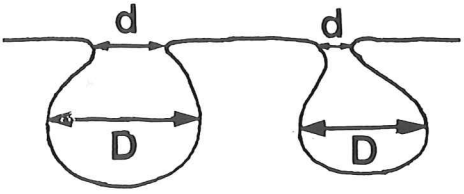
La figure 10 rend compte de l'effet de l'Aberel gel® sur le profil comédonien. Pour l'étude de l'activité des rétinoides, le paramètre r est particulièrement représentatif.

Les différentes représentations de « r = d/D » sont les suivantes :

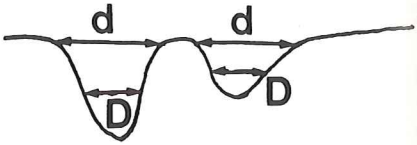
PRODUIT ACTIF r ⩾ 1



PRODUIT NON ACTIF r < 1



PRODUIT TRÈS ACTIF r >> 1



CALCULS SOURIS RHINO

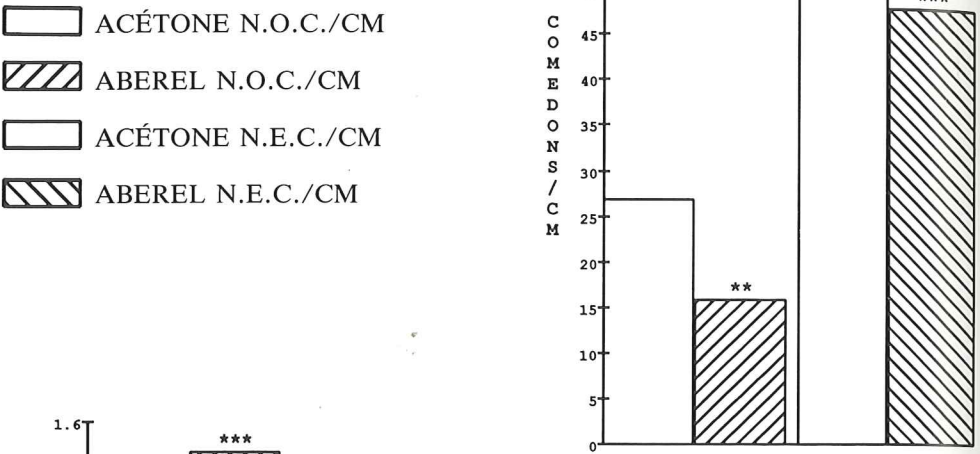
Compound	Dose	Véhicle	N.O.C.	N.O.C./CM	N.E.C.	N.E.C./CM	N.D.C.	N.D.C./CM	N.T.C.	N.T.C./CM	LENGTH	THICK.	r=d/D	d	D
			44	29	105	70	72	48	177	118	1.50	17.23	0.64	56	108
			41	23	118	66	90	50	208	116	1.80	18.64	0.84	86	122
			43	31	110	79	47	34	157	112	1.40	14.69	0.71	52	92
			49	27	116	64	87	48	203	113	1.80	17.55	0.62	59	121
			32	25	90	69	39	30	129	99	1.30	20.88	0.87	67	96
		Acétone	33	28	81	68	52	43	133	111	1.20	20.77	0.84	62	83
		Mean	40	27	103	69	65	42	168	111	1.50	18.29	0.75	64	104
		Error/ mean	3	1	6	2	9	3	14	3	0.10	0.96	0.05	5	7
		« t » Test													
			23	13	63	35	105	58	168	93	1.80	50.36	1.60	44	29
			19	14	73	52	45	32	118	84	1.40	40.40	1.31	38	30
			10	8	68	57	74	62	142	118	1.20	37.83	1.58	54	35
			25	18	63	45	80	57	143	102	1.40	44.20	1.47	54	39
			32	17	94	49	80	42	174	92	1.90	51.41	1.61	56	38
Aberel	0.025 %	Gel	42	26	80	50	106	66	186	116	1.60	40.28	1.53	47	31
		Mean	25	16	74	48	82	53	155	101	1.55	44.08	1.63	49	34
		Error/ mean	4	2	5	3	9	5	10	6	0.11	2.31	0.05	3	2
		« t » Test		**		***		N.S.		N.S.		***	***	*	***

Figure 8 : **Calcul des paramètres - tableau comparatif entre l'Aberel gel® et le témoin acétone.**

Figure 9

Effet comédolytique de l'Aberel® gel 0,025 %

t Test : N.S. non signicatif ;
* P<0,05 ; ** P<0,01 ; *** P<0,001



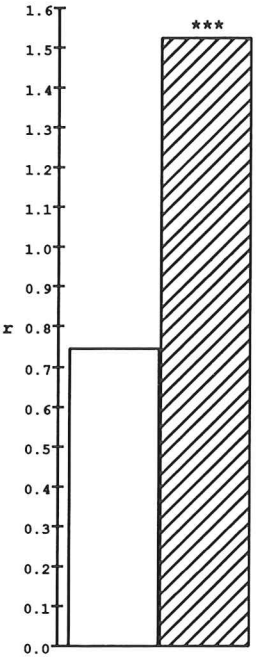


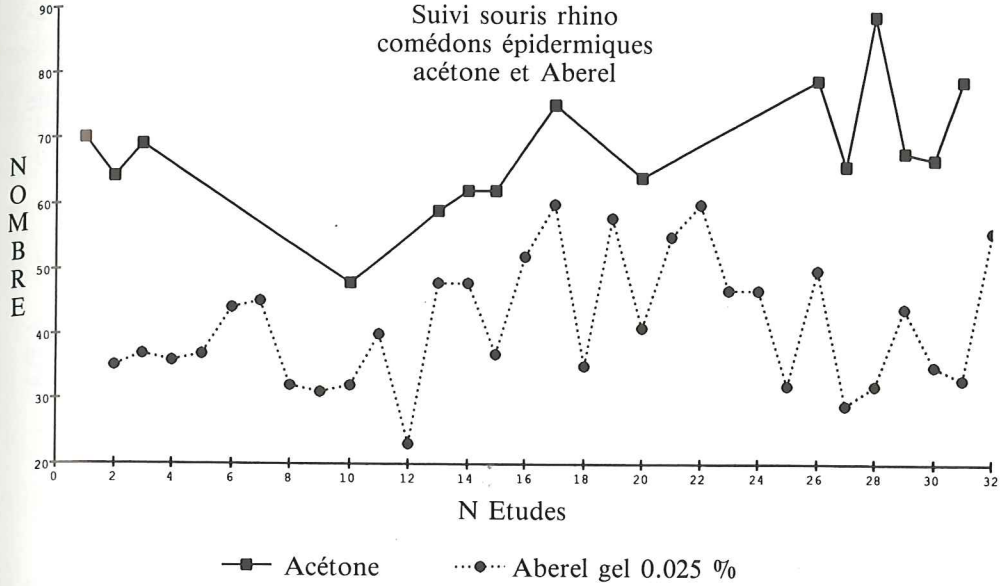
Figure 10
Effet de l'Aberel gel® 0,025 % sur le profil comédonien
(r = d/D)

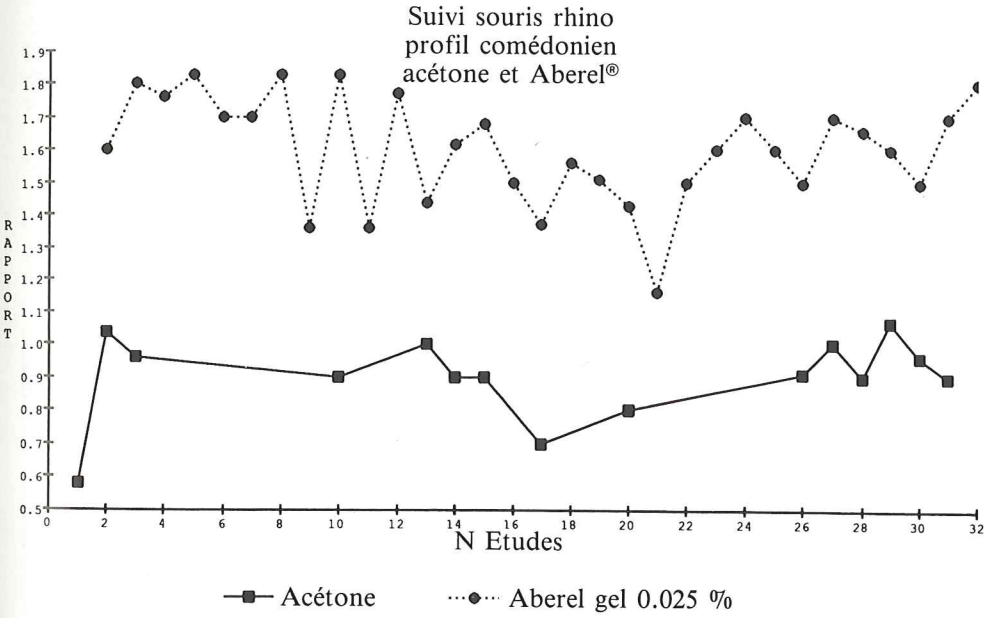
ACÉTONE

ABEREL

t Test N.S. non significatif
* P< 0,05 - ** P<0.01 - *** P<0.001

Figure 11 : **Variabilité des mesures dans le temps, sur des études différentes**





Ces résultats montrent que l'Aberel gel® possède un pouvoir comédolytique important pour les raisons suivantes :

- Le nombre de comédons épidermiques diminue significativement.

- Dans un même temps la structure des comédons change. Le profil r augmente significativement, ce qui signifie que les comédons n'ont plus la forme d'origine. En examinant les colonnes des mesures d et D sur la figure 8, on constate que cette variation est due à une diminution importante de D alors que d reste proche des valeurs témoins. La majorité des comédons sont rétrécis sous l'effet de l'hyperplasie pour être ensuite expulsés.

CONCLUSIONS

De nombreuses étapes sont nécessaires à l'élaboration des résultats. Celles-ci doivent être exécutés avec rigueur si l'on veut que l'étude soit validée (traitement, prélèvement, préparation histologique, mesure). Des lots témoins (positifs et négatifs) valideront les résultats de l'étude.

Si nous respectons tous ces stades, la technique d'analyse possède de nombreux avantages :

- La précision des résultats quantitatifs par rapport aux observations histologiques qualitatives.

- La possibilité de faire des calculs statistiques et de réaliser des courbes.

- La possibilité de comparer différents produits entre eux, d'apprécier un effet dose, d'étudier une cinétique.

Malgré l'utilisation du vidéoplan la méthode reste lourde à plusieurs niveaux :

- Coupes sériées lors de la préparation histologique.

- Mesures.

- Transfert des données sur un ordinateur central pour l'exploitation des résultats.

Kontron vient de sortir une nouvelle génération de vidéoplan qui devrait résoudre les deux derniers points cités ci-dessus.

REMERCIEMENTS

Je remercie Chantal Delain et Chantal Piedagnel pour l'aide technique qu'elles m'ont apportée dans la réalisation de cet article.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. CHATELUS A., CARON J.-C., SHROOT B., EUSTACHE J., HENSBY C.N. : Structure-activity relationships between retinoids using the topical Rhino mouse comedolytic model. Pharmacology and the skin. 1989, Vol 3, 144-148.
2. A. HOWARD : « Rhino », an allele of hairless in the Rhino mouse. J. Hered. 1940, **31**, 467-470.
3. C. BONNE et al. : A new model for the assay of comedolytic activity. Int. J. of cosmet. Sci. 1981, **3**, 23-28.
4. R. ASHTON et al. : Histologic changes in the skin of the Rhino mouse (hr/hr) induced by retinoids. J. of Invest. Dermatol. 1984, **82**, 632-635.
5. L. H. KLIGMAN et al. : The effect on Rhino mouse skin of agents which influence keratinisation and exfolation. J. of Invest. Dermatol. 1979, **73**, 354-358.