

Université de Montréal

**Développement d'une approche quantitative pour
l'étude du poumon équin
Fixation et échantillonnage pour l'application des
principes de la stéréologie**

par

Emilie Gélinas-Lymburner

Département de Sciences Cliniques
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Sciences vétérinaires
option Sciences cliniques

Décembre, 2014

© Emilie Gélinas-Lymburner, 2014

Résumé

La présente étude visait à développer un protocole de fixation et d'échantillonnage pour le poumon équin suivant les directives publiées sur l'utilisation d'une approche stéréologique de type « design-based ».

Les poumons gauches de chevaux contrôles et atteints du souffle ont été fixés avec du formaldéhyde 10% pendant 48h à une pression constante de 25-30 cm d'H₂O. Les poumons ont été sectionnés en 20-21 tranches d'une épaisseur d'environ 2,5 cm chacune; de 10-11 tranches ont été sélectionnées de façon aléatoire et systématique pour la mesure du volume de référence avec la méthode de Cavalieri. Un protocole d'échantillonnage systématique, aléatoire et uniforme utilisant le principe du « smooth fractionator » et un poinçon à biopsie de 17 mm ont été utilisés pour échantillonner une fraction représentative de chaque poumon. Les méthodes d'échantillonnage de sections verticales, uniformes et aléatoires (VUR) et d'échantillonnage isotropique, uniforme et aléatoire (IUR) ont toutes deux été effectuées pour comparer le nombre de voies respiratoires en coupe perpendiculaire obtenues à partir de chaque méthode. L'architecture globale et la qualité des tissus fixés ont également été évaluées.

Des spécimens pulmonaires équins ont été échantillonnés avec succès selon un protocole visant à produire des données morphométriques valides. Les tissus ont été fixés avec un minimum d'artéfacts et contenaient une quantité suffisante de voies respiratoires en coupe perpendiculaire dans les deux types d'échantillons.

En conclusion, un protocole de fixation et d'échantillonnage adapté au poumon équin permettant l'utilisation d'une approche stéréologique de type « design-based » a été élaboré pour l'étude du remodelage des voies respiratoires.

Mot-clés : Fixation à pression constante, échantillonnage systématique, uniforme et aléatoire, méthode de Cavalieri, poumon équin, échantillonnage isotropique uniforme et aléatoire, sections verticales.

Abstract

The present study aimed at developing a fixation and sampling protocol for the horse lung in agreement with recent published guidelines for a design-based stereology approach.

The left lungs from control and from heaves-affected horses were fixed in 10% formaldehyde for 48hr at a controlled constant pressure of 25-30 cm H₂O. Lungs were cut into 20-21 slices of a thickness of approximately 2.5cm each; 10-11 slices were then randomly and systematically selected for the measurement of the reference volume using the Cavalieri method. A systematic, uniform and random sampling (SURS) protocol using a 17 mm punch biopsy and the smooth fractionator principle was used to select a representative fraction of each lung. The vertical uniform random (VUR) and isotropic uniform random (IUR) sampling methods were both performed to compare the number of perpendicular airways obtained with each method. The general architecture and the quality of the fixed tissues were also evaluated.

Equine lung tissues were successfully sampled with a protocol designed to yield accurate morphometric data. The tissues were fixed with minimal artifacts and contained an adequate amount of perpendicular airways in both VUR and IUR sections.

In conclusion, we developed a fixation and sampling protocol adapted to the equine lung allowing the use of a design-based stereology approach to study airway remodeling.

Keywords : Cavalieri method, constant pressure, fixation, horse lung, isotropic uniform random sample, stereology, systematic uniform random sampling, vertical uniform random sample.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xii
Liste des symboles	xii
Remerciements	xiv
Introduction	1
Revue de littérature.....	2
Fixation du poumon équin entier	2
Théorie de la fixation à pression constante	3
Choix du fixateur idéal.....	7
Évaluation quantitative du poumon	10
Problématiques rencontrées en microscopie quantitative	11
Variance dans une étude biologique	15
Définition de la stéréologie	17
L'importance du volume de référence	21
Outils de mesure en stéréologie	27
Estimation des paramètres géométriques.....	30
Échantillonnage.....	40
Traitement du tissu biologique post-fixation	50
Milieux d'enrobage : Paraffine, glycol méthacrylate, résine.....	51
Changements dimensionnels.....	51

Hypothèse et objectifs.....	2
Matériel et Méthodes.....	57
Protocole de préparation des différents réactifs.....	57
Formol 10%.....	57
Solution de phosphate tamponnée.....	58
Z-Fix©	59
Agar.....	60
Comment fabriquer un « isector ».....	62
Considérations pour l'euthanasie et l'obtention des poumons.....	65
Fixation à pression constante	66
Réactifs.....	67
Liste de matériel.....	67
Dissection du poumon équin.....	68
Protocole de fixation	70
Échantillonnage du poumon.....	76
Liste de matériel.....	77
Coupe du poumon pour le calcul du volume de référence avec la méthode de Cavalieri.....	78
« Smooth Fractionator ».....	83
Échantillonnage aléatoire, isotropique et uniforme	88
Mesure du rétrécissement des tissus par l'enrobage à la paraffine	98
Comment utiliser une table de chiffres aléatoires.....	99
Discussion	101
Application de la stéréologie.....	101
Élaboration du protocole de fixation et d'échantillonnage	105
Fixation	106
Formaldéhyde et formaldéhyde additionné de zinc	107
Recherche de l'équipement.....	108

Adapter la méthode d'échantillonnage systématique, uniforme et aléatoire au poumon équin entier.....	109
Méthode de Cavalieri.....	109
Études futures.....	110
Conclusion.....	100
Bibliographie	1
Annexe.....	xvi
Annexe A: Horloge uniforme	xvi

Liste des tableaux

Tableau I. Les sondes géométriques à employer pour l'estimation de chacun des paramètres classiques et les interactions qui en résultent.....	31
--	----

Liste des figures

Figure 1. La précision et l'exactitude d'une étude.....	15
Figure 2. Les outils de base de la stéréologie classique.....	20
Figure 3. Échantillonnage du poumon de manière systématique.....	24
Figure 4. Estimation du volume total d'une structure.....	25
Figure 5. Schéma d'un point et de l'aire qui y est reliée dans une grille test.....	32
Figure 6. Image d'un point.....	33
Figure 7. L'estimation du volume.....	33
Figure 8. La détermination de la densité de surface.....	35
Figure 9. Schéma représentant l'estimation des principales quantités structurales.	39
Figure 10. L' « unbiased counting frame » de Gundersen.....	40
Figure 11. Schéma démontrant l'arrangement uniforme des spécimens pour chaque cycle d'échantillonnage du « smooth fractionator ».....	45
Figure 12. Procédure de génération de sections verticales.....	50
Figure 13. Les différentes étapes de préparation des échantillons.....	52
Figure 14. Schéma décrivant les différents types de déformation d'un échantillon.	55
Figure 15. Image de la fabrication de l'Isector.....	63

Figure 16. Image du système de fixation à pression constante installé dans la hotte chimique.....	66
Figure 17. Image du poumon disséqué et prêt à la fixation.....	70
Figure 18. Image de la tubulure reliant la cruche de fixateur au poumon.....	71
Figure 19. Le poumon est recouvert de papiers absorbants durant le processus de fixation.....	73
Figure 20. Schéma du processus d'échantillonnage.....	76
Figure 21. Image de l'installation d'une tranche de poumon pour la prise de photo.	82
Figure 22. Image de la planche de plexiglas superposée sur une tranche de poumon.....	84
Figure 23. Image du poinçon à biopsie de 17 mm.....	85
Figure 24. Image du prélèvement des échantillons avec le poinçon à biopsie de 17 mm.....	85
Figure 25. Image des cylindres de poumon générés avec le poinçon à biopsie (Dimensions : 17 mm x 2,5 cm).....	86
Figure 26. Image de l'« isector » et des billes d'agar contenant chacune un spécimen pulmonaire.....	92
Figure 27. Sections verticales.....	94
Figure 28. Sections verticales.....	95

Figure 29. Algorithme représentant l'approche quantitative par stéréologie pour
l'étude du poumon.....101

Liste des abréviations

1D	<i>une dimension</i>
2D	<i>deux dimensions</i>
3D	<i>trois dimensions</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
cm	<i>centimètre</i>
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
<i>f</i>	<i>fraction</i>
FMV	<i>Faculté de médecine vétérinaire</i>
g	<i>gramme</i>
H ₂ O	<i>eau</i>
IUR	<i>isotropic uniform random</i>
kg	<i>kilogramme</i>
L	<i>litre</i>
ml	<i>millilitre</i>
mm	<i>millimètre</i>
SURS	<i>systematic uniform random sampling</i>
TGF- α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TLC	<i>total lung capacity</i>
VUR	<i>vertical uniform random</i>

Liste des symboles

°	<i>Degré</i>
---	--------------

*À ceux qui ont le courage de faire de
la recherche et d'en accepter les
obstacles et les succès,*

*À ma famille, à mes amis et à mes
collègues qui m'ont supportée tout
au long de mes questionnements.*

Remerciements

Je remercie sincèrement mon superviseur de recherche, Dr Jean-Pierre Lavoie, pour son support moral, intellectuel et professionnel tout au long de mon projet. Vous avez été pour moi un modèle important dans le domaine de la recherche mais aussi pour ma carrière en médecine vétérinaire. Votre enthousiasme et votre goût de la découverte nous inspirent tous à vouloir aller au fond des choses...et à accepter les hauts et les bas du monde de la recherche! Merci pour ces inoubliables années au sein de l'équipe du laboratoire, pour les opportunités de formation professionnelle et de voyage, et pour votre généreuse écoute !

Je remercie également Dre Mathilde Leclère pour m'avoir incluse dans son projet au début de mes études en médecine vétérinaire, de m'avoir donné le goût de la réussite et de l'excellence et d'avoir été un modèle inspirant pour ma carrière en médecine vétérinaire.

Je remercie tous les membres du laboratoire qui ont contribué à un moment ou un autre à développer et réaliser mon projet de maîtrise : Josiane Lavoie-Lefebvre, Anouk Lavoie-Lamoureux, Karine Guérin-Montpetit, Michela Bullone, Mireille Godbout, Amandine Vargas, Natalia Rodriguez, Roxane Boivin, Mylène Chevigny, Julia Dubuc et j'en oublie! Chacun de nos projets est un travail d'équipe !

Je tiens aussi à remercier les membres du Service de Pathologie de la Faculté qui m'ont grandement aidée à établir la logistique de la récolte des poumons et les membres du Service d'Histopathologie qui étaient toujours disponibles pour répondre à mes questions.

Je voudrais remercier les membres de mon Jury, Dr Daniel Jean et Dr Pierre Hélie, qui ont eu la ténacité de lire cette thèse jusqu'au bout (!) et pour leurs commentaires constructifs.

Un énorme merci à Mme Diane Rodier et à tous les membres du secrétariat pour leur aide technique et leur infinie disponibilité tout au long des mes années à la Faculté de médecine vétérinaire. Sans vous, la réalisation du programme conjoint ne serait pas possible!

Mes remerciements ne seraient pas complets sans inclure ma famille et mes amis qui ont entendu parler en long et en large de la stéréologie, et m'ont patiemment encouragée et supportée tout au long de cette aventure. Merci d'avoir été présents et patients !

Je voudrais également souligner tous les organismes subventionnaires qui ont supporté la réalisation de mon projet ainsi que la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal pour m'avoir permis d'obtenir de multiples bourses et d'ainsi réaliser ce projet.

Introduction

Une approche quantitative pour l'étude du poumon a été établie et proposée par l'American Thoracic Society (ATS) et la European Thoracic Society (ETS) en 2010. Depuis, la stéréologie est considérée la méthode de prédilection pour l'étude des relations entre la structure et la fonction pulmonaire. Elle permet l'obtention de données quantitatives sur l'ensemble de la structure pulmonaire à partir de mesures obtenues par microscopie optique sur des sections de tissu. Vu ses bases mathématiques rigoureuses, elle requière une méthodologie standardisée, sans faille et strictement appliquée. La majorité des procédures et protocoles jusqu'à maintenant ont été élaborés pour l'analyse de poumons d'espèces animales de taille petite à moyenne, tels le rat, la souris, le chien, le singe et même l'humain. L'application des principes de la stéréologie offre la possibilité de quantifier objectivement les changements pathologiques observés chez les chevaux atteints du souffle afin de corréliser les répercussions de ces changements sur la fonction pulmonaire. Pour ce faire, un protocole de fixation et d'échantillonnage, selon les directives proposées, devait être développé et les procédures établies adaptées au poumon équin.

Dans le document qui suit, vous serez introduits aux bases de la stéréologie, qui caractérisent davantage la stéréologie dite « classique ». La définition de termes importants et les principes de base seront d'abord abordés. Puis, les particularités anatomiques du poumon équin seront mises en évidence pour mettre en contexte la fixation à pression constante, qui est une des procédures de fixation recommandées dans les communiqués de l'ATS et de l'ETS. Dans un deuxième volet, un protocole de fixation via l'instillation de fixateur dans les voies respiratoires, à pression constante, ainsi qu'un protocole d'échantillonnage uniforme et aléatoire du poumon équin entier seront proposés. Finalement, les différents défis rencontrés et les problématiques à aborder dans de prochaines études seront discutés.

Revue de littérature

« Stereology adds precision to the study, but that also means that the study becomes more sensitive to « irrelevant » effects such as artifacts, differences in fixation and tissue fixation etc. Very careful planning and good control of all steps is therefore an essential prerequisite for any study in which it is intended to use stereological methods. It extends from specimen preparation to the choice of appropriate instrumentation. » [1]¹

Fixation du poumon équin entier

La fixation par instillation des voies respiratoires ou la fixation par perfusion vasculaire sous conditions contrôlées sont les deux méthodes de choix qui permettent de fixer le poumon dans des conditions se rapprochant le plus de l'état physiologique [2]. L'instillation de fixateur via les voies respiratoires à une pression constante permet de préserver le contenu des vaisseaux et de fixer adéquatement le parenchyme pulmonaire [3]. La fixation par perfusion vasculaire sur des poumons en inflation permet de conserver les structures recouvrant les voies respiratoires et les alvéoles (ex : surfactant), mais élimine le sang des vaisseaux pulmonaires [3, 4].

D'autres techniques, telles l'immersion ou l'injection intra-pulmonaire de glutaraldéhyde permettent la fixation rapide de petites parties du poumon. Cependant, elles ne préservent pas la structure tridimensionnelle des échantillons et ne permettent pas de fixer le poumon en entier, respectivement. Les spécimens de biopsies endobronchiques ou ceux obtenus par thoracoscopie peuvent être fixés par immersion ou encore via l'injection de fixateur directement dans le parenchyme pulmonaire. La congélation rapide suivie de la substitution par le gel,

¹ Cette citation de Weibel, 1979 indique que la stéréologie ajoute de la précision à l'étude, ce qui signifie également que l'étude devient davantage sensible aux effets «sans importance» tels que les artefacts, les variations dans la procédure de fixation, la fixation du tissu, etc. Employer une approche stéréologique implique donc une planification très minutieuse et une bonne maîtrise de toutes les étapes d'une étude et ce, de la préparation des échantillons jusqu'au choix d'une instrumentation appropriée.

est une méthode de fixation utilisée lorsque des techniques de génétique moléculaire et d'immunohistochimie, par exemple, doivent être appliquées sur les mêmes spécimens [3].

Le choix de la méthode de fixation et du fixateur à employer dépendra des buts de l'étude, aucune méthode de fixation n'étant parfaite. Idéalement, un fixateur et un procédé permettant une conservation optimale et homogène du tissu et de l'architecture pulmonaire sont recommandés (voir section 2.1.2) [2, 4]. En conséquence, une combinaison de plusieurs méthodes sur les deux poumons ou sur des lobes pulmonaires distincts provenant d'un même animal peut être requise pour recueillir l'ensemble des informations voulues sur la structure pulmonaire. Il n'existe à présent aucun standard universel pour la fixation du poumon, et il est donc important de documenter les limitations des techniques employées dans une étude et de les contrôler autant que possible [3].

Un protocole combinant l'utilisation du glutaraldéhyde et du formaldéhyde et permettant la préservation de la structure pulmonaire et l'antigénicité des tissus est proposé dans le consensus de l'American Thoracic Society et de la European Respiratory Society publié en 2010 [3]. Une revue pratique des différentes techniques requises selon les structures étudiées y est aussi disponible [3].

Théorie de la fixation à pression constante

La fixation par instillation de fixateur via les voies respiratoires est un procédé qui se fait à une pression constante. Cette pression doit être telle qu'elle permet une expansion maximale des voies respiratoires, et ce avant la fixation du tissu pulmonaire. Une pression hydrostatique de 20 à 25 cm d'H₂O est généralement recommandée pour l'expansion optimale du tissu pulmonaire, correspondant à presque 100% du volume du poumon frais à sa capacité pulmonaire totale (« TLC ») [3]. Cependant, tel que rapporté chez l'humain [5] ou dans une étude effectuée par Lum et al. (1985) [6] sur onze espèces de

mammifères, elle se situe davantage à une valeur de 25 cm d'H₂O. Cette pression est créée en élevant le réservoir de fixateur afin que l'interface air-liquide du contenant et l'entrée du fixateur au niveau du poumon soit à une distance égale à la valeur de pression voulue [5, 6]. Le flot doit être rapide et la tubulure utilisée la plus courte et du plus gros diamètre possible. Lorsque des poumons de grandes espèces sont fixés par instillation des voies respiratoires, la pression de départ devrait être plus élevée que 20 à 25 cm d'H₂O pour assurer une fixation homogène et rapide du tissu [3]. Le poumon est fixé à une pression constante pour un minimum de 48 heures et contrôlée en surveillant le niveau de fixateur dans le réservoir. Tel que décrit par Tomashefski [5] et Lum et al. [6], une pompe électrique est utilisée pour recycler le fixateur qui s'accumule suite aux fuites, permettant ainsi de conserver la pression durant la fixation.

Dû à la gravité, le poids de gros poumons peut amener certaines régions à collaber lors de la fixation. Le poumon devrait alors flotter sur ou être recouvert de son fixateur lors de la procédure, ou encore être placé dans un sac rempli de fixateur flottant sur un bain d'eau [3, 5, 6]. Lorsque la fixation est complète, le poumon doit également être gardé dans son fixateur, de manière à en être complètement recouvert, pour un minimum de 24 heures [2]. La pression du système suite à l'arrêt de la fixation est conservée en fermant la trachée ou la tubulure pour une période d'au moins 24 heures [3, 5]. La totalité de la procédure doit s'effectuer sous une hotte chimique vu les grandes quantités de fixateur utilisées [5].

Le degré de fixation est postulé être relié à la quantité de tissu pouvant être fixé ou non fixé. Une bonne fixation avec le glutaraldéhyde ou la formaldéhyde serait corrélée avec une plus grande quantité de collagène constituant la plèvre, les septa et le tissu interstitiel. En comparaison, les fibres d'élastine ne seraient pas facilement fixées par ces substances, ce qui amènerait un retour élastique lors du relâchement de la pression du système une fois la fixation complétée. Cette théorie

expliquerait l'importance de la conservation de la pression du système une fois le procédé de fixation complété [6].

Particularités anatomiques du poumon équin

Chez le cheval, les deux poumons ont une taille similaire, le poumon droit étant toutefois plus épais que le gauche. Ils sont reliés par une couche de tissu conjonctif, la plèvre, qui s'étend distalement à la carina. Le poumon gauche a une incisure cardiaque profonde qui permet au péricarde d'être superposé directement à la paroi thoracique de la troisième à la sixième côte, tandis qu'à droite, cet espace va seulement de la troisième à la quatrième côte. À un niveau modéré de gonflement, la limite caudale du poumon correspond à une ligne allant de la partie dorsale de la seizième côte, passant par la moitié de la onzième côte pour rejoindre la jonction costo-chondrale de la sixième côte [7].

La plèvre est divisée en deux parties : la plèvre viscérale qui enveloppe le poumon de très près et la plèvre pariétale qui est la couche la plus extérieure accolée à la paroi thoracique et au diaphragme. L'espace créé entre les deux représente la cavité pleurale et renferme une petite quantité de liquide pleural drainé par les vaisseaux lymphatiques sous-pleuraux [8]. La plèvre viscérale des grands animaux tend à être épaisse et son ampleur varie selon les régions pulmonaires. La vascularisation de la plèvre chez les espèces possédant cette dernière particularité, incluant l'humain, proviendrait de l'artère bronchique. De plus, le réseau lymphatique serait plus important que chez les plus petites espèces possédant une plèvre plus mince [9].

La plèvre pulmonaire pénètre le parenchyme pour aller diviser le poumon en lobes et lobules via la formation de septa [9]. Le poumon du cheval démontre macroscopiquement une division lobaire incomplète. Les lobes crâniaux et caudaux peuvent tout de même être différenciés par une dépression les séparant, ou en suivant le patron de division des bronches. Le lobe accessoire du poumon

droit quant à lui est distinct du reste de l'organe et presque complètement séparé des autres lobes. La lobulation du poumon du cheval est devinée depuis la surface pleurale lorsque le poumon est en expansion ou elle est observée histologiquement sur une section de tissu. Elle est toutefois difficilement délimitée, surtout sur un poumon collabé. Les lobules sont des unités pulmonaires définies par les septa qui les divisent [9]. Par contre, ces septa interlobulaires sont incomplets chez le cheval ce qui laisse supposer une ventilation collatérale [7], qui serait tout de même limitée par l'épaisseur notable du tissu conjonctif présent [9]. Les segments broncho-pulmonaires quant à eux sont des unités structurelles plus petites que les lobules et sont nommés selon la bronche qui les alimente [9].

La racine du poumon se compose de la bronche principale, des deux artères et des quatre veines pulmonaires. Ces structures entrent dans le poumon au niveau du hile. Le hile de chaque poumon n'est pas recouvert de la plèvre et ils s'accolent l'un à l'autre [7].

L'arbre respiratoire se divise en voies conductrices et en voies d'échange gazeux. Les premières correspondent à la cavité nasale, le larynx, la trachée, les bronches et les bronchioles. Les voies d'échanges gazeux sont constituées des canaux alvéolaires et des alvéoles [8]. La trachée se divise en deux bronches principales à la carina, puis celles-ci se divisent davantage à l'intérieur du poumon [7]. Chacune des bronches principales donne naissance à quatre systèmes de bronches secondaires qui vont diviser le poumon en segments broncho-pulmonaires. Les poumons gauche et droit possèdent donc les segments crânial, moyen, caudal et accessoire. Contrairement au chien, à la vache, à la chèvre et au cochon, où le segment crânial est alimenté par une bronche secondaire provenant du système latéral de bronchioles, les segments crâniens du cheval sont alimentés par un système de bronches secondaires qui origine directement des bronches principales [10]. Les voies respiratoires distales sont normalement constituées des bronchioles non-respiratoires et respiratoires, et des canaux alvéolaires. Chez le

cheval, les bronchioles respiratoires sont absentes ou très courtes. Les bronchioles non-respiratoires terminent donc directement dans les canaux alvéolaires, qui eux débouchent dans les alvéoles. Cette caractéristique du poumon équin entraîne une réduction du volume des acini par rapport aux espèces, comme l'humain, qui possèdent des bronchioles respiratoires [9]. La division des voies respiratoires est dichotomique et asymétrique chez la plupart des espèces animales étudiées jusqu'à présent [9].

Le patron de division du système artériel pulmonaire suit celui de la division des bronches et bronchioles. La paroi des bronches est nourrie par des vaisseaux bronchiques, mais tous se joignent aux veines pulmonaires responsables du retour veineux. L'innervation provient du plexus pulmonaire qui entre au niveau du hile et qui contribue à l'innervation sympathique et parasympathique du poumon. Le système lymphatique est constitué des ganglions pulmonaires qui drainent dans les ganglions trachéobronchiques situés au niveau de la carina et puis dans les ganglions médiastinaux crâniiaux [7].

La ventilation du poumon équin est relativement bien reliée à sa perfusion, malgré une perfusion plus importante de la partie ventrale due à la gravité. Un cheval d'un poids moyen de 500 kg possède une réserve d'air dans ses poumons d'environ 20 litres, ce qui correspond à environ 45% de sa capacité pulmonaire totale. À chaque respiration, il inhale en plus de 4 à 5 litres d'air. La capacité vitale d'un cheval, telle que mesurée suite au gonflement forcé des poumons, est d'environ 42 litres [8, 11].

Choix du fixateur idéal

Le choix du fixateur à utiliser dépend des objectifs d'une étude. Tel que mentionné auparavant, chacun présente ses avantages et limitations, et sera donc plus ou moins adapté à la méthodologie employée et aux structures étudiées [3].

Pour les études immunohistochimiques, la formaline 10% est un bon fixateur pourvu qu'une étape de démasquage d'antigène adéquate soit réalisée. Pour les études en microscopie électronique, et celles requérant une conservation maximale de la structure tissulaire, des coupes de tissus frais sont idéales. Sinon, il est recommandé de procéder à une fixation du tissu pulmonaire avec le glutaraldéhyde ou le fixateur de Karnofsky [5]. Le glutaraldéhyde n'est cependant pas compatible avec les études immunohistochimiques puisqu'il induit une réticulation permanente des protéines [12].

Formaldéhyde

Le formaldéhyde est la molécule de gaz présente dans une solution de formaline qui est responsable de la réaction de fixation. Il est un fixateur de la classe des aldéhydes. La formaline contient de 37-40% du gaz dans l'eau sous forme de méthyl hydrate ainsi que du méthanol comme stabilisateur. La solution obtenue doit être tamponnée pour l'amener à un pH neutre. La dépolymérisation du paraformaldéhyde amène aussi la formation d'une solution de formaldéhyde et ne requiert pas l'addition de méthanol [12].

Le formaldéhyde réagit avec différentes parties des protéines tissulaires et la fixation se fait via une réaction chimique d'addition. Des molécules d'hydroxyméthylène sont formées suite à la réaction du formaldéhyde avec les groupes fonctionnels des protéines. Des ponts méthylènes sont ensuite établis entre les protéines, ce qui stabilise leurs chaînes polypeptidiques secondaires. Les ponts méthylènes sont responsables de la réticulation des protéines et du masquage des antigènes [12]. Le formaldéhyde permet de conserver l'antigénicité d'un tissu jusqu'à un certain degré, et rend donc possible les études immunohistochimiques à condition qu'une étape de démasquage d'antigène soit réalisée [3, 12].

La fixation complète d'un tissu biologique prend jusqu'à 1 à 2 semaines à la température de la pièce. Pour les études histochimiques, une fixation de 24 à 48

heures à 4 degrés Celsius serait suffisante. Un entreposage prolongé dans le formaldéhyde peut entraîner la formation de pigments de formaline si la solution est non-tamponnée, une perte de colorabilité des noyaux cellulaires et un durcissement des tissus [12].

Le formaldéhyde ne donne pas une texture adéquate au tissu pulmonaire, puisqu'il peut causer un collapse et une distorsion de celui-ci. De plus, il ne permet pas de conserver l'ultrastructure du tissu pour la microscopie électronique [3]. Il amène également le rétrécissement des tissus alors il reste idéalement à éviter si les buts de l'étude le permettent [2].

Formaldéhyde couplé au zinc (Z-Fix©)

Le formaldéhyde additionné de zinc est constitué de formaldéhyde, d'une solution tampon et de zinc ionisé. La première étape de la fixation avec le formaldéhyde, soit l'addition de molécules d'hydroxyméthylène causant la dénaturation des protéines, a lieu, mais les antigènes restent à ce stade encore accessibles. La réticulation des protéines est évitée par l'addition subséquente d'ions zinc aux protéines modifiées, ceux-ci formant des complexes bloquant toute liaison subséquente [13]. L'antigénicité des tissus est donc mieux préservée tout en maintenant la structure cellulaire, ce qui permet l'utilisation de colorations immunohistochimiques [12]. Les membranes cellulaires et la chromatine sont également davantage stabilisées qu'avec une solution de formaldéhyde seul et le zinc potentialise la coloration avec l'hématoxyline et l'éosine. La solution est tamponnée ce qui prévient la formation de pigments de formaline avec une conservation prolongée des tissus dans le fixateur. Des précautions sont requises lorsque le formaldéhyde additionné de zinc est utilisé en laboratoire puisque le zinc est précipité par les solutions tampons de phosphate. L'antigénicité des tissus commencerait à diminuer légèrement à partir d'un mois d'entreposage dans le formaldéhyde additionné de zinc [13].

Glutaraldéhyde

L'utilisation du glutaraldéhyde permet une conservation optimale de la structure cellulaire, ce qui le rend un fixateur idéal pour la microscopie électronique [3]. Par contre, la fixation avec le glutaraldéhyde introduit des groupes aldéhydes dans les tissus qui réagissent avec les agents histochimiques, les anticorps ou certains enzymes. Les liens chimiques formés entre les protéines suite à la fixation sont beaucoup plus forts qu'avec le formaldéhyde et se forment plus rapidement. Les tissus ainsi fixés possèdent donc une texture plus ferme et sont donc plus difficilement sectionnés au microtome lorsque mis en paraffine [12]. Un de ses désavantages est la perte de l'immunoantigénicité des tissus fixés, empêchant ainsi l'emploi des techniques immunohistochimiques [3, 12].

Évaluation quantitative du poumon

Une compréhension de la relation entre la structure et la fonction du poumon est nécessaire à la physiologie comparative et expérimentale, à la pathologie et à l'étude des gènes. L'étude des changements qualitatifs et quantitatifs des structures pulmonaires permet entre autre de définir les pathologies et de caractériser les réponses aux traitements [2, 3, 14].

Les techniques de morphométrie pulmonaire classiquement utilisées engendrent 4 problèmes – ou pièges - principaux. Le premier est la production de sections tissulaires minces, de l'ordre de quelques microns d'épaisseur, qui sont des représentations en deux dimensions d'un organe tridimensionnel. La stéréologie est la seule technique disponible qui propose les outils nécessaires afin d'interpréter des observations faites sur des sections planes et de les appliquer à l'ensemble d'un organe.

Le deuxième problème concerne la petite taille des échantillons qui seront étudiés, ceux-ci représentant une fraction minimale d'un organe ou de la structure initiale. Il faut donc s'assurer que les échantillons générés seront représentatifs et

permettront de tirer des conclusions valables applicables à l'organe en entier. Ce problème met en évidence la grande importance du processus d'échantillonnage.

La préparation du spécimen à échantillonner constitue la troisième problématique. Les difficultés majeures rencontrées au niveau pulmonaire incluent un contrôle inadéquat de l'inflation lors du processus de fixation, les changements dimensionnels créés par le traitement du tissu post-fixation (ex : la mise en paraffine) et finalement, une compression possible des tissus, notamment lors de la coupe au microtome. Ces artefacts entraînent des changements dimensionnels des composantes tissulaires qui peuvent avoir des conséquences sur la quantification des structures par la stéréologie, celle-ci reposant sur des principes de géométrie.

Le dernier problème à reconnaître est relatif aux hypothèses élaborées au départ d'une étude. Des suppositions sur la taille, la grosseur, l'orientation et la forme des structures ou organes étudiés amènent des résultats biaisés et des conclusions erronées [2, 3, 14].

Une approche quantitative pour l'évaluation de la structure pulmonaire se doit d'adresser les problématiques énumérées précédemment. En réponse à cette demande, l'« American Thoracic Society » et la « European Respiratory Society » ont publié un ensemble de règles à suivre pour l'étude du poumon, basés sur les principes de la stéréologie [3].

Problématiques rencontrées en microscopie quantitative

Il est crucial d'éviter l'introduction de biais dans une étude quantitative et l'application de la stéréologie promet de les réduire autant que possible [15]. Deux étapes principales sont nécessaires afin d'élaborer un protocole d'étude quantitative : l'échantillonnage et les mesures. Les bases statistiques de l'approche stéréologique interdisent les décisions non-aléatoires à ces deux étapes, ainsi qu'à tous les autres niveaux d'une étude.

Deux sources de biais existent en microscopie quantitative : les biais d'échantillonnage et les biais systématiques, ceux-ci pouvant être davantage divisés en biais «pratiques» et en biais «théoriques» [15].

Pour l'estimation non-biaisée de quantités de structures d'intérêt, il faut employer un échantillonnage aléatoire et uniforme [15]. Tous les échantillons doivent donc avoir la même probabilité d'être choisis à partir de l'organe ou du tissu de départ [15, 16]. L'utilisation d'un patron systématique assure l'absence de biais d'échantillonnage en garantissant une sélection de spécimens de façon aléatoire et uniforme, et ce, sur l'ensemble de l'organe [15, 16]. De la même manière, les techniques de mesure doivent être aléatoires afin de prévenir l'introduction de biais systématiques à ce niveau [15]. L'emploi d'une approche stéréologique de type « design-based » repose sur ces principes et aide à réduire au maximum l'introduction de biais lors de l'échantillonnage (voir section 2.2.7) [16]. Ceux introduits par l'observateur - par exemple, l'erreur d'identification des structures à l'étude, les erreurs de comptage, etc.- sont par contre incontrôlables et doivent être pris en compte dans le rapport d'une étude [14].

Réduction en taille

Un des problèmes rencontrés en microscopie quantitative est la réduction de taille (« fraction reducing problem »). Les sections de tissu observées sur une lame microscopique proviennent d'un bloc de tissu qui a lui-même été prélevé d'un organe complet. La fraction de réduction du tissu n'a pas une relation linéaire avec l'ordre de grandeur employé pour l'observation au microscope. Cela est d'autant plus vrai lorsqu'on utilise la microscopie électronique [15]. De plus, la complexité et l'hétérogénéité de la structure pulmonaire amplifient le problème causé par la réduction de taille. En effet, la portion occupée par le parenchyme pulmonaire d'un poumon en condition d'inflation ne constitue que 7.5-10% de son volume total, la portion restante n'étant majoritairement que le volume occupé par l'air. Une très petite portion du poumon est donc accessible pour l'étude de sa

structure. Ces composantes sont distribuées inégalement sur l'ensemble de l'organe, afin de remplir les fonctions pulmonaires requises, ce qui est davantage observé en situation physiologique [2, 17].

Réduction de dimension

Pour l'étude d'un objet en trois dimensions, la coupe de cet objet en spécimens plus petits est requise, qui seront ensuite davantage coupés en échantillons pouvant être observés au microscope. L'étude d'un organe sur une section de tissu plane ou une image de cette section n'offre pas une vision appropriée des structures tridimensionnelles qu'il contient, puisque celles-ci sont maintenant bidimensionnelles. La coupe d'un tissu en microscopie amène donc une perte de dimension, et une modification des caractéristiques géométriques des structures, ce qui pose problème lors de leur évaluation quantitative au sein d'un organe [2, 16].

La précision et l'exactitude

Dans une étude, l'application de la stéréologie permet l'obtention d'un maximum d'exactitude et d'une précision acceptable ajustée selon les besoins, et tout cela avec une efficacité optimale. Selon les principes mathématiques sur lesquels cette méthode repose, la précision et surtout l'exactitude constituent deux caractéristiques essentielles à l'obtention d'une étude valable et robuste [15].

L'exactitude des données d'une étude signifie l'absence de biais. Elle ne peut être observée à partir de données finales, ni être ajustée au besoin. Elle découle directement de la méthodologie employée, qui doit être non-biaisée. La précision dépend de la variabilité existante dans une étude, tant au niveau des sujets inclus que des mesures effectuées sur la lame de microscope. Une fois la variabilité déterminée à l'aide du calcul de la variance, la précision peut être ajustée en augmentant le nombre de sujets, de blocs de tissus, de mesures, etc.

Une approche biaisée peut procurer des valeurs qui ont très peu de variabilité, qualifiées alors de « précises », mais qui ne sont pas représentatives de la réalité, et donc inexactes. Leur observation seule ne peut indiquer leur degré d'exactitude; la seule évidence alors est la présence ou l'absence de précision dans l'étude, calculées en terme de variance. Le scénario plus souhaitable est l'obtention de données exactes, suite à l'emploi de méthodes non-biaisées, et dont la précision peut être améliorée en augmentant le nombre d'échantillons de l'étude (voir figure 1) [18]. Les bases de la stéréologie dictent que l'absence de biais nécessite l'application rigoureuse d'une méthodologie elle-même non-biaisée et libre de suppositions, à tous les niveaux d'une étude scientifique.

La stéréologie s'attarde à l'échantillonnage en un premier temps, puis aux mesures effectuées sur les spécimens en un deuxième temps. Son efficacité se traduit par un maximum de précision obtenue avec le moins d'effort possible, selon le principe évoqué par Gundersen et Osterby en 1981 [19] « Do more, less well », qui sera expliqué subséquemment.

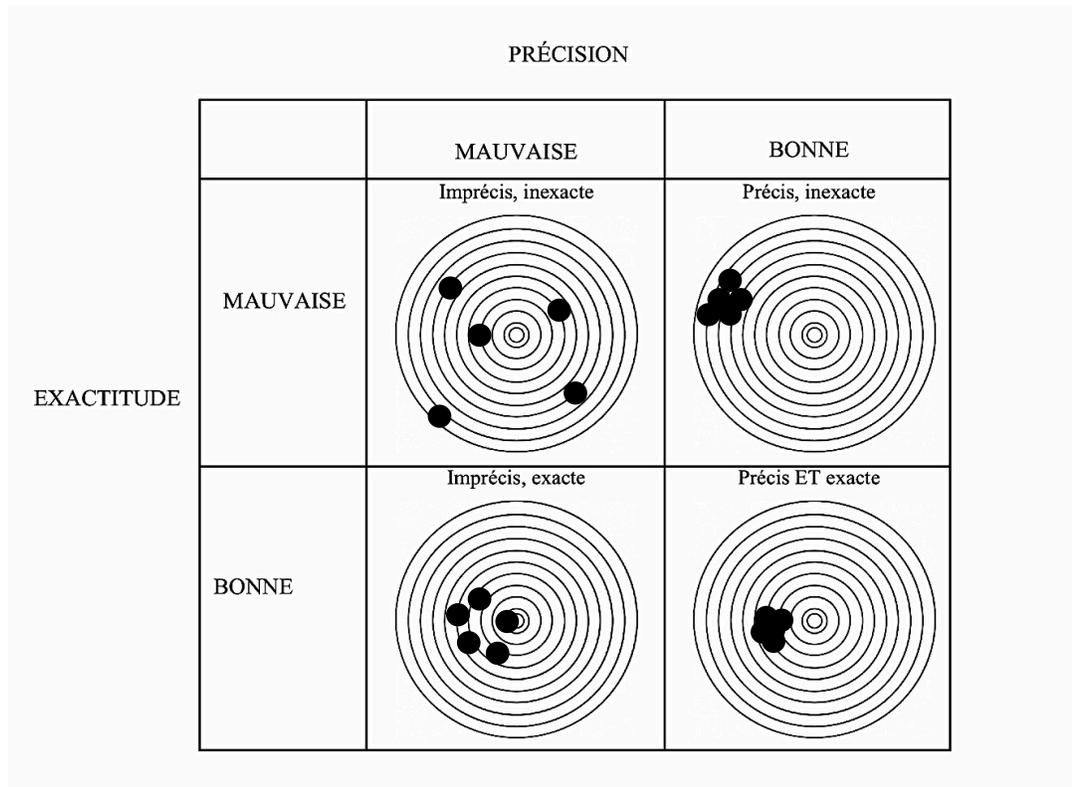


Figure 1. La précision et l'exactitude d'une étude.

Variance dans une étude biologique

La variance est une partie intégrante d'une étude biologique et doit être identifiée, idéalement mesurée, puis ajustée au besoin [19]. Définie en termes mathématiques, la variance de l'estimateur d'un paramètre stéréologique est égale à la moyenne de l'écart-type de sa distribution au carré. La variance représente donc une mesure de la dispersion des valeurs de l'estimateur autour de la moyenne [20].

La variance provient majoritairement de la variation entre les individus, dite la variance « biologique » ou « signal », et de la variation entre les spécimens prélevés, dite la variance « d'échantillonnage » ou « noise » [3]. La variance d'échantillonnage est la variance de l'estimateur utilisé pour la quantification d'une structure et donc, elle découle de la méthode stéréologique employée. Dans

une étude, la somme de la variance biologique et de la variance d'échantillonnage constitue la variance observée d'un estimateur stéréologique [14]. La variance biologique contribue pour environ 70% de la variation totale d'une étude et il est possible de la déduire en connaissant la valeur de la variance d'échantillonnage [15].

L'efficacité statistique d'un paramètre morphométrique est exprimée par la formule suivante :

$$CV^2 (\text{observée}) = CV^2 (\text{biologique}) + CE^2 (\text{méthode})$$

Où CV^2 (observée) est la variation totale observée dans une étude biologique exprimée en coefficient de variation, CV^2 (biologique) représente le coefficient de variation biologique qui est une valeur inconnue, et CE^2 (méthode) est le coefficient d'erreur introduit par la méthode stéréologique. Tel que mentionné précédemment, la variation introduite par la méthode ne devrait jamais excéder la variation biologique d'une étude [3, 14].

$$CE^2 (\text{méthode}) \leq \frac{1}{2} CV^2 (\text{biologique})$$

L'expression reconnue de Gundersen et Osterby, «Do more, less well», indique où devraient être mis les efforts pour réduire la variabilité dans une étude scientifique, rendant du même coup la génération de données efficace [19]. La variation biologique ayant la plus grande importance, l'effort doit être concentré à obtenir plus d'animaux ou de spécimens, plutôt que d'échantillonner davantage de champs microscopiques ou d'effectuer un plus grand nombre de mesures. La précision des estimations d'une étude stéréologique atteint donc son maximum avec le moins de travail possible. La règle d'or qui s'ensuit est que le comptage de 100 à 200 intersections entre la sonde et la structure mesurée, sur 50 champs microscopiques sélectionnés au hasard et systématiquement, provenant d'environ 10 blocs de paraffine ou spécimens par animal, serait suffisant pour obtenir des résultats précis et statistiquement significatifs [19]. Une démonstration de cette

règle pour le comptage optimal de points sur des profils de forme arbitraire est faite à l'aide d'un nomogramme par Gundersen and Jensen [21]. La règle reste la même pour les estimateurs de ratio couramment utilisés en stéréologie- Volume par unité de volume (V_v), surface par unité de volume (S_v), longueur par unité de volume (L_v), et nombre par unité de volume (N_v ou « Disector ») – et ce, indépendamment de la complexité de la structure à l'étude.

Définition de la stéréologie

L'évolution de la stéréologie

La stéréologie découle de principes géométriques qui furent élaborés au dix-neuvième siècle. Cette science fut employée d'abord en géologie, pour l'étude de la composition des sols puis, au cours des années, développée et étendue à plusieurs domaines employant la microscopie, telle la biologie [22].

L'origine de la stéréologie remonte probablement au géologue français Delesse, qui en 1847 proposa une méthode d'estimation du volume fractionnel de certains minéraux à partir d'une section microscopique d'une roche. Le principe de Buffon introduit plusieurs années plus tard démontre bien les fondements de la stéréologie. Il avait alors établi la relation de probabilité découlant de l'intersection d'une aiguille d'une longueur connue positionnée au hasard sur une grille de lignes (« Buffon's needle problem », 1977). Un système de référence, représenté par la grille, permettait de déterminer la caractéristique géométrique d'un objet, représenté par l'aiguille, via la probabilité de leur interaction. Cette théorie est à la base de l'utilisation d'un système de référence, contenant des sondes géométriques, pour la caractérisation des paramètres géométriques (volume, aire, longueur, nombre) des structures [22].

L'introduction des premiers principes venait entre autre de la nécessité à surmonter le principal problème engendré en microscopie : l'action de couper un

objet pour obtenir une section plane, infiniment plus petite, et contenant des informations structurelles altérées [22].

Définition

La stéréologie consiste en un ensemble de règles et méthodes mathématiques, qui permettent de retirer des caractéristiques géométriques et structurelles d'une réalité tridimensionnelle - en biologie un organisme, un organe ou un compartiment tissulaire - à partir de mesures quantitatives obtenues sur une section plane - l'échantillon - bidimensionnelle. Ses bases de géométrie statistique la font ressembler à l'épidémiologie et nécessitent des approches d'échantillonnage spécifiques, comparables à la méthodologie employée pour obtenir des échantillons représentatifs d'une population [1, 15].

La stéréologie englobe de par sa définition la morphométrie, puisqu'elle permet d'obtenir des mesures quantitatives en microscopie qui peuvent être ensuite rapportées à l'espace spatial en trois dimensions. La morphométrie quant à elle signifie la mesure de la forme d'une structure, par exemple le volume, la surface et la longueur, en employant une méthode précise sur une section plane ou sur une image de cette section. Par contre, cette technique, lorsqu'effectuée avec des méthodes autres que la stéréologie, ne permet pas de lier ces informations à un organe ou un compartiment tissulaire en son entier [18].

La stéréologie est donc a priori une approche non-biaisée, entre autre puisqu'elle repose sur des principes mathématiques de géométrie statistique, l'emploi de procédures rigoureuses d'échantillonnage et d'outils de mesure non-biaisés [23].

Tel que mentionné précédemment, cette approche est utilisée pour définir des paramètres structurels d'intérêt : volume, surface, longueur, et nombre. Ce sont des quantités «géométriques», provenant de structures tridimensionnelles coupées en sections planes plus petites, qui sont déterminées à l'aide d'un

ensemble de sondes géométriques. La manière d'effectuer ces mesures repose sur une ou des «questions géométriques» que l'on pose en appliquant des grilles de sondes géométriques sur les spécimens à l'étude (voir figure 2).

La stéréologie se divise en stéréologie classique appelée « First-order stereology » et en stéréologie moderne qui englobe la stéréologie dite « design-based » et la « Second-order stereology » [15, 16, 24].

La stéréologie classique est l'approche qui nous permet de tirer des conclusions sur les propriétés géométriques tridimensionnelles à partir de mesures effectuées sur des images en deux dimensions [15, 16]. Les images sont obtenues par la coupe aléatoire d'un objet en des sections ou plans. Un champ d'analyse est sélectionné à partir de cette image et des sondes géométriques y sont appliquées, toujours au hasard. Chaque sonde - point, ligne, plan, volume - permettront d'obtenir différentes informations géométriques de l'image. L'interaction de ces sondes avec les caractéristiques de l'image crée des événements qui sont comptés. Ces quantités sont exprimées en terme de ratios ou densités, et rapportées en quantités absolues si le volume de référence de l'organe ou du sous-compartiment tissulaire est mesuré [16]. Ces premières règles stéréologiques supposaient une composition uniforme et aléatoire des structures, ce qui pouvait engendrer un biais lors de l'évaluation de structures hétérogènes ou ayant une orientation préférentielle dans l'espace. Les outils nécessaires à la détermination de certains paramètres, tels l'estimation de la taille moyenne de particules ou l'estimation du nombre moyen de particules, deux paramètres utiles afin de différencier l'hypertrophie de l'hyperplasie cellulaire par exemple, n'étaient pas encore disponibles [25].

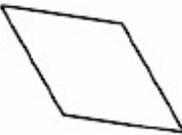
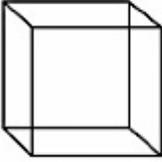
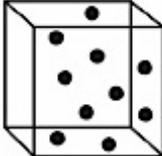
 Point (0D)	 Line (1D)	 Plane (2D)	 Volume (3D)
 Volume (3D)	 Surface (2D)	 Length (1D)	 Number (0D)
 Volume (3D)	 Surface (2D)	 Length (1D)	 Number (0D)

Figure 2. Les outils de base de la stéréologie classique : La première rangée représente les sondes géométriques (point, ligne, plan et volume) qui font intersection avec les quantités d'intérêt (volume, surface, longueur et nombre respectivement) pour créer des événements qui seront comptés et rapportés en ratios ou densités par rapport au volume de l'espace de référence. *Modifié de Hyde et al., 2007 [26].*

Une approche de type « design-based »

L'avantage de la stéréologie moderne est qu'elle ne requiert pas de présuppositions notamment quant à la forme, la grosseur, et l'orientation spatiale des structures comprises dans un espace tridimensionnel [2].

La stéréologie que l'on nomme « design-based » combine les bases de la stéréologie classique aux avancées récentes en morphologie quantitative. Elle a pour objectif une approche d'échantillonnage qui permet d'assurer l'uniformité des échantillons via une approche systématique tout en conservant leur qualité totalement aléatoire. Un échantillonnage systématique, aléatoire et uniforme évite les biais introduits par la méthodologie et assure que les échantillons seront

réellement représentatifs de l'organe à l'étude. Ainsi, toutes les étapes du traitement d'un organe ou de ses sous-compartiments, de l'échantillonnage jusqu'à l'acquisition de données quantitatives au niveau microscopique, reposent sur les exigences d'un design isotropique (directions aléatoires), uniforme, aléatoire et systématique. Les estimations stéréologiques résultantes sont ainsi assurément non biaisées [16]. Les avancées de la stéréologie au cours des années ont donné lieu entre autre à l'invention d'outils tels la section verticale [27], l'« orientator » [28] et l'« isector » [29], qui permettent d'assurer l'isotropie, même pour des structures possédant une certaine orientation (ex : cellules musculaires, capillaires, voies respiratoires). Un autre objectif de cette approche est d'effectuer un minimum de comptages microscopiques tout en conservant des données avec un maximum de précision et de validité, un principe introduit par Gundersen et Osterby en 1981 [19].

Une règle existe en stéréologie : « Toutes les questions, données et interprétations doivent être reliées à l'espace tridimensionnel du monde biologique. » [16] L'application rigoureuse de la stéréologie dite « design-based » sur des échantillons représentatifs, sélectionnés selon un protocole tenant compte de la hiérarchie structurelle du poumon, permet de répondre à ces exigences.

L'importance du volume de référence

« Reference trap »

« Never, ever not measure the reference space »² est une citation de Gundersen qui met l'accent sur l'importance de mesurer le volume de référence en stéréologie [26]. En stéréologie, l'interaction d'une sonde géométrique avec un paramètre structurel d'intérêt crée un évènement qui s'exprime en terme de ratio ou densité (voir section 2.2.5.2). Le dénominateur de ce ratio représente

² Traduction française libre: « Ne jamais éviter de mesurer l'espace de référence ».

habituellement l'espace de référence dans lequel une quantité a été estimée, aussi appelé le « système de référence ». Ce système de référence constitue la portion du volume total de l'organe étudié, sur une section de tissu [30].

Le volume de référence correspond au volume total d'un organe ou d'un sous-compartiment. Il doit être connu pour rapporter les densités estimées en valeurs absolues [3]. L'erreur à ne pas commettre est d'interpréter les densités obtenues sur un échantillon sans les rapporter au volume de référence. Le volume d'un organe, tel le poumon, peut rétrécir ou augmenter dans certaines conditions pathologiques par exemple, ou encore entre des animaux d'âges différents. Un tel phénomène est décrit dans une étude par Hyde et al. effectuée sur des souris transgéniques exprimant le TGF- α , dont le développement anormal du poumon amène une réduction du volume pulmonaire total [26].

Si l'espace de référence n'est pas pris en compte, des paramètres stéréologiques primaires tel un nombre de cellules par unité de volume, seront sur- ou sous-estimés chez certains individus, ce qu'on appelle la « reference trap ».

Estimation du volume total du poumon

Méthode de Cavalieri

La méthode de Cavalieri est un estimateur non-biaisé et systématique du volume pulmonaire total. Elle permet également d'estimer le volume de tout sous-compartiment pulmonaire qui peut être divisé en des sections d'une épaisseur constante, un avantage évident sur la mesure du volume par déplacement d'eau [16, 31].

Le principe de base introduit par le mathématicien italien Bonaventura Cavalieri (1598-1647) dicte que le volume d'un objet de forme arbitraire, coupé par un plan à une position aléatoire, sera égal à l'aire de la section coupée multipliée par la hauteur de l'objet. Cette estimation est non-biaisée puisqu'il a été mathématiquement démontré que l'aire de n'importe quelle section, prise au

hasard, lorsque multipliée par la hauteur d'un objet, égalera toujours une estimation représentative de son volume total [21]. Selon cette théorie, le volume total du poumon peut être estimé en additionnant l'aire d'un nombre n de ses sections (ou tranches) prises au hasard le long d'un axe de coupe déterminé.

Le poumon ou sous-compartiment pulmonaire est coupé exhaustivement en des tranches d'une épaisseur T et parallèles les unes aux autres (voir figure 3). Afin d'augmenter l'efficacité de la procédure, une approche systématique est requise avec laquelle les sections ne seront plus indépendantes les unes des autres. La première tranche coupée doit l'être à une position k aléatoire dans l'intervalle de longueur T . Chaque section suivante sera prise à un intervalle $k+T$, $k+2T$, $k+3T$, etc. [21, 31]. Par la suite, l'aire de chaque tranche est estimée en appliquant une grille de points au hasard sur le tissu et en comptant tous les points touchant la surface de la tranche. La formule suivante est appliquée pour obtenir l'estimation du volume pulmonaire total.

$$V(lu) = \Sigma P(lu) \times A(\text{point}) \times k \times T (\text{intervalle})$$

Où $V(lu)$ est l'estimation du volume total du poumon, $\Sigma P(lu)$ est le compte total des points qui tombent sur la surface pulmonaire, $A(\text{point})$ constitue l'aire par point de la grille test (voir section 2.2.6.1), k représente la $k^{\text{ième}}$ tranche échantillonnée et T (intervalle) est l'épaisseur moyenne des tranches [16].

Dans une situation où un nombre plus grand de sections ou des sections plus minces sont plus avantageuses, le volume total d'un objet peut être estimé par une fraction $1/f$ du nombre total de sections prises de façon systématique. La première section est alors sélectionnée au hasard à l'aide d'une table de chiffres aléatoires dans l'intervalle de 1 à f .

L'estimation du volume total d'un organe de forme arbitraire par la méthode de Cavalieri est complètement indépendante de sa forme et de l'orientation de la coupe. La coupe des tranches est facilement intégrée dans un protocole d'échantillonnage systématique, uniforme et aléatoire (voir section 3). De plus, la méthode est efficace puisqu'elle se base sur le principe qu'un total de 100-200 points comptés sur la surface de 10 à 15 tranches permet d'obtenir une estimation non biaisée du volume total d'un organe de forme irrégulière, tel le poumon [32]. La précision espérée en suivant une telle règle peut atteindre 5% ou moins [21]. Cette méthode permet aussi d'estimer le volume total d'un organe ou d'un de ses sous-compartiments localisé dans un autre tissu. Avec les méthodes d'imagerie avancée, la détermination du volume total du poumon peut être facilement effectuée, sans nécessiter la coupe du poumon en entier [32].

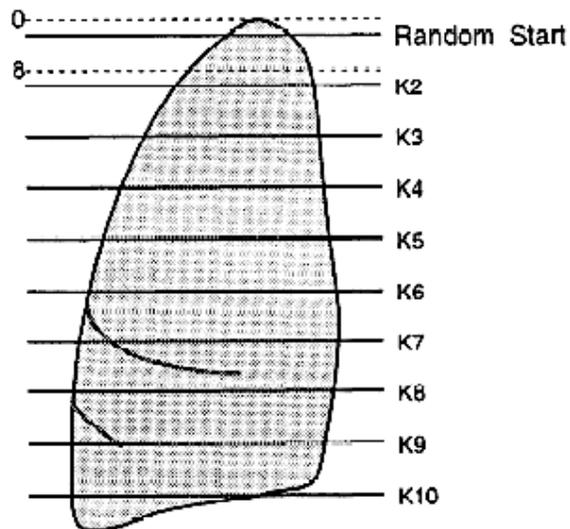


Figure 3. Échantillonnage du poumon de manière systématique : Le poumon est coupé en tranches parallèles d'épaisseur égale, à intervalle fixe (K), empêchant ainsi l'introduction de biais. Un départ aléatoire est choisi dans l'intervalle $0-K$ et détermine la position de la première coupe ($K1$). Les coupes subséquentes seront faites au même intervalle, générant ici dix tranches ($K1-K10$). Ce type d'échantillonnage est systématique et caractérise la stéréologie dite « design-based ». *Modifié de Bolender et al., 1993 [16].*

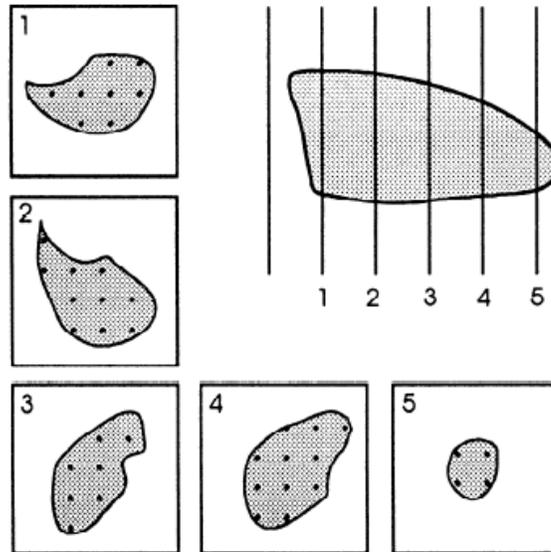


Figure 4. Estimation du volume total d'une structure : Représentation schématique des étapes de la méthode de Cavalieri. Le poumon peut être d'abord enrobé dans de l'agar. Il est ensuite systématiquement coupé en tranche d'épaisseur égale, utilisant un départ aléatoire. Une grille de points est appliquée de manière aléatoire sur chacune des tranches afin d'estimer leur aire respective, ce qui permettra ensuite de calculer le volume total du poumon. *Modifié de Bolender et al., 1993 [16].*

Mesure du coefficient de variation de l'estimateur de Cavalieri

Le coefficient de variation de l'estimateur de Cavalieri peut être divisé, tout comme la variation globale d'une étude, en variation biologique et en variation due à la méthode stéréologique d'échantillonnage. Tel que mentionné précédemment, la variation biologique constitue la plus grande portion de la variation totale. Dans une étude par Michel et Cruz-Orive [31], la variation biologique de l'estimateur de Cavalieri pour la mesure du volume pulmonaire de quatre poumons de rat était égale à 94.6% de la variation totale. La variation due à la méthode stéréologique (CE(méthode)) peut être subdivisée en variation due à la coupe systématique des tranches dans une direction donnée (VarSURS (Σ aire)), et

en variation due à la technique de comptage de points (« Noise effect »). La variation due à l'échantillonnage ne représente qu'une portion faible de la variation totale, tel que rapporté dans la même étude [31].

La formule de la variation due à la coupe systématique des tranches est exprimée ainsi :

$$\text{VarSURS } (\Sigma\text{aire}) = (3(A\text{-Noise}) - 4B + C)/240 \quad [33]$$

Où chacune des lettres (A, B, C) représente le calcul du coefficient d'erreur de l'estimateur de volume pour différentes séries de tranches et le nombre 240 est une constante reliée à la forme de l'objet.

La formule de la variation introduite par le comptage de points est la suivante :

$$\text{« Noise effect »} = 0.0724 \cdot (b/\sqrt{a}) \cdot \sqrt{(n \cdot \Sigma P)} \quad [33]$$

La variation totale de l'estimateur de Cavalieri due à l'échantillonnage

(CE (méthode)) peut alors être formulée comme tel :

$$\text{Variance totale de } \Sigma P = \text{Noise} + \text{VarSURS } (\Sigma\text{aire}) \quad [33]$$

Le coefficient d'erreur d'une estimation effectuée à l'aide d'échantillons aléatoires et uniformes, peut être exprimé selon la formule suivante :

$$CE_n = CV/\sqrt{n}$$

Où CE_n exprime le coefficient d'erreur d'un nombre n d'observations, CV est le coefficient de variation entre les observations, et n est le nombre d'observations indépendantes effectuées. Cette formule implique que les surfaces de chacune des tranches de poumon sont indépendantes les unes des autres. Dans le cas de l'estimateur de Cavalieri, les tranches sont sélectionnées de manière systématique et cette indépendance entre les observations est perdue. Le coefficient d'erreur de l'estimateur de volume est alors déterminé en prenant toutes les combinaisons possibles d'une série de sections prises systématiquement à égale distance l'une de l'autre, pour estimer à répétition le volume total de

l'objet et la variation entre les estimations [21]. La formule pour le calcul du coefficient d'erreur (l'erreur-type divisée par le volume) de l'estimateur de volume devient alors :

$$CE_n ([v]) = \sqrt{\text{variance totale} / \Sigma P} \quad [33]$$

La nature systématique de l'estimateur de volume de Cavalieri le rend un outil efficace. Tel que démontré par Gundersen et al. [21], la méthode de Cavalieri permet de conserver un coefficient d'erreur de moins de 5%, même pour des objets de formes irrégulières, avec un nombre approximatif de 10 tranches ou moins sélectionnées systématiquement. Si le coefficient d'erreur d'une étude en particulier doit être inférieur à 5%, alors il est possible d'augmenter le nombre de sections pour diminuer sa valeur (puisque CE_n est directement proportionnel à n).

Méthode par déplacement d'eau

Selon la méthode d'estimation du volume par déplacement d'eau, le volume total du poumon est déterminé en submergeant le poumon ou le sous-compartiment pulmonaire dans un grand contenant de saline ou d'eau. La différence de volume après la submersion de l'organe est ensuite pesée. Le poids additionnel après submersion est égal au déplacement du volume de liquide dans le contenant, une valeur qui correspond au volume pulmonaire [1]. Une des failles de cette méthode est l'estimation du volume d'un organe contenant des cavités, par exemple des vaisseaux sanguins ou des voies respiratoires exposées, qui peuvent amener une sous-estimation de la valeur du volume total. De plus, la densité du liquide doit idéalement être égale à 1:00 pour résulter en une mesure exacte [31].

Outils de mesure en stéréologie

À l'aide des outils stéréologiques, des quantités sont estimées sur un groupe d'échantillons obtenus de manière à ce qu'ils représentent adéquatement l'organe de départ. Chaque section de tissu qui est observée au microscope constitue donc un échantillon statistique, avec toutes les caractéristiques qui s'y

rapportent [30]. Les paramètres stéréologiques sont estimés à l'aide de sondes, qui font interaction avec les structures étudiées sur la section histologique ou sur son image. Ces sondes sont habituellement disposées dans une grille que l'on appelle un « système test », qui sera positionnée aléatoirement sur la coupe de tissu. Les interactions créées sont dénombrées et les valeurs sont introduites dans des formules mathématiques pour obtenir, par exemple, des estimations non-biaisées de volume, de surface, de longueur ou de nombre. On estime donc des quantités géométriques tridimensionnelles en utilisant des sondes géométriques, que l'on applique sur une section de tissu bidimensionnelle, et qui entrent en relation avec les caractéristiques géométriques du tissu à l'étude [15, 34].

Sondes géométriques

Une fois les échantillons sélectionnés de manière aléatoire, uniforme et systématique à partir du poumon, les paramètres stéréologiques d'intérêt sont quantifiés à l'aide d'une grille de sondes géométriques. Le paramètre à l'étude déterminera la sonde à employer. L'interaction de la sonde et de la section de tissu ou de son image produit un évènement qui peut être compté (voir figure 2). Chacune des relations entre la sonde et la structure à caractériser doit être telle que le total des dimensions entre la sonde et le paramètre à quantifier égale trois dimensions (voir tableau 2 de la section 2.2.6) [15]. Les sondes géométriques classiques en stéréologie sont le point, la ligne, le plan et le volume [16], mais plusieurs autres outils sont maintenant disponibles, offrant maintes possibilités dans la quantification des structures. Les sondes doivent être positionnées de manière uniforme et aléatoire sur la section [15] et être indépendantes de la structure à étudier [30]. Les sondes linéaires et planaires possèdent une orientation dans l'espace, tout comme les paramètres qu'elles mesurent, soient la surface et la longueur respectivement [16]. Des stratégies spécifiques doivent donc être employées pour les rendre uniformes et complètement aléatoires par rapport au tissu (voir section 2.2.7.2).

Les sondes sont regroupées en « grille test » aussi appelées « système test cohérent ». Dans un système test cohérent, les sondes sont réparties de manière à être aléatoires dans l'espace. Elles sont également disposées entre elles selon une relation géométrique prédéfinie, qui aide à déterminer un paramètre géométrique, une fois qu'elles interagissent avec la structure d'intérêt [26].

Ratios et densités

Classiquement en stéréologie, les informations géométriques de base obtenues suite à l'interaction d'une sonde avec la ou les caractéristiques d'un tissu étudié peuvent être un nombre, une longueur, une aire ou un volume. Tous ces paramètres stéréologiques constituent en réalité des mesures relatives, c'est-à-dire des ratios ou densités. L'élément composant une structure (ex : cellule, membrane, vaisseau, etc.) est typiquement estimé en relation avec son « espace de référence » (ex : parenchyme, septum interalvéolaire, sous-compartiment tissulaire, etc.), représentant respectivement le numérateur et le dénominateur d'un ratio stéréologique [30]. Les paramètres stéréologiques de base, exprimés par rapport à des unités de volume, deviennent donc la fraction de volume (V_v) ou un volume par unité de volume, la densité de surface (S_v) ou la surface par unité de volume, la densité de longueur (L_v) ou la longueur par unité de volume, et la densité de nombre (N_v) ou le nombre par unité de volume [34]. Les densités sont exprimées à l'aide de symboles désignant le compartiment d'intérêt « *i* » par rapport au compartiment de référence « *ref* » (ex: $V_v(i,ref)$) [26]. Ces densités représentent les estimateurs principaux de la stéréologie dite classique.

Pour éviter de tomber dans le piège de la « reference trap », ces densités sont normalisées avec un volume de référence. Les ratios stéréologiques ne peuvent nous informer sur les changements structurels au sein d'un organe s'ils sont analysés comme tels. Ils doivent être rapportés à la structure biologique de départ [34] (voir section 2.2.4.1). Idéalement, le volume de référence représente le volume total de l'organe étudié, mais dans certaines situations (ex : biopsies

pulmonaires ou endobronchiques) seul le volume d'un sous-compartiment tissulaire est disponible. Les équations stéréologiques permettent par la suite de relier les densités mesurées sur les sections de tissu aux ratios correspondants de la structure tridimensionnelle [16, 30].

La valeur totale des estimations obtenues est donc calculée en reliant les densités au volume total de l'organe, tel que mesuré avec la méthode de Cavalieri. Les équations stéréologiques de base employées ne font aucune supposition quant à la forme de l'objet tridimensionnel étudié. Les relations stéréologiques présument : 1) que la structure étudiée est uniformément distribuée dans l'espace, et 2) que la structure étudiée est distribuée de manière aléatoire dans l'espace. Un biais est introduit lorsque ces deux conditions ne sont pas respectées, résultant en des données non-valides et éloignées de la vraie valeur d'un paramètre [16].

Estimation des paramètres géométriques

Tout organe peut être comparé à un objet dans l'espace, ayant une architecture en trois dimensions et composé d'un certain nombre d'éléments structurels. Ces structures possèdent des caractéristiques géométriques qu'il est possible de quantifier avec la stéréologie. Les estimateurs stéréologiques dits « classiques » sont le volume, la section plane, la ligne et le nombre qui permettent d'estimer un nombre, une longueur, une aire et un volume respectivement (voir figure 2 et section 2.2.5.1). Ces estimateurs sont appelés « sondes géométriques » et sont appliqués à une section plane de tissu pour estimer quantitativement une structure d'intérêt. En répétant le procédé d'appliquer au hasard et de manière systématique une grille test contenant la sonde géométrique appropriée, une série d'estimation du paramètre à quantifier est obtenue. La moyenne de toutes ces données sera très représentative de la valeur réelle du paramètre, à condition que l'échantillonnage et l'estimation soient faits de manière aléatoire et uniforme [15].

PARAMÈTRES À ESTIMER	SONDES GÉOMÉTRIQUES	INTÉRACTIONS
Volume (3D)	Point (0D)	Un point repose dans un volume
Surface (2D)	Ligne (1D)	Une ligne intercepte une surface
Longueur (1D)	Plan (2D)	Un plan traverse une ligne
Nombre (0D)	Volume (3D)	Un « Disector » ou volume contient une particule (nombre)

Tableau I. Les sondes géométriques à employer pour l'estimation de chacun des paramètres classiques et les interactions qui en résultent.

Volume

Le volume est un paramètre géométrique par définition en trois dimensions (3D). Afin de l'estimer, il faut employer une sonde géométrique n'ayant pas de dimension, tel un point (0D) (voir section 2.2.5.1). Une densité de volume (V_v) peut être estimée en comptant le nombre de points d'une grille test qui se superposent à la structure étudiée par rapport à l'espace de référence [1].

$$V_v(Y, ref) = \frac{\text{Volume d'un élément structurel } (Y)}{\text{Volume de l'espace de référence } (ref)} \quad [15]$$

Le volume total d'une structure peut ensuite être déterminé en multipliant la densité de volume obtenue par le volume total de l'organe étudié (ex : le poumon).

$$V(Y) = V(ref) \cdot V_v(Y, ref) \quad [15]$$

Le meilleur exemple est la méthode de Cavalieri décrite précédemment, selon laquelle un objet ou organe est sectionné exhaustivement pour déterminer son volume total (voir section 2.2.4.2.1). Une grille de points est alors appliquée sur la surface de chacune des tranches, afin d'estimer leur aire totale. Chaque point de la grille est associé à son aire propre, constante pour tous les points, ce qui permet l'estimation d'une surface en insérant le compte des points dans la formule mathématique adéquate (voir figure 5). Le nombre de points coïncidant avec la structure étudiée est donc également un estimateur de la surface de son profil sur la section [1]. Le comptage total des points pour chaque tranche, multiplié par leur épaisseur moyenne, permet d'estimer le volume de cet objet [15].

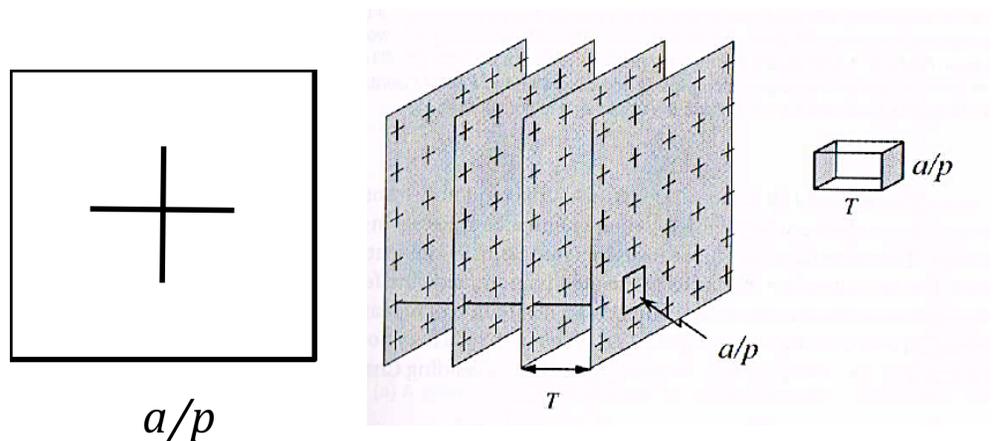


Figure 5. Schéma d'un point et de l'aire qui y est reliée dans une grille test : a/p = l'aire par point. La deuxième figure est tirée de Howard & Reed, 2010 [15].

Le point constitue une croix formée par deux lignes parfaitement perpendiculaires. Une règle de comptage doit être établie, car la croix n'est pas parfaitement unidimensionnelle. Un des coins de cette croix servira donc de point de référence pour effectuer le comptage, à condition qu'il coïncide avec la structure d'intérêt (voir figure 6) [15].

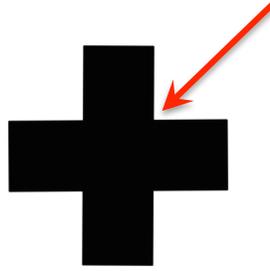


Figure 6. Image d'un point : Le point est représenté par une croix. Une règle doit être déterminée pour décider quel coin de la croix servira à compter. Ici, la flèche indique le coin utilisé par convention dans la plupart des études.

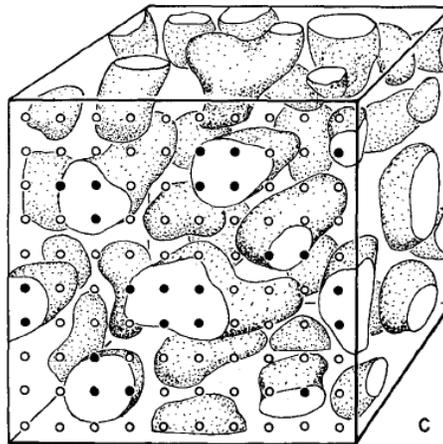


Figure 7. L'estimation du volume : Elle est effectuée en comptant les points correspondant à la structure étudiée par rapport aux points tombant sur l'espace de référence. Le nombre de points qui est contenu dans un volume est indépendant de la forme ou de l'orientation de l'objet. *Modifié de Weibel et al., 1966 [35].*

Surface

Chaque section provenant d'un organe a deux dimensions et contient des *profils* (Q_A) des structures constituant le tissu étudié. Ces profils possèdent chacun une aire, appelée *aire du profil* (A_A). Les aires des profils varient selon la forme de ces structures et selon l'endroit où chacune d'elles a été coupée par la section. Par conséquent, le nombre de profils obtenus ou l'importance de l'aire des profils sur une section sont tous deux dépendants de l'orientation de la structure d'intérêt dans l'espace. Par exemple, un vaisseau sanguin ou une voie respiratoire linéaire a une aire interne variable selon l'angle dans lequel il est sectionné - perpendiculairement ou longitudinalement - par rapport à son axe long. De plus, un vaisseau ou une voie respiratoire recourbé peut apparaître comme deux profils sur certaines sections, une particularité qui sera importante à considérer pour le dénombrement de structures.

La sonde géométrique utilisée pour l'estimation d'une surface (2D) est la ligne (1D), créant un nombre d'intersections proportionnelles à l'étendue de l'aire du profil sur la coupe histologique (voir la figure 8). La relation mathématique permettant d'obtenir une estimation de la surface (S_V) à partir du nombre d'intersections (I) de la grille de lignes (L) avec une structure est la suivante :

$$S_V = 2 \cdot I_L \quad [15]$$

Le paramètre stéréologique correspondant est la densité de surface (S_V) qui représente l'aire du profil de l'élément structurel étudié par unité de volume de l'espace de référence.

$$S_V(Y, ref) = \frac{\text{Aire de la structure } Y \text{ dans l'espace de référence}}{\text{Volume de l'espace de référence}} \quad [15]$$

Volume de l'espace de référence

L'estimation de la surface totale d'une structure S (Y) peut ensuite être obtenue en multipliant la densité de surface par le volume total (V) de l'organe ou du sous-compartiment tissulaire de référence.

$$S(Y) = V \cdot S_v(Y, ref) \quad [15]$$

L'estimation de la surface est dépendante de l'orientation de la sonde et de l'échantillon, tout comme l'estimation de la longueur [26]. Par conséquent, les échantillons ou la sonde, ou leur combinaison, doivent être aléatoires dans leur orientation en trois dimensions. Les relations mathématiques énumérées ci-dessus ne sont valables que si cette condition est remplie [15]. Différentes stratégies sont employées pour l'estimation de la surface et de la longueur des structures anisotropiques (voir sections 2.2.7.2).

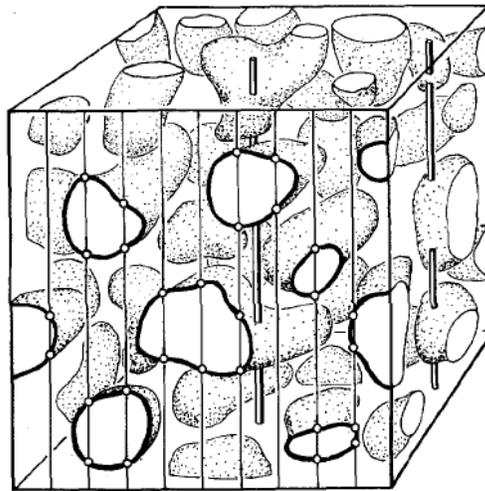


Figure 8. L'estimation de la surface : La détermination de la densité de surface résulte du comptage du nombre d'intersections entre une sonde linéaire de longueur connue avec la surface de la structure étudiée, tel qu'illustré ci-dessus. *Modifié de Weibel et al., 1966* [35].

Longueur

Les principes d'estimation de la longueur sont similaires à ceux de la surface puisque les deux paramètres sont dépendants de l'orientation et de la forme de la structure d'intérêt. Une structure linéaire est dite *anisotropique*, c'est-à-dire qu'elle a une orientation définie dans l'espace de par sa géométrie [15, 26]. Afin d'estimer une longueur, par exemple la longueur des capillaires dans les septa

intervalvéolaires, la sonde employée est le plan qui permet d'obtenir un nombre d'interactions avec l'élément structurel sur la section. Le plan (2D) coupe perpendiculairement cet élément, proportionnellement à la longueur (1D) ou la hauteur de celui-ci [15]. Il est évident que pour une structure recourbée, un même plan pourra l'intercepter à plusieurs endroits à la fois. La relation mathématique employée pour l'estimation d'une longueur (L_V) à partir d'un nombre d'interactions entre un plan et une structure est la suivante :

$$L_V = 2 \cdot Q_A \quad [15]$$

Ici, Q_A représente le nombre de profils par unité de surface de la sonde planaire sur la section de tissu. Des cadres non-biaisés de comptage associés chacun à un point, constituent les sondes planaires et sont distribués uniformément dans la grille test.

La densité linéaire (L_V) est exprimée ainsi :

$$L_V(Y, ref) = \frac{\text{Longueur de la structure } Y \text{ dans l'espace de référence}}{\text{Volume de l'espace de référence}} \quad [15]$$

La longueur totale d'un élément structurel est déterminée en multipliant, comme pour les autres paramètres, la densité de longueur ($L(Y)$) par le volume total du poumon (V).

$$L(Y) = V(ref) \cdot L_V(Y, ref) \quad [15]$$

Afin que l'estimation soit non biaisée, le spécimen doit être prélevé de manière à être totalement isotropique (voir section 2.2.7.2) ou la grille test utilisée doit contenir des sondes isotropiques [32]. Les principes employés pour compter un nombre de profils par unité d'espace de référence de manière non biaisée établis par Gundersen [36] sont utilisés [26].

L'estimation de la longueur peut être effectuée sur des sections isotropiques, uniformes et aléatoires (IUR), mais non sur des sections verticales

(VUR) minces. Une technique existe pour l'estimation de la densité de longueurs sur des sections verticales épaisses [15].

Nombre

Le nombre est un paramètre stéréologique qui ne possède pas de dimension (OD). Il doit donc être estimé avec une sonde volumétrique (3D). La problématique rencontrée est que ce paramètre ne peut être déterminé adéquatement à partir d'une section plane, sans amener de biais lié à la grosseur de la structure dénombrée. En effet, une particule de plus grande taille présente une plus grande probabilité d'être échantillonnée sur une section de tissu prise au hasard qu'une particule plus petite. Pour remédier à la situation, un volume est créé entre deux sections parallèles, directement adjacentes ou non, et obtenues d'un même bloc de tissu de manière aléatoire et uniforme. La sonde volumétrique, appelée le « disector » [37], est ainsi constituée d'une section de référence et d'une section « look-up ». Cet outil permet de dénombrer une structure tridimensionnelle contenue dans un volume (aussi appelé *espace de référence*) sans biais de taille ou de forme (« physical disector ») [25, 38]. Le volume séparant les deux sections ne devrait généralement pas dépasser $\frac{1}{4}$ à $\frac{1}{3}$ de la hauteur de la particule à dénombrer [25].

La structure est comptée si elle est présente dans un cadre de comptage (« unbiased counting frame » [36]) (voir figure 10), dans la section de référence, mais absente dans la section « look-up » [37]. Ce cadre de comptage doit être positionné de manière aléatoire, uniforme et systématique dans l'espace de référence, c'est-à-dire sur la coupe histologique. La densité numérique (N_V) est estimée sans biais en utilisant le « disector » pour établir un nombre par unité de volume, puis ramenée en valeur absolue en multipliant par le volume total de référence. Le volume de l'espace de référence est obtenu en multipliant l'aire du cadre de comptage par la distance qui sépare les deux sections du « disector » [38].

Voici la formule pour l'estimation de la densité numérique :

$$N_v = \frac{1}{a/f \cdot h} \cdot \frac{\Sigma Q}{\Sigma P} \quad [15]$$

Où a/f représente l'aire du cadre de comptage, h est la hauteur divisant les deux sections du « disector », ΣQ constitue la somme des particules comptées et ΣP est la somme des points associés à un cadre de comptage et coïncidant avec l'espace de référence.

De manière alternative, la combinaison du « disector » et d'un protocole suivant les principes du « fractionator » permet de déterminer directement le nombre total d'une structure dans le poumon, sans avoir à inclure la valeur de son volume total [15, 26].

La coupe de sections au microtome à une distance connue l'une de l'autre combinée à l'utilisation des principes du « disector » se nomme « physical disector ». Plusieurs variantes ont depuis été développées, qui permettent notamment de compter des cellules ou structures cellulaires sur une section épaisse en microscopie confocale (« optical disector »), ou de déterminer la taille et le volume corpusculaire moyens (« nucleator ») [25, 32].

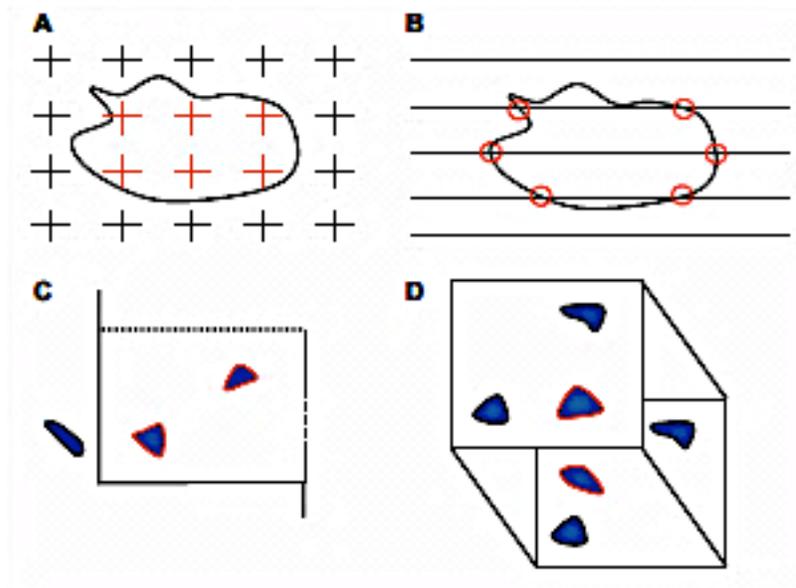


Figure 9. Schéma représentant l'estimation des principales quantités structurales.

A : L'estimation du volume à l'aide de la sonde ponctuelle (point). Les points interceptent la structure d'intérêt.

B : L'estimation de l'aire à l'aide de la sonde linéaire (linéaire). Les cercles mettent en évidence l'interaction entre la ligne et les limites de la structure d'intérêt.

C : L'estimation de la longueur en utilisant la sonde planaire (plan). Les profils de la structure d'intérêt sont échantillonnés à l'aide d'un « cadre de comptage non-biaisé » ayant une aire définie.

D : L'estimation d'un nombre utilisant la sonde volumétrique ou « Disector ». L'apparition de particules est comparée entre deux sections subséquentes, et une particule est comptée si elle apparaît dans la section d'échantillonnage et non dans la section de référence. *Modifié de Ochs et al., 2013 [14].*

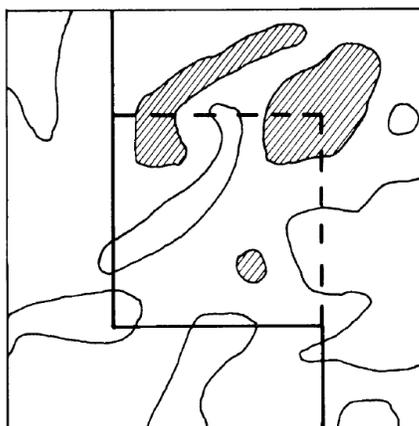


Figure 10. L' « unbiased counting frame » de Gundersen, pour l'estimation sans biais du nombre de profils par unité d'aire, N_A , d'une section de tissu. *Modifié de Gundersen, 1977 [36].*

La règle de comptage dicte que les profils présents sur un champ microscopique à l'intérieur du cadre de comptage et touchant la ligne d'inclusion (ligne pointillée) sont comptés. Les profils touchant la ligne d'exclusion (ligne noire pleine), y compris son extension en haut et en bas du cadre, ne sont pas inclus dans le compte.

Échantillonnage

Afin que les relations stéréologiques entre la sonde et la structure d'intérêt soient valables, l'uniformité, le hasard et l'isotropie sont requis et doivent être introduits dès la procédure d'échantillonnage. Ce principe définit la stéréologie de type « design-based ». Le mot d'ordre est d'échantillonner suffisamment pour que l'ensemble des spécimens soit représentatif de l'organe, tout en y mettant le moins de travail possible. En suivant le principe de « Do more, less well » [19], il est possible d'obtenir un coefficient de variation minimum - de l'ordre d'environ 5% ou moins - dans la plupart des situations en suivant un protocole de type « design-based ». La règle reste générale, et davantage de variations peuvent survenir en fonction des caractéristiques de la structure étudiée, de l'organe à l'étude, etc. [16].

La stéréologie est basée sur des principes statistiques et l'approche dépend étroitement de l'échantillonnage. Un protocole bien établi et ayant de solides bases théoriques est essentiel. La propriété aléatoire de l'échantillonnage doit pouvoir être présente à tous les niveaux, c'est-à-dire de l'animal jusqu'aux mesures effectuées sur les sections histologiques. La procédure doit également être observée à la lettre puisqu'il est impossible de déterminer si les spécimens ont été sélectionnés avec une méthode uniforme et aléatoire une fois échantillonnés [15].

Échantillonnage aléatoire, uniforme et systématique (SURS)

Un échantillonnage *systématique, uniforme et aléatoire* (SURS) est l'approche de choix pour obtenir des spécimens représentatifs de l'organe, de manière efficace, et sans biais d'échantillonnage [15]. Il est requis dans tout protocole de stéréologie de type « design-based », afin que toutes les parties du poumon aient la même probabilité d'être sélectionnées lors du processus. Une adhérence stricte aux règles de base permet de réduire l'introduction d'erreurs systématiques et d'ainsi augmenter la validité et la précision des résultats [39]. De par les caractéristiques inhérentes au hasard, même un protocole aléatoire et uniforme peut amener l'échantillonnage préférentiel de certaines régions d'un organe. Il devient avantageux de combiner une approche systématique à une approche aléatoire et uniforme. Plusieurs protocoles sont à ce jour disponibles pour l'étude des différentes structures composants le poumon, tous suivant ces mêmes principes de base [3].

Un échantillon systématique est pris selon un intervalle choisi qui est constant. Le premier échantillon d'une série est donc sélectionné avec un départ aléatoire, obtenu d'une table de chiffres aléatoires, et qui est situé dans un intervalle « T » choisi. Les échantillons subséquents seront localisés à une distance l'un de l'autre égalant la valeur de l'intervalle. Le départ aléatoire peut également être déterminé en « jetant » une règle au hasard sur le tissu à échantillonner, parallèlement à l'axe d'échantillonnage. Tous les échantillons deviennent

aléatoires dû au départ aléatoire utilisé, et la distribution des échantillons est beaucoup plus uniforme dans l'espace de référence [15].

Une approche systématique est efficace, car l'interdépendance existant entre les spécimens permet de diminuer le coefficient d'erreur seulement en augmentant minimalement le nombre d'échantillons [16]. La seule limitation d'une telle approche constitue la présence d'une périodicité dans la structure à l'étude correspondant à celle de l'échantillonnage. Pour des raisons pratiques, il peut être préférable de diviser d'abord l'objet en tranches d'épaisseur égale et ensuite de sélectionner les échantillons, selon une approche en 2D, à partir de ces tranches [15].

Avec un échantillonnage systématique selon les principes de la stéréologie de type « design-based », il est possible d'obtenir deux types d'échantillons : 1) les échantillons isotropiques, uniformes et aléatoires et 2) les sections verticales [16]. Le type d'échantillons sera déterminé selon l'anisotropie de la structure étudiée (par exemple : les voies respiratoires et les vaisseaux sanguins sont anisotropiques) et selon le type de paramètre stéréologique à estimer.

Pour l'étude de structures ayant une distribution hétérogène dans le poumon, un protocole stratifié d'échantillonnage uniforme, aléatoire et systématique peut être employé. Le poumon est alors divisé en strates qui seront échantillonnées et analysées séparément [3].

Fractionator

Le principe du « fractionator » a été d'abord décrit par Gundersen en 1986 [40]. Il est employé avant tout pour estimer le nombre total d'une structure tissulaire, en combinaison avec le principe du « disector ». La méthode utilisée à cette fin est sans biais et indépendante de la magnification ou du rétrécissement des tissus. De plus, le volume total de l'organe n'a pas à être connu pour transformer le paramètre de densité de nombre en valeur absolue [15, 25]. Les

règles du « fractionator » dictent que le nombre total d'une structure présente dans un objet est égal au nombre de cette structure contenue dans une fraction de cet objet, multiplié par le dénominateur de la fraction [40]. Les deux prérequis pour l'application de ce procédé sont que la fraction soit connue et que la sélection de la fraction de l'objet - donc la sélection des échantillons - soit effectuée de manière aléatoire et uniforme. Si la variabilité est trop importante dans l'estimation d'un nombre de particules en utilisant le « fractionator », alors le nombre de spécimens peut être augmenté pour diminuer sa valeur ou le protocole modifié pour suivre les principes du « smooth fractionator » [15].

Afin d'adapter le principe du « fractionator » à un objet en trois dimensions, il faut diviser le processus d'échantillonnage en plusieurs étapes. Par exemple, le poumon est coupé en tranches pour l'estimation du volume total par la méthode de Cavalieri. Une fraction $1/f$ de ces tranches est sélectionnée, avec un départ aléatoire situé dans l'intervalle 1 à f . Les tranches sont ensuite coupées en bâtons, de longueur ou grosseur différentes, et une fraction $1/f_2$ de ces bâtons sera sélectionnée de la même manière. À chaque nouveau cycle, les échantillons peuvent être arrangés avant la sélection selon un patron prédéterminé ou totalement aléatoire. Suivant les mêmes principes, les bâtons sont coupés en blocs plus gros, puis en blocs plus petits en répétant les cycles d'échantillonnage jusqu'à ce que le processus soit terminé. À chaque étape du protocole, une fraction des spécimens est choisie en débutant toujours par un chiffre aléatoire dans l'intervalle 1 à f , f étant le dénominateur de la fraction choisie. La fraction des spécimens à sélectionner peut varier d'un cycle à l'autre, mais doit rester constante dans un même cycle. Toutes les fractions utilisées lors de l'échantillonnage doivent être notées durant le processus. Une fois l'estimation du nombre de la structure d'intérêt effectuée sur les coupes histologiques, cette valeur est multipliée par les dénominateurs de toutes les fractions du protocole, pour obtenir une estimation non-biaisée du nombre total de la structure dans l'organe [15].

Le protocole peut être utilisé pour estimer des valeurs de nombre, longueur, surface et volume, mais seul le nombre total d'une structure sera indépendant du rétrécissement tissulaire, du volume total de l'objet et de la magnification [3, 39].

Smooth Fractionator

Le « smooth fractionator » est une modification du principe du « fractionator », décrite d'abord par Gundersen [39], qui permet d'échantillonner des spécimens de manière simple et efficace, tout en réduisant la variation des estimations [26, 39].

Les principes du « smooth fractionator » sont presque identiques à ceux du « fractionator ». Pour le « smooth fractionator », une variable associée aux spécimens est choisie et utilisée pour ordonner les pièces à chaque cycle d'échantillonnage. La variable la plus souvent utilisée est la grosseur des pièces [39].

La distribution uniforme des échantillons sélectionnés à chacun des cycles d'échantillonnage – un cycle équivaut à couper, ordonner et sélectionner une fraction de spécimens- est obtenue en suivant deux étapes simples :

- 1- Ordonner les spécimens selon une variable choisie (ex : grosseur des pièces, aire d'une des surfaces de la pièce, etc.).
- 2- Pousser un item sur deux de la séquence de spécimens obtenue, et numéroter toutes les pièces de la plus grande jusqu'à la plus petite afin de former une distribution uniforme (voir figure 11) [39].

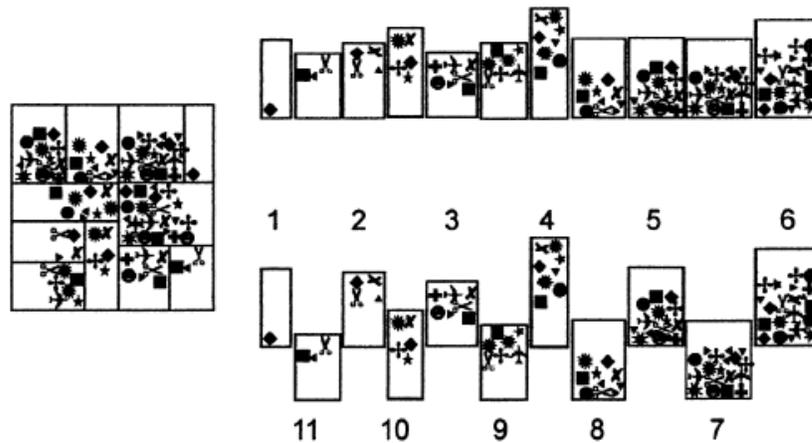


Figure 11. Schéma démontrant l'arrangement uniforme des spécimens pour chaque cycle d'échantillonnage du « smooth fractionator ». Le spécimen est d'abord coupé en un nombre de pièces, qui sont ordonnées selon une variable, ici la grosseur des morceaux, pour obtenir une distribution uniforme (de la plus grande pièce à la plus petite). *Modifié de Gundersen, 2002 [39].*

Pour éviter l'introduction de biais, il est important de suivre les règles du protocole à la lettre, ce qui prévient du même coup l'introduction d'erreur de manipulation. La variabilité introduite par le manipulateur dans le classement des pièces en distribution uniforme semble triviale et peut être ignorée dans la plupart des cas. La variation dans l'estimateur stéréologique proviendrait en premier lieu de la différence de distribution entre la variable choisie (par exemple : grosseur des pièces) et le paramètre stéréologique estimé sur les échantillons. En deuxième lieu, la variation proviendrait de la présence de gros « sauts » dans l'arrangement des pièces, résultant en une distribution plus ou moins uniforme [39].

Le « smooth fractionator » est une des méthodes d'échantillonnage les plus efficaces en stéréologie de par sa simplicité, et de par la symétrie et l'unimodalité de l'arrangement des pièces. Aucune règle n'existe pour dicter la manière dont les échantillons d'un organe sont coupés et le choix de la variable de distribution est

libre. L'absence de biais est garantie si la procédure est suivie à la lettre et différentes stratégies peuvent être utilisées pour augmenter la précision des estimations stéréologiques [39].

Isotropie (IUS)

L'*isotropie* se rapporte à l'orientation d'une structure ou d'un objet dans l'espace et stipule que toutes les orientations sont également probables. Un spécimen IUR, ou *isotropique, uniforme et aléatoire*, signifie que la section coupée du spécimen n'a aucune orientation préférentielle dans l'espace. Pour une grille de sondes linéaires, utilisée pour estimer l'aire de structures, IUR signifie que les sondes sont toutes isotropiques dans leur orientation, et sont positionnées aléatoirement dans l'espace tridimensionnel. Cette caractéristique devient importante lors de l'étude de structures biologiques possédant une orientation préférentielle, dites *anisotropiques* (ex : vaisseaux sanguins, voies respiratoires).

Pour effectuer l'estimation des paramètres de surface et de longueur, les spécimens et la grille de sondes doivent être isotropiques, en plus d'être échantillonnés de manière aléatoire, uniforme et systématique. Pour générer des dimensions aléatoires dans un espace en trois dimensions, il faut avoir deux angles aléatoires, correspondant à la co-latitude et la longitude respectivement, dont les coordonnées génèrent toutes les directions possibles. Il existe deux façons de générer des échantillons qui rencontrent les prérequis nécessaires : les sections verticales (VUR) et les échantillons isotropiques, uniformes et aléatoires (IUR) [15].

Les échantillons de type isotropiques, aléatoires et uniformes nous permettent d'estimer un volume, une surface, une longueur, et un nombre. Par conséquent, un protocole d'échantillonnage uniforme, aléatoire et isotropique est souhaité pour obtenir des spécimens sans biais d'échantillonnage. La combinaison du principe du « smooth fractionator » et de l' « orientator », de l' « isector » ou de

la section verticale est un procédé qui répond au critère d'une approche de type « design-based » [26, 41]. Dans le cas d'une structure anisotrope, tel un vaisseau sanguin ou une voie respiratoire, une section verticale (voir section 2.2.7.2.2) devrait plutôt être sélectionnée pour l'estimation de la surface et de la longueur [16].

Échantillonnage isotropique aléatoire et uniforme

Un échantillon qui est à la fois aléatoire, uniforme et isotropique a été sélectionné dans une direction isotropique et une position aléatoire et uniforme dans l'espace de référence.

Une façon simple d'obtenir des échantillons aléatoires, uniformes et isotropiques (IUR) de petites tailles a été développée par Nyengaard et se nomme l'« isector » [29]. Il consiste à créer un moule de silicone dans lequel des cavités sphériques sont présentes. De petits échantillons obtenus de manière aléatoire, uniforme et systématique d'un organe sont insérés dans les cavités de l'« isector », puis enrobés dans de l'agar ou du plastique. Ce procédé permet de recueillir des échantillons sphériques ayant une surface complètement isotropique. Les spécimens sont démoulés, puis laissés à rouler librement sur une surface plane afin d'obtenir une orientation aléatoire et uniforme dans l'espace [29].

L'« orientator », développé par Mattfeld et al. [28], est une technique utilisée afin d'obtenir des spécimens IUR de plus grande taille. Le spécimen ou l'organe entier peut d'abord être enrobé dans de l'agar. Ensuite, deux types de rotations lui sont appliqués, dans l'axe vertical et horizontal, à l'aide de deux horloges représentant les différentes directions dans l'espace (co-latitude et longitude). Une fois l'angle aléatoire de coupe obtenu, le spécimen est sectionné parallèlement à celui-ci. Pour avoir un protocole d'échantillonnage de type « design-based », l'« orientator » est jumelé au « smooth fractionator » afin de

sélectionner des spécimens sur lesquels il est possible d'estimer tous les paramètres stéréologiques [28].

Sections verticales

Les échantillons isotropiques obtenus à l'aide de l' « orientator » [28] ou de l' « isector » [29] peuvent représenter un défi pour l'identification adéquate de l'architecture d'un tissu. La section verticale est donc choisie lorsqu'une structure anisotrope, comportant une direction inhérente, est à l'étude [16], mais qu'une certaine orientation à la coupe du tissu doit être conservée. Ce type d'échantillon autorise l'estimation des paramètres stéréologiques de longueur ou de surface [32]. L'emploi de sondes linéaires et planaires nécessaires à l'estimation de ces paramètres requiert que la combinaison des sondes et de l'échantillon soit isotropique.

Une section verticale représente une section générée perpendiculairement à un axe horizontal [27]. L'axe horizontal peut être un axe horizontal physiologique ou un axe de référence choisi pour la coupe de la section verticale. La seule condition requise est que la section obtenue puisse ensuite être tournée autour de son axe vertical, tout en conservant un angle perpendiculaire au plan horizontal [27].

Il existe quatre exigences principales à remplir dans un protocole visant l'obtention de sections verticales à partir d'un organe [27] :

- 1- L'organe contient un axe vertical « naturel » ou l'expérimentateur doit en générer un. Cet axe doit être identifiable à toutes les échelles de l'échantillonnage.
- 2- Toutes les sections générées doivent être parallèles à la verticale, et l'axe vertical doit être identifié sur chacune d'elle. Il faut porter une attention particulière pour que la section verticale soit à 90 degrés du plan horizontal, et ce à toutes les étapes subséquentes, incluant la mise dans l'agar s'il y a lieu et la coupe de sections au microtome.

- 3- La section verticale doit avoir une orientation et une position aléatoire (isotropie) par rapport au plan horizontal afin que l'estimation et l'estimateur soient sans biais. Une approche systématique doit être employée pour assurer que les sections soient uniformes et aléatoires, comme décrit au préalable. L'orientation de la première section verticale autour de l'axe vertical doit être choisie au hasard. Les directions subséquentes sont déterminées systématiquement en fonction de la première (voir figure 12).
- 4- Sur une section verticale, une grille test de sondes linéaires doit avoir un « poids » proportionnel à $\sin\theta$, où θ est l'angle entre la sonde linéaire (cycloïdes) et l'axe vertical.

Une cycloïde est la meilleure sonde linéaire pour obtenir une estimation de la densité de surface [27]. Chaque section verticale a une direction de référence, l'axe vertical, qui doit correspondre à l'axe mineur des cycloïdes composant la grille. Les cycloïdes y sont distribuées de manière aléatoire et uniforme dans l'espace, rendant l'ensemble de la grille test et de la section histologique isotropique en trois dimensions. Les cycloïdes, étant des sondes linéaires, sont associées à un point et possèdent une longueur connue par point dans la grille test [15, 27].

Le principe des sections verticales peut être utile pour l'étude des grosses voies respiratoires. Un exemple d'un protocole d'échantillonnage efficace combinant la section verticale locale et le principe du « fractionator » peut être trouvé dans un article publié par Hyde et al. 2007 [26].

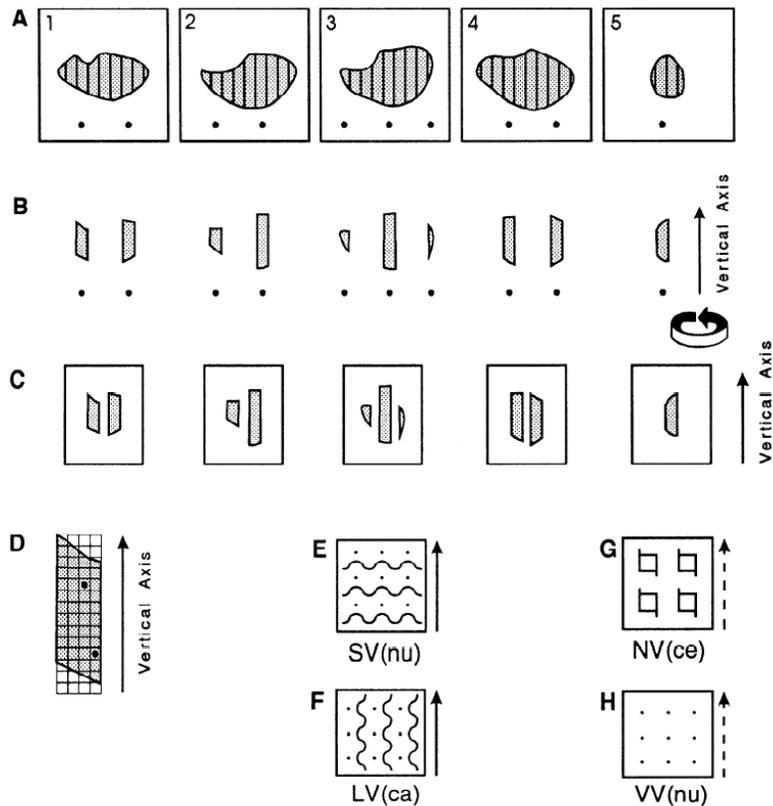


Figure 12. Procédure de génération de sections verticales : Le poumon est d'abord divisé en tranches d'épaisseur égale (A). Des échantillons sont coupés de ces tranches perpendiculairement à l'axe horizontal, puis sélectionnés de manière aléatoire et systématique (B). Ensuite, ils sont tournés sur leur axe vertical pour générer une orientation aléatoire dans cet axe (C). L'axe vertical est conservé jusqu'à la coupe au microtome (D). Une grille de sondes est appliquée sur les sections histologiques pour effectuer l'estimation du paramètre stéréologique désiré (E-F-G-H). *Modifié de Bolender et al., 1993 [16].*

Traitement du tissu biologique post-fixation

Suite à la fixation, les spécimens doivent être traités avant d'être mis dans un milieu d'enrobage. Pour la mise en paraffine, l'eau présente dans les tissus doit être remplacée par un solvant qui est miscible dans la paraffine. Cette étape est

effectuée d'abord avec une série de bains d'alcool, suivi d'une série de bains de solvant à paraffine qui peuvent être réalisées dans un circulateur programmé [12]. Les tissus peuvent par la suite être mis dans le milieu d'enrobage pour la coupe histologique et l'archivage [3].

Milieus d'enrobage : Paraffine, glycol méthacrylate, résine

L'enrobage des spécimens fixés est idéalement fait dans la résine d'époxy (pour la microscopie électronique ou optique) ou dans le glycol méthacrylate (pour la microscopie optique seulement). La paraffine induit un rétrécissement des tissus et donc un changement dans la morphométrie de l'échantillon. Si le paramètre à déterminer dans une étude est un nombre, par exemple le nombre de cellules caliciformes dans l'épithélium ou le nombre d'alvéoles dans le poumon, le rétrécissement induit peut être corrigé par l'utilisation du principe du « fractionator » [3].

Changements dimensionnels

Les différentes problématiques rencontrées en morphométrie pulmonaire incluent les changements causés par la préparation des spécimens à étudier. La préparation comprend la fixation de l'organe frais, la déshydratation des échantillons, la mise en paraffine et la coupe des sections pour l'analyse microscopique (voir figure 13) [2].

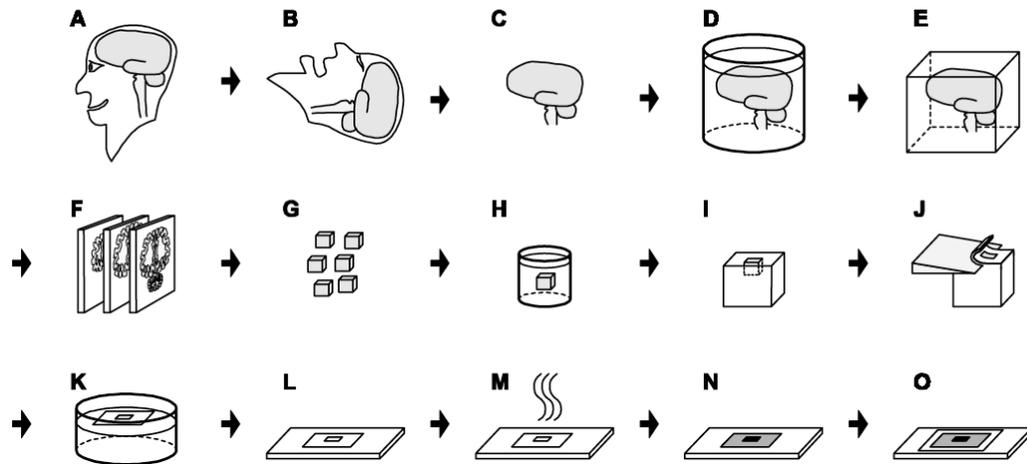


Figure 13. Les différentes étapes de préparation des échantillons : Elles incluent la fixation de l'organe (D), la coupe en tranches parallèles (F) et l'échantillonnage subséquent en blocs (G), suivi des étapes de déshydratation (H), d'enrobage (I), de coupe au microtome (J) et du montage sur lame microscopique (K-O). *Modifié de Dorph-Petersen et al., 2001 [42].*

L'instabilité du tissu pulmonaire, celui-ci étant en majeure partie rempli d'air à l'état physiologique, est également responsable de changements dimensionnels [3]. Ceux-ci peuvent être (1) homogènes ou différentielles, (2) isotropiques ou anisotropiques, et (3) uniformes ou non-uniformes. Des combinaisons de ces déformations locales sont possibles, amenant une altération générale du tissu qui peut être observée suite à des mesures globales, tel l'estimation d'un volume. D'autres changements existent, notamment la torsion et la flexion, mais ceux-ci n'affectent pas directement les estimateurs stéréologiques [42]. Il est recommandé de tenir compte des changements observés à chaque étape de la préparation des tissus pulmonaires et d'établir des facteurs de correction à partir d'échantillons types [3].

Les problèmes découlant de la fixation ont été abordés précédemment et sont dus principalement à l'expansion du poumon lors de la procédure. Tel que discuté, le formaldéhyde amène un rétrécissement qu'il est important de documenter lorsqu'il est le fixateur choisi. Une étude effectuée sur des poumons provenant de différents mammifères a démontré que la fixation avec du formol 10% à une pression hydrostatique constante de 25 cm d'H₂O induit un rétrécissement des poumons qui correspondait à un facteur de 0.8 à 1.3 de la capacité pulmonaire totale (« TLC ») [6].

Le traitement subséquent des spécimens fixés et échantillonnés cause à la fois un rétrécissement et une compression du tissu [2]. Dans l'étude par Lum et al.[6], le tissu pulmonaire fixé au formol 10% présentait un rétrécissement de 20 à 30% par rapport au tissu frais, suite à la déshydratation et la mise en paraffine, et ce pour toutes les espèces étudiées.

L'étape d'enrobage en paraffine des spécimens amène donc une déformation du tissu prononcée et imprédictible, qui est en majeure partie due au rétrécissement. Les enrobages dans le plastique contenant du glycol méthacrylate, une matrice plus uniforme, amèneraient moins de déformations et des changements dimensionnels plus homogènes. Le plastique constitue donc l'outil idéal lorsque la taille de particules est le paramètre à estimer. Par contre, il ne peut être utilisé pour des études immunohistochimiques puisqu'il intervient avec la pénétration de plusieurs colorations [42].

Finalement, la coupe des blocs de paraffine entraîne une compression anisotropique du tissu dans un axe parallèle à celui de la coupe au microtome [3]. Dans l'étude par Lum et al. [6], le degré de rétrécissement additionnel observé après la coupe au microtome et la coloration de spécimens pulmonaires fixés au formol 10% était de 5 à 20% pour toutes les espèces.

Le rétrécissement d'un tissu constitue donc un des changements dimensionnels les plus rencontrés. En plus des facteurs déjà énumérés, il peut être

dû au temps durant lequel le tissu reste dans le fixateur (relation non-linéaire; dépend du fixateur), à l'organe fixé et à sa condition pathologique [43], à la capacité pulmonaire de l'espèce en question, ainsi qu'à l'âge du sujet (jeune > vieux) [6]. La variabilité interspèce dans la composition du poumon (drainage lymphatique, vascularisation, séparations interlobulaires, proportion des constituants du parenchyme) causerait également une variation dans le degré de rétrécissement. Finalement, le type de fixateur, son débit, et la pression hydrostatique employée pour la fixation ont également leur rôle à jouer [44].

Effets sur les estimateurs stéréologiques

Les changements dimensionnels d'un tissu affectent l'estimation du nombre et de la grosseur des particules. Le rétrécissement peut survenir dans les différents plans d'une section, soit dans l'axe des x , des y ou des z . S'il est présent dans les trois plans, alors les estimateurs planaires (ex : surface, longueur, volume) ne peuvent quantifier sans biais la taille des particules. Pour les mesures stéréologiques standards effectuées sur des surfaces en deux dimensions, les déformations en x et y devraient être documentées et mesurées pour corriger les valeurs obtenues, mais toute déformation dans l'axe des z n'a aucun effet sur les estimations [42]. Les déformations dans l'axe des z amènent du biais lorsque des outils stéréologiques comme l'« optical » ou le « physical design » sont employés. Ceux-ci permettent de déterminer le nombre de particules en utilisant le principe du « disector » et dépendent donc de l'épaisseur de la section histologique. Dans ce cas par contre, le comptage de points sur des surfaces planes (dimensions en x et y) pour déterminer des paramètres comme une longueur, une surface ou un volume peut être employé sans problème.

Il faut éviter ou minimiser les déformations une fois qu'elles sont connues, en surveillant la taille des spécimens à toutes les étapes du traitement des tissus et en modifiant les procédures au besoin [42].

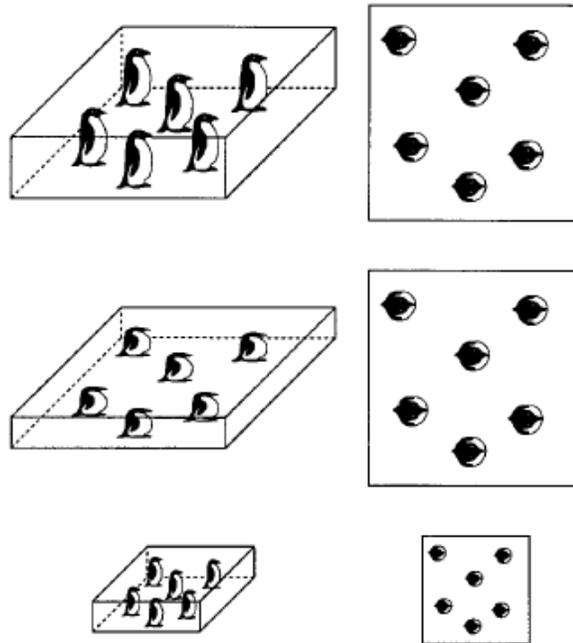


Figure 14. Schéma décrivant les différents types de déformation d'un échantillon. Le coin supérieur gauche démontre une section épaisse contenant des particules « pingouins » et à droite, sa projection sur une section plane (2D). Au milieu à gauche, la déformation dans l'axe des z n'affecte pas la projection de l'échantillon sur sa section plane vue à droite. Le rétrécissement est observé dans les trois axes, x , y , et z sur les images du bas, et affecte la taille des pingouins sur des spécimens en trois et deux dimensions. *Modifié de Dorph-Petersen et al., 2001 [42].*

Hypothèse et objectifs

Hypothèse : L'échantillonnage et les principes de la stéréologie sont adaptables à l'étude du poumon équin.

Objectifs :

1. Adapter un protocole de fixation à pression constante au poumon équin entier.
2. Développer une méthode d'estimation du volume pulmonaire total.
3. Adapter une méthode d'échantillonnage systématique, uniforme et aléatoire au poumon équin, selon les principes du « smooth fractionator ».
4. Générer des échantillons isotropiques à l'aide de la technique de l'« isector » et de la section verticale.

Matériel et Méthodes

Protocole de préparation des différents réactifs

Formol 10%

Lors de la manipulation de solutions contenant du formaldéhyde, il est important de porter un équipement approprié, car le formaldéhyde est cancérigène et très irritant pour les yeux, la peau et les voies respiratoires. Il est toxique via ingestion et inhalation. Il est aussi important de travailler sous la hotte chimique si possible ou dans un endroit bien ventilé [45]. Le matériel utilisé doit également être bien ventilé sous la hotte avant d'être disposé ou nettoyé.

Réactifs

- Eau distillée
- Solution tamponnée de phosphate
- Solution concentrée de formaldéhyde (maximum 37%)

Liste de matériel

- Cruche Nalgene® de 20 litres avec robinet
- Équipement protecteur :
 - Gants de néoprène ou nitrile
 - Sarreau long
 - Lunettes couvrantes de type « goggle »
 - Masque avec filtres adaptés à l'utilisation du formaldéhyde (Respirateur, demi-masque, 3M 6100/07024; cartouche contre le formaldéhyde et les vapeurs organiques, 3M 6005, Nascar Performance™)

Protocole

- 1- Verser 2,2 litres de solution concentrée de formaldéhyde (maximum 37%) dans la cruche de 20 litres.
- 2- Verser 2,5 litres de la solution tamponnée de phosphate préparée auparavant dans la même cruche.
- 3- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir un volume de 22 litres.
- 4- Mélanger tous les réactifs en brassant la cruche vigoureusement, robinet fermé.

Solution de phosphate tamponnée

Ce protocole permet de préparer une solution tamponnée de phosphate. Le pH doit ensuite être ajusté entre 5.8 et 8.0 une fois les réactifs mélangés [45, 46].

Réactifs

- Chlorure de potassium (KCl): 2g (Fisher Scientific, P217-500)
- Chlorure de sodium (NaCl) : 80g (Fisher Scientific, S271-3)
- 10L d'eau distillée
- Phosphate de potassium dibasique (K_2HPO_4): 2.4g (Laboratoire MAT inc., PR-0205)
- Phosphate de sodium monobasique (Na_2HPO_4) : 14.4g (Fisher Scientific, S369-500)
- Solutions de HCL et NaOH (pour ajuster le pH)

Matériel

- Balance en grammes
- Contenant de pesée en plastique

- Cruche Nalgene® de 10L ou 20L en plastique
- pH-mètre
- Pipettes pasteurs
- Spatule de métal

Procédure

Pour obtenir 10 litres d'une solution de phosphate tamponnée :

- 1- Dans la cruche Nalgene®, dissoudre 14.4g de phosphate de sodium monobasique, 2.4g de phosphate de potassium dibasique, 80g de chlorure de sodium et 2g chlorure de potassium dans 8L d'eau distillée selon les proportions indiquées.
- 2- Ajuster le volume final à 10 litres avec de l'eau distillée.
- 3- Ajuster le pH final de la solution à 7.4 à l'aide d'un pH-mètre et des solutions de HCL et de NaOH.
- 4- La solution tamponnée de phosphate est maintenant prête à l'emploi

Z-Fix©

Le Z-Fix© est une solution tamponnée de formaldéhyde additionnée de zinc qui améliorerait la morphologie du tissu fixé ainsi que la qualité des colorations immunohistochimiques subséquentes. Il est disponible en solution concentrée, qui doit être diluée dans de l'eau distillée avant utilisation, ou en solution prête à l'emploi [13].

Réactifs

- Eau distillée
- Z-Fix© en solution concentrée, Anatech®

Liste de matériel

- Cruche Nalgene® de 20 litres avec robinet

Protocole pour obtenir une solution de Z-Fix© prête à l'emploi

- 1- Diluer un gallon (3,8 litres) de la solution concentrée dans 4 gallons (15,2 litres) d'eau distillée dans la cruche de 20 litres, pour obtenir un total de 5 gallons de solution prête à l'emploi.
- 2- Mélanger en brassant la cruche vigoureusement, robinet fermé.
- 3- Le Z-Fix© en solution prête à l'emploi doit être entreposé dans un contenant hermétique et dans un endroit ventilé, remplissant les normes d'entreposage des produits chimiques. Ses émanations sont aussi toxiques que celles du formaldéhyde.
- 4- Les mêmes règles que pour le formaldéhyde s'appliquent pour le port de l'équipement protecteur, la manipulation des produits fixés et la ventilation du matériel utilisé.

NOTE : 20 litres de fixateur représente une quantité de départ pour la fixation d'un poumon équin standard, mais une quantité additionnelle peut s'avérer nécessaire durant le processus selon la taille du poumon fixé. Il est toujours utile de faire 1 ou 2 gallons de la solution prête à l'emploi en plus du 20 litres, qui pourront être ajoutés en cas de besoin. Une certaine quantité de fixateur est également nécessaire pour l'entreposage du poumon dans le bac de plastique après la fixation (les bacs ont habituellement une capacité d'environ 25 litres).

Agar

L'agar se liquéfie à une température de plus de 85 degrés Celsius et se gélifie en refroidissant à une température de 30 à 40 degrés Celsius.

Réactifs

- Agar (Fisher Scientific®, Molecular genetics, agar en granules, BP1423-500).
- Eau du robinet

Liste de matériel

- Bécher de plastique Nalgene® ou contenant en pyrex allant au four micro-ondes
- Chaudron de 11 litres et plaque chauffante (pour préparer de grandes quantités)
- Contenant ou sac de plastique hermétique
- Four micro-ondes
- Spatule de silicone

Procédure

- 1- Ajouter 40 g de granules dans 1000 ml d'eau, pour avoir de l'agar 4%. Pour obtenir 500 ml d'agar liquide à gélifier, il faut donc préparer 2 grammes d'agar en granules.
- 2- Faire chauffer les granules dans de l'eau afin de porter le mélange à ébullition et puis le laisser bouillir pendant 30 secondes. Afin de faciliter l'homogénéisation des granules dans l'eau, elles peuvent être mises avec l'eau la veille pour qu'elles imbibent à la température ambiante.
- 3- Une fois le mélange homogène, l'agar liquide doit être refroidi à une température de 50 à 60 degrés Celsius avant d'être versé autour du tissu pulmonaire.
- 4- Une fois l'agar gélifié, il peut être conservé à 4 degrés Celsius dans un contenant ou un sac de plastique fermé hermétiquement.
- 5- Il est recommandé de manipuler l'agar avec des gants afin de le préserver le plus longtemps possible et ainsi empêcher la croissance de colonies

bactériennes. L'agar peut être recyclé à plusieurs reprises, il suffit seulement de réchauffer la forme gélifiée au four micro-ondes pour la rendre de nouveau liquide [47].

Comment fabriquer un « isector »

L'« isector » permet de donner une orientation aléatoire à de petits échantillons de poumon. Le tissu incorporé dans l'agar et en forme de bille roule sur une surface plane et adopte une orientation aléatoire une fois à l'arrêt. L'échantillon est alors dit *isotrope* et peut-être utilisé pour estimer tous les paramètres stéréologiques désirés : longueur, surface, volume et nombre (voir section 2.2.7.2).

Liste de matériel

- Abaisse-langue
- Balance en grammes
- Billes de métal de la grosseur désirée (un dm de 1 à 1,5 cm est idéal si les échantillons doivent ensuite être mis dans des cassettes d'une épaisseur de 1,5 cm). Trois billes de métal sont utilisées par « isector » si celui-ci est fabriqué dans une demi-boîte d'embouts à pipette standard (Gaétan Bienvenue, Transmission St-Hyacinthe, rue Dessauls, St-Hyacinthe : à un diamètre de plus de 15 mm, les billes de métal peuvent être achetées à l'unité, sans frais supplémentaire).
- Boîte rectangulaire en plastique ou vitre (ex : demi-boîte pour embouts de pipette)
- Lame de scalpel #10
- Film plastique
- Silicone (Mold Max® 20 silicone, Smooth-On Inc. 2000 Saint John Street, Easton PA 18042, www.smooth-on.com)

Procédure

- 1- Préparer le silicone selon les instructions du fabricant du Silicone Mold Max® 20, dans un contenant jetable ou lavable. Ne porter que des gants de vinyle puisque le latex prévient la solidification du silicone.
- 2- Mélanger la partie A (pâte blanche) avec la partie B (liquide orange) selon un ratio de 100 :10 par rapport au poids. Donc, pour 100g de la partie A il faudra 10g de la partie B.



Figure 15. Image de la fabrication de l'« isector ».

- 3- Positionner la demi-boîte d'embouts à pipette sur la balance, et mettre celle-ci à 0.
- 4- Verser la partie A jusqu'à atteindre le poids désiré, puis ajouter la partie B pour respecter les proportions calculées de 100 : 10.
NOTE : La partie A est très collante et se transfère mal d'un

- contenant à l'autre, il est alors préférable de la peser dans le contenant dans lequel le silicone sera mélangé.
- 5- Bien mélanger le tout avec un abaisse-langue jusqu'à ce que la partie B liquide soit totalement incorporée dans la partie A. Le mélange ainsi formé peut-être gardé 45 minutes avant qu'il ne commence à durcir (le mélange peut aussi être dégazé à l'aide d'un vacuum pour 2 à 3 minutes afin de réduire le nombre de bulles d'air qui y sont introduites).
 - 6- Verser le silicone lentement et avec un mouvement uniforme (pour réduire la quantité d'air entrant dans le mélange) dans une demi-boîte de pipettes pour atteindre une épaisseur d'environ 3 cm. Les billes de métal doivent être recouvertes une fois disposées dans le contenant. Deux « isectors » avec chacun trois cavités sphériques peuvent être fabriqués dans une demi-boîte d'embouts.
 - 7- Utiliser un morceau de carton épais ou de plastique pour créer une séparation entre les deux « isectors », le temps de la solidification.
 - 8- Laisser le silicone à solidifier pour environ 45 à 60 minutes à la température ambiante avant d'y mettre les billes de métal pour ne pas qu'elles s'enfoncent trop au fond.
 - 9- Pour fabriquer deux « isectors », placer six billes de métal dans le silicone à égale distance l'une de l'autre, trois billes par demie de la boîte. De par leur poids, elles s'enfonceront au fond du moule. S'assurer que les trous créés par les billes sont recouverts de silicone.
 - 10- Recouvrir la surface du silicone exposée à l'air avec du film plastique et laisser le tout se solidifier à la température ambiante pour la nuit (ou pour un minimum de 16 heures).

- 11- Une fois le silicone solidifié, démouler les « isectors » de la boîte de plastique. Si un séparateur n'a pas été utilisé au préalable, il est possible de couper le silicone en deux afin de créer deux « isectors ». Un objet coupant peut être nécessaire pour démouler les « isectors » de la boîte.
- 12- Les billes de métal devraient être visibles sur une des surfaces de l'« isector ». À l'aide d'une lame de scalpel, créer une petite incision en croix au-dessus de chaque bille de métal, d'une taille légèrement inférieure à son diamètre.
- 13- Appliquer une pression avec les doigts derrière chaque bille afin de les expulser du moule de silicone. NOTE : La surface à l'intérieur doit être bien lisse pour que les billes d'agar aient une surface leur permettant de rouler librement.
- 14- Les « isectors » sont prêts à l'emploi!
- 15- Conserver les « isectors » dans des sacs de plastique fermés étanches à l'air entre chaque utilisation. Ils peuvent être nettoyés avec une solution de savon doux et bien asséchés si nécessaire.

Considérations pour l'euthanasie et l'obtention des poumons

L'exsanguination est recommandée pour empêcher la contamination sanguine lors de la nécropsie. Du sang est présent dans les voies respiratoires des chevaux sains ou atteints du souffle post-mortem et aucune cause n'a été établie (observée au Service de pathologie de la FMV). La présence d'une grande quantité de sang dans les voies respiratoires pourrait entraîner la formation de caillots et ainsi bloquer le flot de fixateur dans certaines régions du poumon, empêchant une fixation optimale et uniforme. Pour ce faire, il faut extraire le poumon du thorax le

plus rapidement possible suivant l'euthanasie. Un délai minimal entre la mort et le début de la fixation est nécessaire pour empêcher la progression des changements post-mortem qui peuvent affecter les constituants tissulaires du poumon. La nécropsie doit se faire avec les plus grandes précautions pour prévenir les dommages au parenchyme pulmonaire lors de l'extraction du poumon. Des entailles peuvent causer des fuites lors de la fixation à pression constante ainsi qu'abimer des échantillons potentiels. Le poumon est mis sur glace dès que possible pour ensuite être transporté au laboratoire et préparé pour la fixation.

Fixation à pression constante

Le poumon équin disséqué est fixé selon une pression constante contrôlée de 25 à 30 cm d'H₂O, qui correspond à une distance de 25 à 30 cm entre l'interface air-liquide de la cruche de fixateur et l'entrée du fixateur dans le poumon (trachée ou bronche principale) (voir section 2.1).

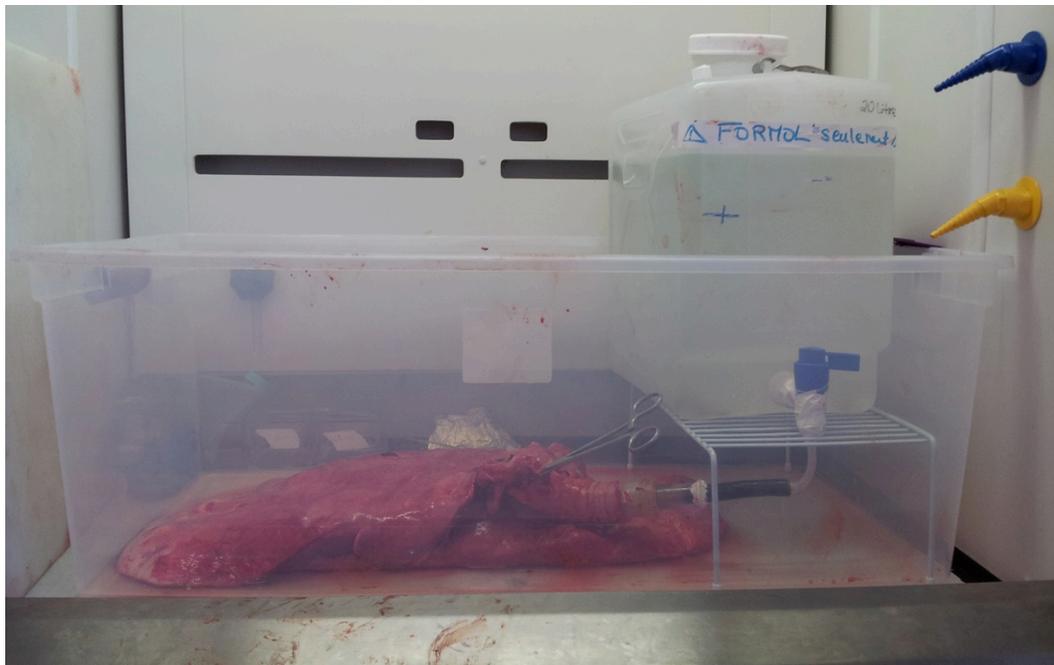


Figure 16. Image du système de fixation à pression constante installé dans la hotte chimique.

Réactifs

- Formaldéhyde tamponné 10% ou formaldéhyde additionné de zinc : une quantité approximative de 30 litres est nécessaire pour fixer un poumon d'un cheval de taille moyenne.

Liste de matériel

- Adaptateur à fluidothérapie
- Contenant de plastique (contenant de rangement standard) avec couvercle hermétique d'une dimension d'environ 60 x 40 x 30 cm, pouvant également être placé dans une hotte chimique.
- Cruche de 20 litres Nalgene® avec robinet, fait de plastique résistant au formol
- Équipement protecteur adapté à la manipulation du formol/Z-Fix© : gants de propylène, lunettes couvrantes protectrices, sarrau et masque protecteur avec filtres intégrés
- Grandes pinces hémostatiques
- Hotte chimique
- Lame de scalpel #10 et manche de scalpel
- Papier brun ou absorbant
- Pinces hémostatiques standards
- Pompe péristaltique
- Règle de 30 cm ou plus grande
- Ruban adhésif blanc (pour fixer la tubulure)
- Sacs de plastique verts ou oranges pour protéger les surfaces de travail

- Soie dentaire ou fil de suture gros calibre
- Support pour la cruche de fixateur
- Tubulure reliant le contenant de fixateur à la bronche principale
- Tubulure en plastique d'un diamètre de 17mm qui sera insérée dans la pompe péristaltique.

Dissection du poumon équin

Les deux poumons gauche et droit du cheval ont des nombres différents de lobes. Le poumon gauche possède deux lobes, un crânial et un caudal, tandis que le poumon droit a trois lobes, c'est-à-dire un lobe accessoire en plus des lobes crânial et caudal. Le lobe accessoire s'attache avec une fine membrane de tissu conjonctif, la plèvre, au poumon gauche et aux vaisseaux pulmonaires entrant et sortant du poumon gauche. Une attention particulière est portée lors de la dissection pour ne pas entailler le lobe pulmonaire à fixer. La présence d'entailles dans le parenchyme crée des points de fuite additionnels pour le fixateur, diminuant ainsi la pression du système. Un examen macroscopique rapide permet de noter les anomalies présentes aux poumons et dans les voies respiratoires.

- 1- Commencer par identifier toutes les structures et sélectionner le poumon à fixer (gauche ou droit).
- 2- Disséquer le poumon des structures adjacentes superflues autour de la carina et du hile pulmonaire (aorte, œsophage, nœuds lymphatiques, médiastin, cœur, gras etc.) en prenant soin de ne pas endommager le parenchyme pulmonaire.
- 3- Avec un scalpel, détacher délicatement le lobe accessoire du poumon droit en faisant glisser la lame doucement, tout en séparant les deux parties.
- 4- Une fois les deux poumons séparés, dégager et couper la bronche principale ou la trachée pour accommoder la tubulure qui relie la cruche de

fixateur au poumon. Si la bronche principale est utilisée, la couper au niveau de la carina en conservant un peu de trachée au niveau de la bifurcation. Il doit rester une longueur suffisante de la trachée ou de la bronche principale pour pouvoir soutenir la tubulure et bien la fixer en place.

- 5- Disséquer davantage autour de la bronche principale ou de la trachée ainsi coupée si nécessaire pour pouvoir bien attacher la tubulure.
- 6- Ensuite, laver le poumon doucement à l'eau du robinet pour enlever le sang en faisant attention de ne pas mettre trop d'eau directement dans les voies respiratoires. Éponger délicatement le poumon avec du papier absorbant pour enlever l'excès d'eau.
- 7- Le système de tubulure reliant le poumon à la cruche de fixateur consiste en un tube endotrachéal de taille 22 raccourci et collé avec du silicone à une section de tube nasogastrique d'un diamètre légèrement inférieur.
- 8- La partie distale de la tubulure (le tube endotrachéal) est introduite dans la bronche principale de manière étanche, environ jusqu'à la demie du tube. La bronche principale donne rapidement une branche allant au lobe crânial. Le tube endotrachéal doit contenir un trou qui sera mis vis-à-vis cette branche afin que les lobe crânial et caudal soient fixés.
- 9- Avec un fil de soie dentaire ou un fil de suture d'une longueur d'environ 20-30 cm, faire des huit et des nœuds de chirurgien autour de la bronche pour sécuriser le tube en place et empêcher qu'il ne glisse au cours de la fixation (patron de « chinese finger trap »).
- 10- Le poumon est ensuite disposé dans un contenant de plastique pour la fixation, hile vers le haut, dans la hotte chimique.



Figure 17. Image du poumon disséqué et prêt à la fixation. De grandes pinces hémostatiques sont utilisées pour occlure une structure du hile causant une fuite.

Protocole de fixation

- 1- Préparer une quantité adéquate de fixateur. Une cruche de 20 litres contient assez de fixateur pour débiter la fixation.
- 2- Installer le système dans la hotte chimique. Brancher la partie proximale du tube au robinet de la cruche à l'aide d'un adaptateur à fluidothérapie (robinet fermé). Il est important d'avoir une tubulure la plus courte avec un diamètre le plus grand possible pour permettre un débit adéquat de fixateur dans le poumon. Remplir ces conditions aide également à limiter la résistance appliquée sur le flot de fixateur, ce qui réduirait la pression hydrostatique du système.
- 3- Insérer une tubulure adaptée dans la pompe péristaltique, de manière à ce qu'un embout reste en place dans le fond du contenant de fixation et que l'autre s'insère dans l'ouverture de la cruche de fixateur.

Du ruban adhésif peut être nécessaire pour fixer les embouts en place. Ajuster le diamètre de la tubulure sur la pompe. Ce système servira à recycler le fixateur tout au long de la procédure de fixation et permettra ainsi de conserver la pression constante de 25-30 cm d'H₂O.

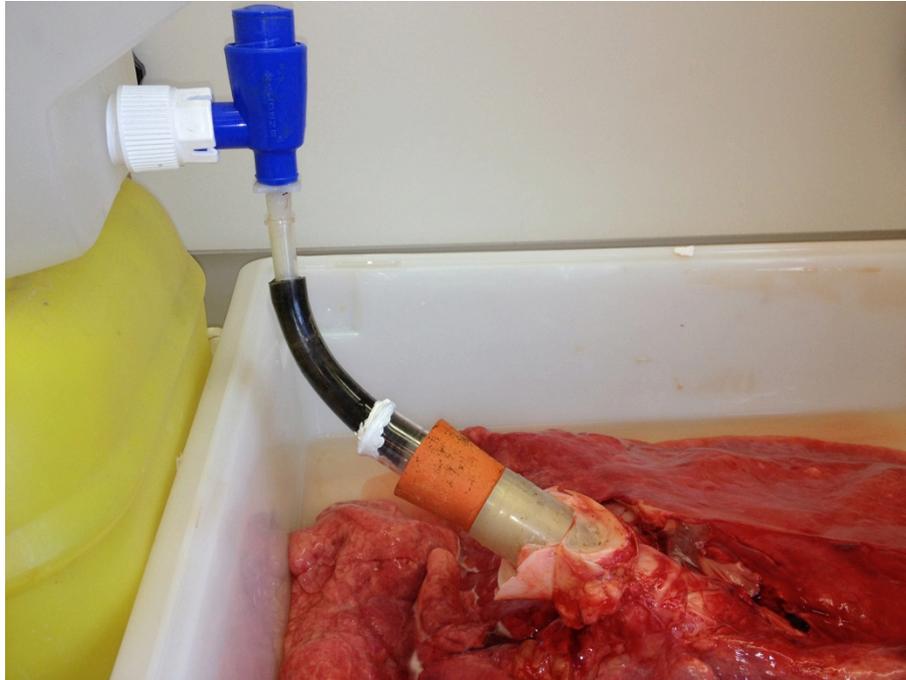


Figure 18. Image de la tubulure reliant la cruche de fixateur au poumon.

***Toutes les étapes suivantes doivent être effectuées dans une hotte chimique en raison des émanations toxiques du formaldéhyde. Il est aussi primordial de porter un équipement protecteur adéquat lors de la manipulation du formaldéhyde et du poumon tout au long de la fixation.**

- 4- Quand le système est bien connecté et installé dans la hotte chimique, la fixation peut débuter.
- 5- Ouvrir le robinet de la cruche au maximum pour débiter le flot de fixateur dans les voies respiratoires. Une pression plus grande que 30 cm est

requis au début de la fixation (environ 30 minutes) pour assurer l'ouverture de toutes les voies respiratoires avant que le formaldéhyde ne fixe le tissu (voir section 2.1). Une pression d'approximativement 36 cm d'H₂O est idéale. Ne pas mettre la pompe péristaltique en marche tout de suite à moins d'une fuite majeure.

- 6- Employer une règle pour mesurer la distance de 25-30 cm entre l'interface air-liquide de la cruche de fixateur et l'entrée de la tubulure dans le poumon pour s'assurer qu'elle reste constante. La fixation doit être observée étroitement au début de la procédure afin de rajouter du formaldéhyde dans la cruche si nécessaire et d'ajuster le système en cas de manque de pression ou de fuites.

NOTE : Il est possible que le niveau de fixateur baisse rapidement au début de la fixation, puisque le poumon se remplit et gonfle jusqu'à atteindre son volume maximal. Une fuite mineure n'est pas alarmante tant qu'elle est constante. Il peut être envisagé dans un tel cas de garder la pression à 30 cm d'H₂O plutôt qu'à 25 cm pour compenser pour la diminution de la pression créée par la fuite.

- 7- À mesure qu'il se fixe, le poumon se gonflera et changera graduellement de couleur pour passer d'une couleur rosée à une couleur brunâtre. Sa texture changera également de spongieuse et molle à plus ferme.
- 8- Après de 30 à 60 minutes, démarrer la pompe péristaltique afin de permettre le recyclage du fixateur. La pompe doit fonctionner de manière à ce que le fixateur soit dirigé du contenant du poumon vers la cruche de fixateur et non l'inverse.
- 9- Une quantité de fixateur s'accumule normalement au fond du contenant de plastique, puisque le système n'est jamais parfaitement étanche. Un fond

de 2-3 pouces de fixateur est idéal pour diminuer l'affaissement du poumon dû à la gravité.

10- Surveiller la fixation pour détecter les fuites néfastes au niveau de l'entrée de la tubulure dans la bronche principale ou dans la trachée, ou au niveau des gros vaisseaux du hile. Ces derniers peuvent être clampés à l'aide d'une pince hémostatique. Les fuites mineures provenant d'entailles au parenchyme ne peuvent être contrôlées et disparaissent généralement lorsque cette partie du tissu pulmonaire est fixée.

11- Couvrir complètement la surface du poumon de papiers absorbants imbibés de fixateur ou de saline durant la fixation, afin d'empêcher l'assèchement de la surface pulmonaire.



Figure 19. Le poumon est recouvert de papiers absorbants durant le processus de fixation.

- 12- Ajuster la hauteur du contenant de plastique ou de la cruche si nécessaire afin que la distance entre l'interface air-liquide de la cruche de fixateur et l'entrée de la tubulure dans le poumon soit égale à 25-30 cm. Cette distance assure de fixer le poumon à une pression hydrostatique constante de 25-30 cm.
- 13- Augmenter la vitesse de la pompe péristaltique quand le système atteint une pression égale ou inférieure à 25 cm d'H₂O (quand la distance entre l'interface air-liquide de la cruche de fixateur et l'entrée du fixateur dans le poumon est égal ou inférieur à 25cm), afin de recycler le fixateur.
- 14- La fixation du poumon équin avec du formaldéhyde tamponné 10% ou du Z-Fix© requiert environ 48 heures, afin que le parenchyme en entier soit fixé uniformément. Durant cette période, le système doit se situer dans la hotte chimique, la pression doit demeurer constante à 25-30 cm d'H₂O et la pompe péristaltique doit rester en marche.
- 15- Lorsque la fixation est complétée (i.e. que le poumon a une couleur brunâtre et a atteint son volume maximal), fermer le robinet de la cruche. Pour déconnecter le poumon, détacher la tubulure de l'adaptateur la reliant à la cruche de fixateur, puis couper le fil de suture rattachant le tube endotrachéal à l'aide d'une lame de scalpel.
- 16- Enlever le tube rapidement et apposer simultanément de grandes pinces hémostatiques pour refermer la bronche principale de manière étanche. La pression du système doit être conservée pour un minimum de 24 heures.
- 17- Mesurer les dimensions du poumon fixé et les noter (hauteur, largeur, longueur).
- 18- Recouvrir le poumon du fixateur contenu dans la cruche. Davantage de fixateur peut être nécessaire pour submerger le poumon complètement.

- 19- Le poumon fixé flottera dans le fixateur, alors le couvrir de papiers absorbants imbibés avant de mettre le couvercle. Fermer le contenant de plastique hermétiquement pour empêcher les émanations de formaldéhyde.
- 20- Entreposer idéalement dans un endroit ventilé et sécuritaire remplissant les normes d'entreposage des produits chimiques.

NOTE : Bien ventiler l'équipement qui a été en contact avec le fixateur dans la hotte chimique pendant quelques jours avant de le nettoyer et de le ranger.

Échantillonnage du poumon

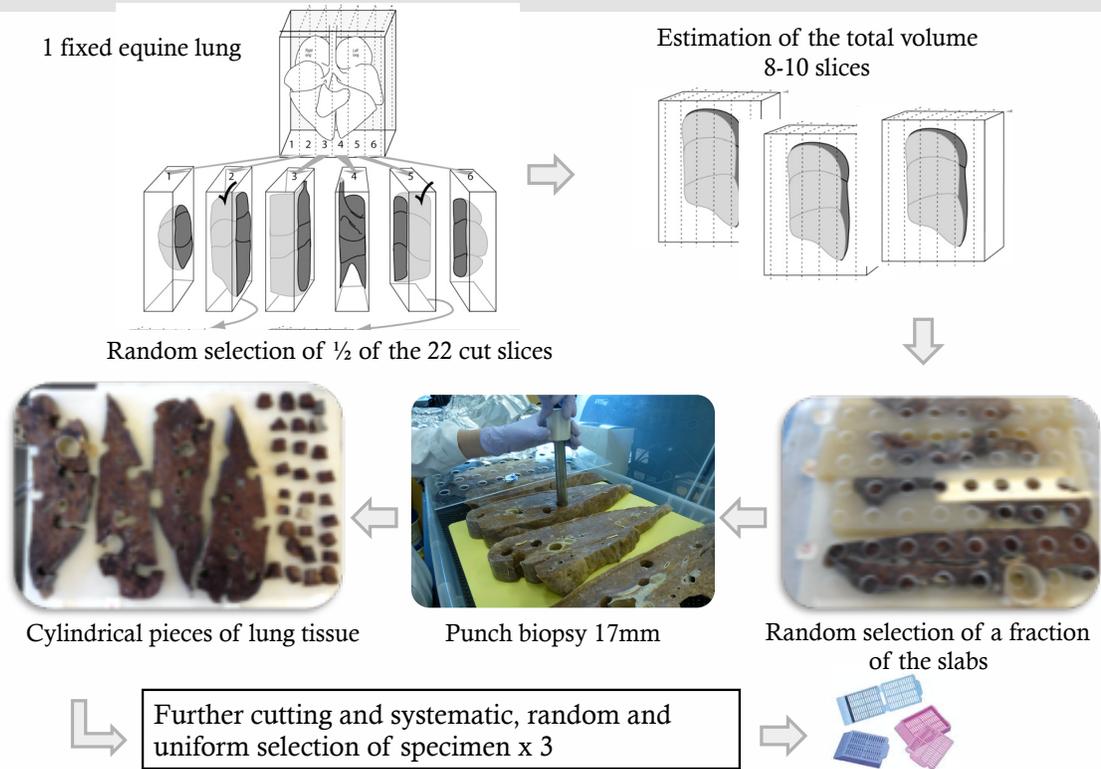


Figure 20. Schéma du processus d'échantillonnage : Toutes les étapes du protocole d'échantillonnage systématique, aléatoire et uniforme sont représentées dans ce schéma. Le poumon fixé est d'abord coupé en 21-22 tranches dont la moitié est sélectionnée pour l'estimation du volume total avec la méthode de Cavalieri. Une sélection aléatoire d'échantillons est alors effectuée à l'aide d'une planche de plexiglas avec des trous à intervalles réguliers. Un poinçon à biopsie de 17mm est utilisé pour prélever des cylindres de poumon qui seront ensuite coupés et recoupés selon la technique du « smooth fractionator ». Les principes de l'« isector » et de la section verticale sont incorporés dans le protocole pour obtenir un total de 8-10 échantillons de tissu pulmonaire par type de spécimens, qui seront traités et mis en paraffine.

Liste de matériel

- Agar (voir section 4.1.4)
- Cahier de notes
- Caméra numérique
- Cassettes (grandes) 1 cm d'épaisseur x 2,5 cm de hauteur x 2,5 cm de largeur (Ultident Scientific, M490-2)
- Cassettes (petites) 0,5 cm d'épaisseur x 2,5 cm de hauteur x 2,5 cm de largeur (Ultident Scientific, M490-10)
- Contenant de verre/plastique allant au four micro-ondes
- Couteau avec une lame de 30 cm
- Équipement de protection mentionné précédemment adapté à l'utilisation du formaldéhyde (lunettes, masque, sarrau, gants de néoprène/nitrile).
- Feutre permanent
- Grand couteau en acier de 60 cm (fabriqué sur mesure par Affû-Cut, 38 rue Dion, St-Liboire (Québec), J0H 1R0)
- Grandes planches à découper
- Grille de plexiglas contenant des trous de diamètre constant et à égale distance les uns des autres (fabriquée sur mesure)
- Horloge uniforme plastifiée (voir annexes A)
- Hotte chimique
- « Isector » de taille adéquate
- Four micro-ondes
- Papier métrique plastifié
- Film plastique
- Pipettes pasteur en plastique
- Poinçon à biopsie 17 mm (fabriqué sur mesure par Affû-Cut, 38 rue Dion, St-Liboire (Québec), J0H 1R0)

- Pots de fixateur avec couvercles pour y mettre les cassettes et les tissus non utilisés
- Règle de 30 cm et règle d'un mètre
- Ruban adhésif blanc
- Saline
- Scalpel et lame de scalpel #10
- Seringue 3ml et aiguille 14/16G
- Spatule en silicone à mélanger
- Station de photographie et lampes de table (2)
- Table de chiffres aléatoires
- Thermomètre à mercure

Coupe du poumon pour le calcul du volume de référence avec la méthode de Cavalieri

Coupe du poumon entier en tranches

La première étape de l'échantillonnage est de trancher le poumon fixé en sections d'épaisseur égale. Les tranches générées permettront l'estimation du volume pulmonaire total avec la méthode de Cavalieri (voir section 2.2.4.2.1).

Liste de matériel

- Cahier de notes
- Grande planche à découper
- Grand couteau en acier de 60 cm (fabriqué sur mesure)
- Règle de un mètre et/ou règle de 30 cm
- Table de chiffres aléatoires

Procédure

Toujours s'assurer de porter l'équipement de protection et d'effectuer la majorité des manipulations sous la hotte chimique avec la porte fermée au maximum.

- 1- Le poumon est coupé en tranches d'une épaisseur constante T de 2,5 cm. Le nombre de tranches générées varie selon la longueur du poumon, mais se situe entre 20 à 22 tranches par poumon.
- 2- Pour effectuer la première coupe, sélectionner un chiffre dans l'intervalle 0 à T , donc entre 0 et 2,5 cm, à l'aide d'une table de chiffre aléatoire (voir section 4.6). Par exemple, si 2 est le chiffre choisi de la table de chiffre aléatoire alors la première coupe est effectuée à 2 cm de l'une des extrémités du poumon.
- 3- Utiliser une règle comme guide de coupe. Celle-ci doit idéalement être plus grande que la longueur totale du poumon afin de mesurer l'épaisseur de chaque tranche. Si une règle plus petite est utilisée, celle-ci ne doit pas être glissée pour reprendre à zéro après chaque coupe. Des erreurs de mesure de quelques millimètres sont normales et l'épaisseur plus grande d'une tranche par exemple sera compensée par l'épaisseur plus petite de la prochaine.
- 4- Placer le poumon sur une grande planche à découper et à l'aide du grand couteau d'acier de 60 cm bien aiguisé, faire des tranches parallèles et d'épaisseur égale. Effectuer idéalement un seul mouvement de coupe en va-et-vient par tranche.
- 5- Couper toutes les tranches subséquentes à la première à un intervalle égal à la position de la coupe précédente additionnée de l'épaisseur de 2,5 cm requise (valeur de « T »). Par exemple, la deuxième coupe sera effectuée à 4,5 cm si la première coupe était à 2 cm de l'extrémité du poumon, la

troisième à 7,5 cm, et ainsi de suite, jusqu'à ce que le poumon soit sectionné en entier.

- 6- Laisser tomber les tranches coupées de façon à ce que la même surface soit toujours vers le haut. **La surface supérieure des tranches doit être conservée tout au long des manipulations.**
- 7- Un total de 8 à 10 tranches est nécessaire pour estimer le volume pulmonaire total à l'aide de la méthode de Cavalieri. La sélection de ces tranches doit se faire de manière aléatoire et systématique. Sélectionner une fraction $1/f$ de tranches et un départ aléatoire dans l'intervalle 1 à f à l'aide d'une table de chiffres aléatoires (le départ aléatoire est toujours dans l'intervalle 1 à f , pour une fraction donnée $1/f$). Par exemple, pour obtenir 8-10 tranches des 20-22 tranches coupées, prendre la fraction $\frac{1}{2}$ (dans cet exemple f est égal à 2, et donc, la table aléatoire permettrait de choisir les chiffres 0, 1 ou 2). Pour un départ aléatoire de 1, la 1^{ère} tranche est prise, puis la 3^e, la 5^e, la 7^e, etc.
- 8- Si une des extrémités du poumon est sélectionnée, la surface supérieure doit être sa surface coupée, sinon elle est mise de côté et n'est pas incluse pour les étapes subséquentes.

Photographie des tranches

Liste de matériel

- Caméra numérique
- Collant identifiant le numéro de la tranche
- Contenant distributeur de saline
- Équipement protecteur adapté au formaldéhyde (lunettes, masque, sarrau, gants de néoprène/nitrile)
- Grande planche à découper pour y disposer les tranches
- Lampes de table

- Film plastique
- Règles (2)/équerre ou papier métrique plastifié
- Station de prise de photos

Procédure

- 1- Installer la station de photographie sur un comptoir du laboratoire et bien y fixer la caméra en la vissant à la barre verticale du centre. La mettre à une hauteur permettant de faire un foyer adéquat sur l'ensemble de la tranche et garder cette même hauteur pour toutes les tranches. Une hauteur de 65 cm est optimale dans la plupart des cas. NOTE : Si la hauteur est changée, le grossissement final de la photo sera modifié et variable entre les différentes photos des tranches.
- 2- S'assurer que le numéro de la tranche est bien visible.
- 3- Utiliser deux règles à angle droit, une équerre ou du papier métrique plastifié pour donner la calibration. Surélever les règles ou le papier métrique au même niveau que la surface supérieure de la tranche. S'assurer qu'elle est située au même endroit et au focus pour toutes les tranches. Cette étape servira par la suite à ajuster la calibration des images dans le logiciel Vis© version 4.3.2, (Visiopharm A/S, www.visiopharm.com).
- 4- Prendre la photo de chacune des tranches, en s'assurant que l'éclairage est optimal. La délimitation de chaque tranche doit être bien identifiable sur chaque photo. Prendre notes des ambiguïtés pour aider à l'analyse subséquente des images.



Figure 21. Image de l'installation d'une tranche de poumon pour la prise de photo. Les règles à angle droit sont utilisées pour mesurer la calibration.

- 5- Une fois les photos prises, l'échantillonnage peut débuter. NOTE : Visionner les photos et vérifier leur qualité avant de procéder au reste des étapes de l'échantillonnage.
- 6- Calculer le coefficient d'erreur (CE) de l'estimateur (voir section 2.2.4.2.1.1).

« Smooth Fractionator »

Cette méthode est destinée à générer à partir d'un organe, des échantillons prélevés de façon aléatoire, uniforme et systématique, tout en introduisant un minimum de variation lors de l'échantillonnage.

Durant cette procédure, les tranches de poumon utilisées pour l'estimation du volume pulmonaire totale sont coupées davantage en barres, puis en blocs de manière à obtenir systématiquement et aléatoirement des échantillons de dimensions adaptées aux cassettes de mise en paraffine (voir section 2.2.7.1.2).

Procédure

IMPORTANT: Toujours prendre note des fractions sélectionnées à chaque niveau de l'échantillonnage dans un cahier de notes, ainsi que du nombre total de barres et de blocs générés lors des différentes étapes (voir section 2.2.7.1.1).

- 1- Les 8-10 tranches de poumon employées pour le calcul du volume pulmonaire total sont échantillonnées pour obtenir deux séries de spécimens : des échantillons isotropiques avec l' « isector » et des sections verticales (voir section 4.4.4).
- 2- Chacune des tranches est échantillonnée à l'aide d'une grille de plexiglas contenant des trous à intervalle régulier. Disposer les tranches de poumon sur de grandes planches à découper, en conservant toujours la même surface coupée vers le haut.
- 3- La grille de plexiglas est superposée aléatoirement sur le dessus des tranches. Une fraction des trous de la grille sera sélectionnée de manière aléatoire et systématique, à partir d'un départ aléatoire.



Figure 22. Image de la planche de plexiglas superposée sur une tranche de poumon.

- 4- Choisir une fraction $1/f$ des trous, de manière à obtenir un total d'environ 60 échantillons à partir des 8-10 tranches de poumon; 30 pour les échantillons isotropiques avec l'« isector » et 30 échantillons pour les sections verticales. Un départ aléatoire dans l'intervalle 1 à f est choisi à l'aide d'une table de chiffres aléatoires. Le premier trou sera le $x^{\text{ème}}$, x correspondant au départ aléatoire, et les trous suivants seront $x1+f$, $x2+f$, $x3+f$, etc. en commençant la sélection du coin haut gauche de la grille.
- 5- Pour chacun des trous échantillonnés contenant du tissu pulmonaire, un spécimen est prélevé à l'aide d'un poinçon à biopsie de 17 mm (fabriqué sur mesure). Un mouvement unique et circulaire permettra de dégager le morceau cylindrique de poumon. Chaque trou qui ne renferme pas de tissu pulmonaire est ignoré et la sélection est continuée.



Figure 23. Image du poinçon à biopsie de 17 mm.

- 6- Les trous contenant partiellement du tissu pulmonaire sont aussi utilisés pour générer des échantillons. Chaque échantillon est mis de côté, en conservant la même surface vers le haut.



Figure 24. Image du prélèvement des échantillons avec le poinçon à biopsie de 17 mm.



Figure 25. Image des cylindres de poumon générés avec le poinçon à biopsie (Dimensions : 17 mm x 2,5 cm).

- 7- Parcourir la totalité de la grille jusqu'à atteindre le coin bas à droite.
- 8- Les étapes 4 à 7 sont répétées jusqu'à ce que toutes les tranches aient été échantillonnées. Chaque fois, un nouveau départ aléatoire dans l'intervalle 1 à f est choisi de la table de chiffres aléatoires.
- 9- Les échantillons ainsi obtenus seront désorientés et coupés davantage pour entrer dans les cassettes pour la mise en paraffine.

« Smooth Fractionator »

- 10- Le nombre total de morceaux cylindriques recueillis (environ 60 cylindres) est utilisé pour suivre les étapes du « smooth fractionator » (voir section 2.2.7.1.2).
- 11- Premièrement, les cylindres doivent être disposés en forme de fer à cheval, de la plus petite pièce, à la plus grande puis à la plus petite, de manière à former une distribution uniforme. Sur une surface plane, ordonner les cylindres selon leur grosseur en utilisant leur surface supérieure pour le classement, de la plus grande à la plus petite pièce de poumon, en

plusieurs rangées subséquentes. Puis, pousser un cylindre sur deux vers le haut de façon à créer une rangée additionnelle. Le nombre de rangées d'échantillons a maintenant doublé.

- 12- Numéroté toutes les rangées obtenues, pour obtenir le même arrangement que celui d'un fer à cheval : de la plus petite pièce de poumon à la plus grande, pour revenir à la plus petite pièce.
- 13- Pour chaque série d'échantillons (une série pour les échantillons « isector » et une série pour les sections verticales), environ 10 morceaux cylindriques doivent être échantillonnés à l'aide du « smooth fractionator ».
- 14- Sélectionner une fraction $1/f$ et un départ aléatoire dans l'intervalle 1 à f au moyen d'une table de chiffres aléatoires. La fraction est choisie de manière à ce que 10 échantillons soient recueillis pour chacune des séries à la fin de la procédure. Prendre note de la fraction choisie. Par exemple, si $1/6$ des cylindres doit être échantillonné, le départ aléatoire est sélectionné dans l'intervalle de 1 à 6. Si le départ aléatoire est le chiffre 3, alors le 3^e cylindre de la rangée numéro 1 est retenu, puis le 6^e, le 9^e, le 12^e, et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les rangées numérotées aient été parcourues.
- 15- Garder l'arrangement des échantillons intact après la sélection des 10 premiers cylindres. Une nouvelle fraction sera choisie pour recueillir une série additionnelle de 10 cylindres.
- 16- Du papier absorbant imbibé de saline est utilisé pour recouvrir les échantillons afin de prévenir le dessèchement du tissu pulmonaire.
- 17- Compter le nombre de cylindres sélectionnés précédemment afin de s'assurer d'avoir en mains 8 à 10 échantillons. Si le nombre est adéquat, les mettre de côté pour la prochaine étape.

Pour les échantillons utilisés pour les sections verticales, s'assurer de toujours pouvoir identifier l'axe vertical à toutes les étapes de l'échantillonnage. L'axe vertical est l'axe long du morceau de cylindre et est parallèle à l'axe de coupe de l'échantillon en paraffine.

18- À ce moment-ci, l'identification de l'axe vertical est primordiale. Un coin sur chacun des cylindres peut être coupé qui correspondra au bas de l'axe vertical. Le coin coupé permettra de pouvoir identifier l'axe vertical jusqu'à la mise en cassette.

19- Suivre les sections 4.4.4.1 ou 4.4.4.2 selon le type d'échantillon à générer :
« isector » ou sections verticales.

Échantillonnage aléatoire, isotropique et uniforme

« Isector »

L'isotropie d'un échantillon est obtenue dans les dernières étapes de cette section à l'aide de l' « isector » (voir section 4.1.5) [29].

IMPORTANT : Toujours noter les fractions choisies lors de l'échantillonnage ET le nombre total de tranches, barres et blocs de poumon générés lors des différentes étapes.

- 1- Une série de 10 cylindres ont été sélectionnés à l'aide du « smooth fractionator » pour devenir des échantillons isotropiques, uniformes et aléatoires.
- 2- Couper les cylindres sur la longueur en des blocs ayant une hauteur d'environ 0,8 à 1 cm si de grandes cassettes sont utilisées, ou ayant une hauteur de 0,5 cm ou moins si les petites cassettes sont

utilisées. Conséquemment, choisir un « isector » de diamètre approprié.

- 3- Basculer les échantillons dans la même direction afin de les couper dans le sens de la hauteur (i.e. l'épaisseur de la tranche), de manière à ce que la même surface coupée soit toujours sur le dessus. À l'aide d'une règle ou de papier métrique plastifié, couper les cylindres en des blocs de 1 cm. Se rappeler que les blocs doivent être insérés dans les cavités de l' « isector » de 1,5 cm de diamètre.
- 4- Les échantillons finaux sont des blocs de poumon de 17 mm de diamètre x 1 cm de hauteur. NOTE : Les échantillons obtenus des contours du poumon auront des dimensions différentes, mais devraient répondre aux dimensions requises.
- 5- Un deuxième « smooth fractionator » est effectué avec tous les blocs générés, comme décrit précédemment (voir section 4.4.3). Ordonner d'abord les blocs du plus petit au plus grand selon leur grosseur. Arranger ensuite les blocs en une forme de fer à cheval, en allant de la plus petite à la plus grande à la plus petite pièce de poumon, en poussant une pièce sur deux vers le haut et en numérotant toutes les rangées obtenues. La rangée numéro un sera la première rangée de plus petites pièces, puis la première rangée de moyennes pièces sera la rangée numéro deux, et ainsi de suite jusqu'à revenir à la dernière rangée qui contiendra aussi les plus petites pièces de poumon.
- 6- Une nouvelle fraction $1/f$ est choisie de manière à obtenir un total de 10 échantillons au total (il devrait y avoir environ 30 pièces desquelles choisir en tout). Prendre note de la fraction choisie.

Garder en tête qu'il faut un total de 10 pièces par poumon par animal pour chaque série – « isector » et sections verticales - à la fin de l'échantillonnage.

- 7- À partir de la table de chiffres aléatoires, choisir un nombre dans l'intervalle 1 à f . Par exemple, si le $1/3$ des blocs doit être retenu, il faut un départ aléatoire entre 1 et 3. Si le chiffre obtenu est le 2, alors la deuxième pièce de la rangée 1 sera retenue, puis la 5^e, puis la 8^e, etc. jusqu'à ce que toutes les rangées aient été parcourues.
- 8- Compter le nombre d'échantillons sélectionnés et noter le nombre obtenu. Entre 8 et 10 blocs sont suffisants. Pour un nombre moindre, recommencer le procédé en utilisant une fraction plus petite. Si le nombre total est suffisant, mettre les blocs de côté pour les prochaines étapes.
- 9- Les blocs devraient avoir des dimensions de 17 mm de diamètre x 1 cm de hauteur, ce qui est trop grand pour entrer dans les cavités sphériques du « isector » de 1,5 cm de diamètre. Les échantillons doivent être coupés davantage pour atteindre une dimension de 1 x 1 x 1 cm. NOTE : Si l'échantillon est trop grand, le tissu pulmonaire sera comprimé une fois mis en paraffine et les sections de tissus générées ensuite auront une architecture déformée.
- 10- Une fois les blocs coupés en échantillons plus petits (ayant tous la même dimension), simplement choisir une fraction $1/f$ des blocs à retenir pour finalement obtenir un total de 10 échantillons. Un « smooth fractionator » n'est pas requis ici puisque les échantillons de poumon ont tous les mêmes dimensions.

Le principe de l' « isector » est de former des billes d'agar d'une surface uniforme contenant les blocs de poumons échantillonnés. La surface lisse des billes leur permet de rouler librement et de s'arrêter dans une direction complètement aléatoire.

- 11- Chauffer une petite quantité d'agar (voir section 4.1.4) aux micro-ondes pour atteindre une consistance liquide (température > 85 degrés Celsius). Environ 1-2 ml d'agar liquide est nécessaire par échantillon, dépendamment de la grosseur des cavités sphériques de l' « isector » utilisé.
- 12- Employer un thermomètre à mercure pour vérifier la température de l'agar avant de le verser sur les spécimens. Celle-ci doit être d'environ 50 à 60 degrés Celsius, température au-dessus de laquelle des dommages peuvent être causés au tissu pulmonaire.
- 13- Utiliser une pince Adson mousse pour délicatement ouvrir l'ouverture des cavités de l' « isector » et y insérer les échantillons (cubes de 1 x 1 x 1 cm). Il peut être nécessaire d'effectuer une petite pression sur le tissu pour le faire entrer complètement.
- 14- Injecter l'agar à la bonne température dans chaque cavité contenant un échantillon, à l'aide d'une pipette pasteur ou d'une seringue montée d'une aiguille, en faisant bien attention d'en mettre tout autour du tissu. NOTE : S'il manque d'agar autour du cube, la surface de la bille d'agar ne sera pas régulière et ne roulera pas librement.
- 15- Envelopper chaque « isector » dans un film plastique et le mettre à 4 degrés Celsius pour la nuit ou pour quelques heures afin que l'agar gélifie autour des échantillons.

- 16- Effectuer le démoulage des billes d'agar sur une surface plane, tel le comptoir de travail du laboratoire. Une surface assez grande doit être dégagée de tout obstacle afin que les billes puissent rouler librement avant de s'arrêter. Un objet avec surface perpendiculaire au comptoir peut être utilisé pour bloquer les billes dans leur mouvement.
- 17- Appliquer une pression à l'arrière de chaque cavité sphérique de l' « isector » pour forcer l'expulsion de la bille d'agar. **Attention : Il est facile de perdre les billes car elles roulent et rebondissent partout !**
- 18- Une fois arrêtée dans une position aléatoire, couper chacune des billes en deux parties égales prenant les précautions nécessaires pour qu'elles restent dans la même position.

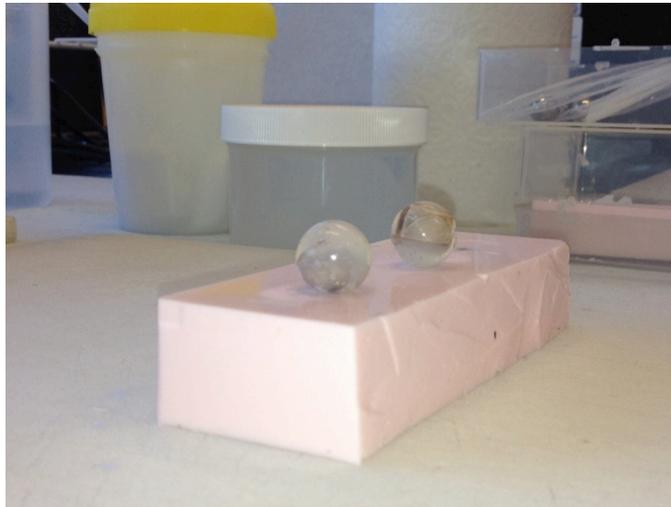


Figure 26. Image de l' « isector » et des billes d'agar contenant chacune un spécimen pulmonaire.

19- Insérer chaque moitié de bille dans une cassette d'une dimension de 1.5 cm d'épaisseur (grandes cassettes). Deux échantillons peuvent être mis ensemble dans une même cassette.

20- Mettre les cassettes dans le formol 10% ou le Z-Fix© pour les conserver avant le traitement et la mise en paraffine.

NOTE : Les tissus fixés avec le Z-Fix© ne doivent pas aller dans les premiers bains de formaldéhyde du protocole de traitement des tissus. Demander à ce que le circuit soit débuté au premier bain d'éthanol. S'ils sont traités dans le premier bain de formaldéhyde, alors rincer les échantillons dans l'eau avant de continuer le circuit.

Échantillonnage des sections verticales

Une section verticale est une section générée dans l'axe normal (i.e. à 90 degrés) à l'axe horizontal. L'axe horizontal peut-être l'axe horizontal de l'organe en position physiologique ou un axe déterminé par le manipulateur. Les sections verticales nous permettent d'estimer des paramètres stéréologiques de structures anisotropiques. Les échantillons sont désorientés dans leur axe vertical seulement, permettant ainsi la reconnaissance de l'architecture tissulaire au niveau microscopique. Elles permettent également d'analyser quantitativement des structures pulmonaires telles les grosses voies respiratoires du poumon. La désorientation en trois dimensions est complétée lorsque la grille de sondes isotropiques est apposée sur la section tissulaire (voir section 2.2.7.2). Cette dernière étape est effectuée une fois les images des sections histologiques importées dans le logiciel de stéréologie de Vis© [15, 27, 48].

IMPORTANT : Toujours noter les fractions choisies lors de l'échantillonnage ET garder la localisation de l'axe vertical sur les échantillons ET le nombre total de tranches, barres et blocs générés lors des différentes étapes.

- 1- Une série de 10 cylindres ont été sélectionnés à l'aide du « smooth fractionator » pour devenir des sections verticales.
- 2- Les cylindres obtenus ont une dimension de 17 mm de diamètre x 2,5 cm de hauteur. Afin que les sections verticales aient une direction aléatoire dans leur axe vertical, les cylindres sont tournés à un angle aléatoire autour de cet axe avant d'être coupés.

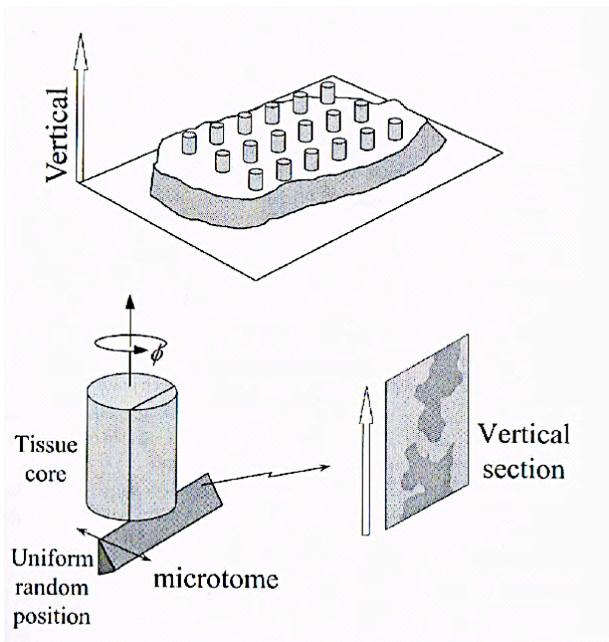


Figure 27. Sections verticales : Des morceaux cylindriques de poumons sont prélevés de chacune des tranches. Chaque cylindre est ensuite tourné autour de son axe avant d'être coupé dans un angle aléatoire. *Modifié de Howard & Reed, 2010 [15].*

- 3- Pour être désorienté dans l'axe vertical, le premier cylindre est mis sur l'image d'une horloge uniforme plastifiée (voir annexe A). Une ligne imaginaire traversant son diamètre doit être mise parallèle à la ligne 0 ou la ligne 18-36 degrés de l'horloge. **Toujours suivre la position de l'axe vertical pour qu'il soit identifiable à toutes les étapes de l'échantillonnage.**

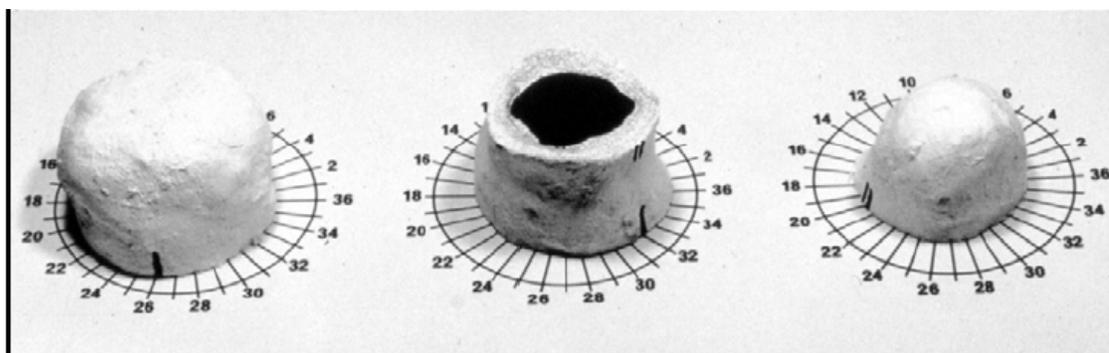


Figure 28. Sections verticales : Les cylindres sont tournés autour de leur axe vertical à un angle aléatoire. Cet angle est déterminé à l'aide d'une horloge uniforme. *Modifié de Baddeley et al., 1986 [27].*

- 4- L'horloge permet de couper les cylindres à un angle aléatoire autour de leur axe vertical. Un angle aléatoire est sélectionné en choisissant un nombre aléatoire entre 0 et 36 (i.e. les nombres possibles correspondant aux angles de l'horloge) à partir d'une table de chiffres aléatoires.
- 5- Le premier angle est déterminé de manière complètement aléatoire. Les angles utilisés pour les autres cylindres seront systématiquement choisis en fonction du premier angle et du nombre de cylindres à désorienter. Par exemple, si le premier angle obtenu est de 18° et qu'il y a 10 cylindres, le deuxième angle sera de 54° ($[360^\circ/10 \text{ cylindres}] + 18^\circ$), le 3^e sera de 90° , et ainsi de suite pour tous les cylindres. Ce procédé permet de systématiquement couvrir tous les angles possibles de manière aléatoire.
- 6- Le cylindre est coupé selon l'angle sélectionné le long de son axe vertical, de façon à ce que le diamètre total du cylindre soit plus

- petit que 1,5 cm si les grandes cassettes blanches sont utilisées ou plus petit que 1 cm si les petites cassettes vertes sont employées.
- 7- Les morceaux obtenus doivent être coupés dans le sens de la longueur afin qu'ils puissent entrer dans les cassettes (hauteur de 2 cm). Basculer les échantillons dans la même direction afin de les couper dans le sens de la hauteur (i.e. l'épaisseur de la tranche), de manière à pouvoir identifier l'axe vertical. À l'aide d'une règle ou de papier métrique plastifié, couper les cylindres en deux blocs d'environ 1,7 cm de hauteur.
 - 8- Les échantillons finaux sont des blocs de poumon de moins de 17 mm de diamètre x 1,7 cm de hauteur. NOTE : Les échantillons obtenus des contours du poumon auront des dimensions différentes, mais devraient répondre aux dimensions requises pour la cassette.
 - 9- Un deuxième « smooth fractionator » est effectué avec tous les blocs générés, comme décrit précédemment. Ordonner d'abord les blocs du plus petit au plus grand selon leur grosseur. Arranger ensuite les blocs en forme de fer à cheval, en allant de la plus petite pièce de poumon à la plus grande, pour revenir à la plus petite pièce, en poussant une pièce sur deux vers le haut et en numérotant toutes les rangées obtenues. La rangée numéro un sera la première rangée de plus petites pièces, puis la première rangée de moyennes pièces sera la rangée numéro deux, et ainsi de suite jusqu'à revenir à la dernière rangée qui contiendra aussi les plus petites pièces de poumon.
 - 10- Une nouvelle fraction $1/f$ est choisie de manière à obtenir un total de 10 pièces (il devrait y avoir environ 20-30 pièces desquelles choisir en tout). Prendre note de la fraction choisie.

Garder en tête qu'il faut un total de 10 pièces par poumon par animal pour chaque série – « isector » et sections verticales - à la fin de l'échantillonnage.

11- À partir de la table de chiffres aléatoires, choisir un nombre dans l'intervalle 1 à f . Par exemple, si le $\frac{1}{3}$ des blocs doit être retenu, il faut un départ aléatoire entre 1 et 3. Si le chiffre obtenu est le 2, alors la deuxième pièce de la rangée 1 sera retenue, puis la 5^e, puis la 8^e, etc. jusqu'à ce que toutes les rangées aient été parcourues.

12- Compter le nombre d'échantillons sélectionnés et noter le nombre obtenu. Entre 8 et 10 blocs est suffisant. S'il y en a moins, recommencer le procédé en utilisant une fraction plus grande. Si le nombre total est suffisant, mettre les blocs de côtés pour les prochaines étapes.

13- Les blocs de tissu pulmonaire ainsi échantillonnés sont finalement mis en cassettes, puis les cassettes mises dans un contenant de fixateur. Il seront ensuite traités et mis en paraffine. Les tissus doivent être positionnés dans la cassette de manière à ce que la coupe des sections au microtome se fasse le long de leur axe vertical. L'axe vertical devrait toujours être parallèle au même rebord de la cassette pour aider à son identification (l'axe vertical est parallèle à l'axe long de la cassette). NOTE : La surface du bloc mise vers le bas sera la première à être sectionnée au microtome.

14- Un des coins inférieurs des échantillons peut également être coupé comme décrit précédemment afin d'aider à l'identification de l'axe vertical.

Mesure du rétrécissement des tissus par l'enrobage à la paraffine

- 1- Les dimensions –hauteur, largeur, épaisseur- d'un bloc de poumon fixé avant le traitement et la mise en paraffine sont mesurées. Le bloc est identifié, par exemple à l'aide d'un crayon de plomb pour être reconnaissable une fois mis en paraffine.
- 2- Les mêmes dimensions sont mesurées et notées une fois le bloc en paraffine. Ces dimensions permettent de calculer le degré de rétrécissement amené par le traitement et la mise en paraffine.
- 3- Le processus peut également être répété sur les sections histologiques pour mesurer le rétrécissement amené par la coupe au microtome. Par contre, seulement le rétrécissement dans les axes de la hauteur et la largeur du bloc pourra être calculé (un microscope confocal ou un étrier est nécessaire pour déterminer le rétrécissement dans l'axe de l'épaisseur).
- 4- Insérer les valeurs obtenues dans la formule de calcul du rétrécissement :

Volume avant le traitement – volume après le traitement

Volume avant le traitement

- 5- Noter le degré de rétrécissement calculé dans un cahier pour pouvoir corriger les estimations de paramètres géométriques obtenues sur les sections histologiques [15, 42].

Comment utiliser une table de chiffres aléatoires

- 1- Décider de l'intervalle dans lequel on veut choisir le/les nombres, par exemple de 1 à 10 s'il y a dix objets possibles dans la sélection. Les nombres sélectionnés dans la table doivent alors contenir deux chiffres pour que le 10 puisse aussi être choisi, par exemple : 01, 02, 03,10.
- 2- Une table de chiffres aléatoires peut être parcourue vers le haut, le bas, vers la gauche ou la droite. Le départ pour la sélection des chiffres doit toujours être dans la même direction afin de parcourir la table chaque fois de la même façon. Par exemple, parcourir de gauche à droite, lisant les lignes du haut vers le bas de la table.
- 3- Pointer le doigt, au hasard à un endroit sur la table, ceci sélectionnera le premier chiffre/nombre.
- 4- Si le chiffre/nombre correspond à ce qui est recherché, c'est-à-dire s'il est compris dans l'intervalle 0 à 10 par exemple, le conserver. Sinon, continuer la lecture de la ligne jusqu'au chiffre/nombre rencontrant les critères désirés, **en suivant toujours la direction choisie auparavant.**
- 5- Pour sélectionner plus d'un chiffre/nombre pour la même procédure, continuer le long de la même ligne, en prenant tous les chiffres/nombres compris dans l'intervalle choisi. Si un chiffre/nombre a déjà été choisi et qu'il revient dans la table, simplement l'ignorer et continuer la lecture.
- 6- Si des décimales sont requises, les chiffres de la table peuvent être considérés comme des décimales. Par exemple, pour un intervalle de 0 à 1,0, alors les chiffres sélectionnés pourraient être 0 ; 0,1 ; 0,2 ; ...1,0 [15, 50].

Pour obtenir une table de chiffre aléatoire voir :

Hill AB. A short textbook of medical statistics. Hodder and Stoughton, Londres, 1977 [51].

Discussion

Application de la stéréologie

L'approche stéréologique promet efficacité, précision et validité des données scientifiques générées. Ses bases mathématiques statistiques et géométriques font d'elle une technique sans biais tant que les principes et procédures sont suivis à la lettre et appliqués sans faille [3, 15]. En conséquence, son application requiert un niveau de compréhension de ses bases mathématiques et d'expertise pour l'application de ses principes afin d'éviter leur mauvaise application dans une étude scientifique [1, 52]. L'établissement d'un protocole d'échantillonnage pour l'application de cette méthode chez le cheval, tel que développé dans cette étude, demande en plus de bonnes bases théoriques, une méthodologie élaborée sans biais pour assurer des échantillons représentant bien l'organe de départ. Comme les biais sont difficilement détectables à partir des données d'une étude, une grande attention doit être portée à l'élaboration de protocoles d'échantillonnage et d'analyse selon les principes de la stéréologie. Chaque étape du protocole doit être optimisée pour l'organe et l'espèce à l'étude [14]. Une compréhension inadéquate des règles à suivre, des concepts théoriques et de l'utilisation des divers outils disponibles peut amener à des erreurs dans l'approche d'un problème scientifique et donc à la génération de données non valides. Pour faciliter la tâche des scientifiques, l'ATS et l'ERS ont donc publié une série de lignes directrices en 2010 pour l'étude quantitative du poumon avec la stéréologie [3].

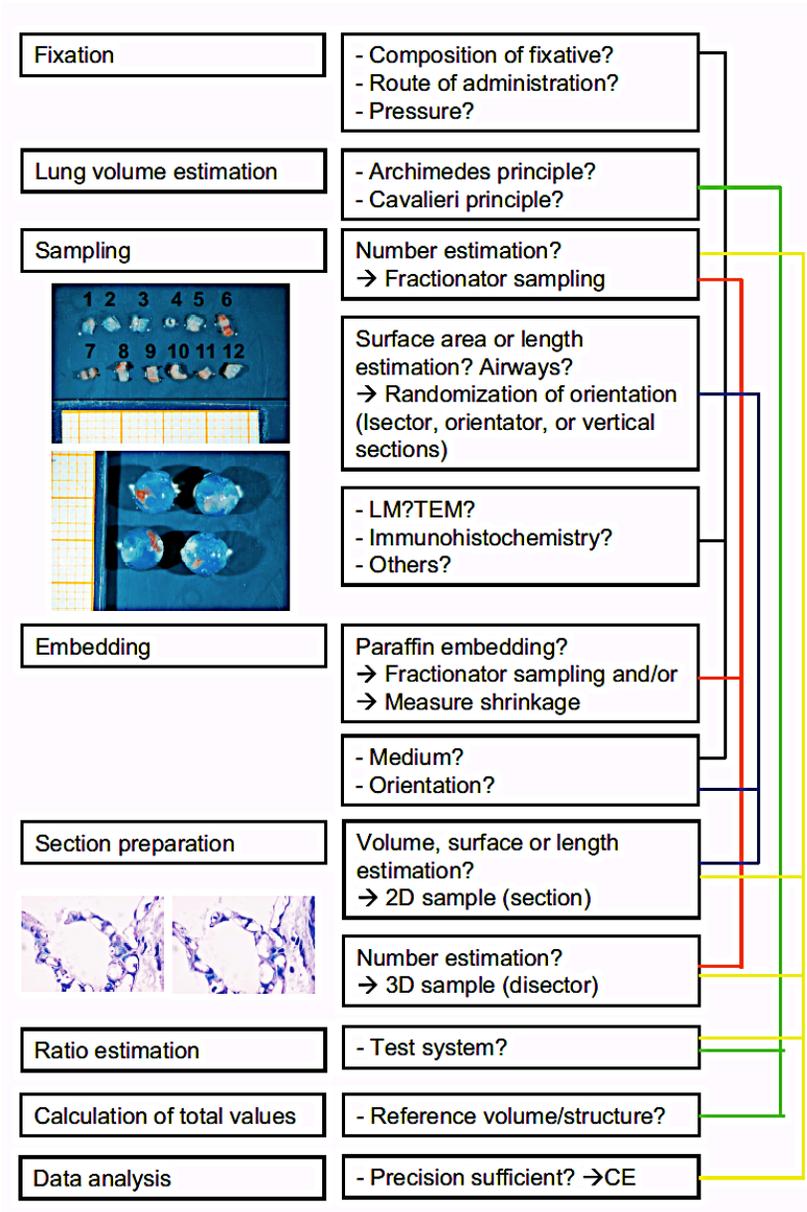


Figure 29. Algorithme représentant l'approche quantitative par stéréologie pour l'étude du poumon. Il démontre la complexité d'un tel design scientifique et l'importance de définir les questions scientifiques à chaque niveau de l'étude. La colonne de gauche représente les étapes à suivre et la colonne de droite démontre les aspects à considérer à chaque étape. *Modifié de Ochs et al., 2013 [14].*

Les réponses à plusieurs problèmes scientifiques, notamment morphométriques et tissulaires, sont accessibles via la stéréologie. Elle constitue une approche qui permet de quantifier une structure d'intérêt dans un organe en son entier, un avantage considérable par rapport aux autres techniques de morphométrie usuelles [1]. Un protocole d'échantillonnage adoptant une méthode systématique, uniforme et aléatoire et permettant la collecte d'échantillons isotropiques assure que la plupart des paramètres stéréologiques pourront être évalués pour un animal donné [3]. De plus, l'essor et le développement de plusieurs outils récents, permettent maintenant l'estimation de nouveaux paramètres stéréologiques, adressant des caractéristiques structurelles différentes du poumon, et définissant davantage la relation structure-fonction pulmonaire [32].

Dès le début d'une étude, une question scientifique bien définie doit être établie afin de déterminer les meilleurs paramètres stéréologiques à estimer pour y répondre. Puis, le protocole d'échantillonnage et d'analyse est élaboré, étape par étape, en suivant bien les différents niveaux tissulaires qui seront étudiés, pour finalement définir les grilles tests à employer au niveau microscopique [14]. Pour les gens non expérimentés avec la stéréologie, l'établissement du design d'une étude et du protocole d'échantillonnage, si non encore adapté à l'organe et à l'espèce d'intérêt, demandera un investissement important de temps et l'acquisition de l'expertise requise. Par contre, une fois l'approche établie et le protocole développé pour un organe, son application devient beaucoup plus facile et permet de tirer des conclusions valides sur la physiologie, la génétique et les relations entre les changements tissulaires et les maladies ou leurs traitements.

La stéréologie ne représente pas la technique de choix pour l'évaluation qualitative d'un tissu par ailleurs. La caractérisation d'une lésion localisée spécifique, bien que possible en adaptant les protocoles d'analyse rencontrant les principes de l'échantillonnage aléatoire, uniforme et systématique localement pour effectuer une sélection de certaines régions au niveau tissulaire, ne permet pas de

tirer des conclusions sur l'organe en son entier. Tel est le cas pour l'analyse de biopsies endobronchiques ou prélevées par thoracoscopie, pour lesquelles les spécimens sont recueillis à des localisations prédéterminées, limitant ainsi la portion aléatoire de l'échantillonnage [3, 53]. Les paramètres stéréologiques doivent également être adaptés puisque les densités mesurées sur les lames histologiques avec les grilles tests ne peuvent être rapportées par rapport au volume total du poumon. Un espace de référence local doit alors être défini [3]. Des outils, tels le « proportionator » sont par contre disponibles pour échantillonner des régions spécifiques d'une coupe histologique, mais l'absence d'un volume de référence limite leur application en recherche pulmonaire [14]. Les biopsies recueillies ne possèdent parfois pas toutes les couches tissulaires requises pour l'estimation de certains paramètres stéréologiques, ce qui limite leur utilité. De plus, un nombre restreint de ces spécimens est disponible par animal vu leur échantillonnage *in vivo* et la complexité des techniques de collection.

Bien que la stéréologie constitue une grande avancée dans l'étude quantitative de la relation structure-fonction du poumon équin, certaines limitations existent qu'il est important de connaître lorsque l'on désire adresser une problématique respiratoire précise. La stéréologie permet d'approcher les changements tissulaires pulmonaires, les modifications dans l'expression génique, et d'observer les populations cellulaires impliquées dans les phénomènes physiologiques et les pathologies respiratoires. Par contre, les modifications de la fonction respiratoire reste un aspect à aborder via des tests de fonction respiratoire ante-mortem, fournissant des informations impossibles à obtenir avec une approche stéréologique sur des tissus post-mortem. Les réponses aux traitements et les modifications du système respiratoire *in vivo* permettent d'aborder l'adaptation de la fonction à la structure pulmonaire d'un point de vue différent. L'étude du poumon post-mortem avec une approche stéréologique et l'étude de la fonction respiratoire *in vivo* sont donc toutes deux complémentaires pour la compréhension des modifications de la structure sur la fonction respiratoire.

Il est difficile d'obtenir des poumons équins d'animaux atteints du souffle. La stéréologie est une technique qui demande la coupe exhaustive de l'organe, ce qui débute dès l'étape de la génération des tranches pour l'estimation du volume total par la méthode de Cavalieri. Ceci réduit ainsi l'utilisation des poumons à d'autres fins, telles la culture cellulaire, l'étude d'expression génique à partir de voies respiratoires, puisque l'entièreté de l'organe doit être fixé et échantillonné pour obtenir des spécimens représentatifs. Les deux poumons doivent alors être utilisés à des fins diverses et traités en utilisant des techniques qui permettent la combinaison de différentes approches scientifiques.

Élaboration du protocole de fixation et d'échantillonnage

L'élaboration d'un protocole de fixation et d'échantillonnage du poumon équin entier pour l'application des principes de la stéréologie comporte son lot d'obstacles. Les principaux qui ont été rencontrés lors du développement du protocole décrit dans cet ouvrage seront abordés ici.

Le poumon est un organe fragile et son parenchyme spongieux et délicat en fait un organe qu'il peut être difficile d'étudier. Sa composante majoritaire étant l'air qui remplit les voies respiratoires et les alvéoles, la déflation amenée après la mort lui fait perdre une partie considérable de son volume. Une étape primordiale de tout protocole de stéréologie consiste en l'estimation du volume de référence, ce qui amène le défi de restaurer le volume pulmonaire physiologique par une technique de fixation appropriée et de limiter les changements dimensionnels entraînés par la fixation et les traitements subséquents [17].

Lors de la dissection, un seul poumon par animal est sélectionné pour le protocole et fixé à pression constante. La fixation des deux poumons est impossible considérant la taille de ceux-ci. La multitude de techniques employées dans notre laboratoire requiert également l'utilisation de tissus pulmonaires frais, d'où la conservation du poumon controlatéral à ces fins. Vu l'emploi d'un seul poumon pour la stéréologie, des suppositions sur les similarités structurelles entre

les deux poumons d'un même animal doivent être tirés [3]. Le choix d'un poumon en particulier peut amener du biais si la sélection est effectuée de manière non-aléatoire. Des changements pathophysiologiques de la structure pulmonaire peuvent donc être manqués si présents dans le poumon qui n'est pas échantillonné. Une solution serait d'adapter le protocole de fixation et d'échantillonnage pour séparer les poumons gauche et droit équins en strates [3, 54]. Une strate de chacun des poumons pourrait alors être analysée. La division lobaire étant incomplète chez le cheval [9], des difficultés pourraient être rencontrées à la dissection ou des fuites créées qui compliqueraient par la suite la fixation à pression constante. Une alternance aléatoire dans l'utilisation du poumon droit et gauche pour l'application de la stéréologie et l'étude subséquente par microscopie optique reste une possibilité, mais amènent les mêmes restrictions quant à la préférence d'un poumon pour un animal donné.

Fixation

La fixation a pour but de ramener le poumon à son état physiologique pré-mortem, requérant une inflation via différentes techniques avant la fixation: une fixation *in situ* via perfusion des vaisseaux pulmonaires [3], ou l'instillation de fixateur via les voies respiratoires. Pour un poumon aussi volumineux que celui du cheval - capacité pulmonaire totale d'environ 42 litres [11]- l'adaptation et la réalisation de ces techniques de fixation représentent tout un défi.

Tout d'abord, l'exsanguination de l'animal immédiatement post-mortem demande d'effectuer l'euthanasie près de la salle de nécropsie pour pouvoir extraire le poumon de l'animal et débiter la fixation le plus rapidement possible. Par conséquent, une bonne planification de chaque euthanasie est requise afin de procéder dans les délais nécessaires pour éviter les changements post-mortem et recueillir les échantillons pulmonaires voulus. De plus, la fixation par pression constante du poumon est un procédé qui s'étend sur quelques jours, ce qui demande un certain niveau d'organisation pour chaque euthanasie, puisque ce

délai s'ajoute au temps requis pour effectuer l'échantillonnage. Les limitations de temps demandent donc l'organisation de matériel et des ressources humaines disponibles pour effectuer cette étape et l'échantillonnage subséquent.

Trois différents temps de fixation ont été mis à l'essai en cour de route : 12 heures, 24 heures et 48 heures. Une fixation de 12 heures et de 24 heures ne permettait pas une fixation uniforme du poumon en entier. La durée du procédé a alors été allongée à 48 heures ce qui résultait en une fixation optimale.

Plusieurs modifications suite à des essais et erreurs ont également été réalisées concernant notamment l'ajustement de la pression tout au long de ces longues heures de fixations, la surveillance du processus devant être étroite pour réagir au moindre changement et assurer une pression constante. Les problèmes d'étanchéité rencontrés suite à la présence de fuites au niveau de l'hile pulmonaire, ou créés par des entailles lors de la nécropsie ou lors la dissection demandent également une attention particulière et une constante adaptation de la procédure.

Formaldéhyde et formaldéhyde additionné de zinc

Un fixateur idéal pour toutes les études n'existe pas. Dans le meilleur des cas, on choisit un fixateur qui nous permette d'atteindre les buts de notre étude. Deux types de fixateurs ont été testés durant l'élaboration du protocole de fixation à pression constante. Le poumon est un organe qui est, selon notre expérience, sensible aux conditions de fixation, et nous cherchions un fixateur qui puisse améliorer nos études histologiques subséquentes. Le formaldéhyde utilisé habituellement pour la fixation de nos tissus pulmonaires conserve bien la morphologie tissulaire, mais amène une réticulation des protéines du tissu qui peut être assez importante et nécessiter ensuite de longues étapes de démasquage d'antigène pour les colorations immunohistochimiques. Le formaldéhyde additionné de zinc (Z-Fix©) conserve la morphologie tissulaire en plus de l'antigénicité des tissus. Son utilisation permet donc de diminuer ou même d'éliminer l'étape du démasquage d'antigène [13] (une étape requise lors

d'immunohistochimie, constitue en un traitement physique, chimique, enzymatique qui révèle les antigènes du tissu en brisant les liens qui se sont créés entre les protéines dues à la fixation). Cette étape peut allonger de beaucoup les protocoles de colorations immunohistochimiques et doit être adaptée à chaque anticorps avec lequel on travaille. De plus, des changements mineurs aux protocoles utilisés dans notre service de pathologie sont nécessaires pour l'inclure dans notre procédure de fixation du poumon équin. Par contre, le même équipement protecteur consistant de lunettes couvrantes, gants de néoprène, masque avec filtres adaptés et sarrau doit être porté que lorsqu'on utilise le formaldéhyde puisque les émanations sont aussi toxiques. Des résultats préliminaires avec une coloration avec l'alpha-actine sur des tissus fixés avec formaldéhyde, puis avec le formaldéhyde additionné de zinc démontrent que la coloration sans étape de démasquage d'antigène est possible et de meilleure qualité avec ce dernier.

Recherche de l'équipement

Afin adapter le protocole de fixation à pression constante et d'échantillonnage au poumon équin, les outils nécessaires devaient être dénichés : un couteau de plus de 60 cm tranchant en acier, une planche de plexiglas avec des trous à intervalles réguliers couvrant l'entièreté des tranches de poumon, un emporte-pièce à biopsie de 17 millimètres sont quelques exemples d'instruments qui ont dû être fabriqués sur mesure. Un équipement de protection devait également être adapté à la manipulation de grandes quantités de fixateur contenant du formaldéhyde [55]. De plus, toutes les étapes incluant et suivant la fixation du poumon doivent être exécutées sous une hotte chimique, ce qui limite la facilité des manipulations et l'espace de travail disponible. Un espace de travail important est requis pour la fixation et l'échantillonnage du poumon équin, de grandes quantités de réactifs doivent être disponibles, et de grands lieux de rangements doivent être consacrés aux spécimens fixés et au matériel.

Adapter la méthode d'échantillonnage systématique, uniforme et aléatoire au poumon équin entier

Vu la taille du poumon équin, et pour pouvoir obtenir un nombre acceptable d'échantillons pouvant insérer dans les cassettes de mise en paraffines, plusieurs étapes de coupe et recoupe des cylindres et blocs générés lors de l'échantillonnage devaient être incorporées dans les étapes du protocole. Le « smooth fractionator » devait être répété un nombre suffisant de fois, sans rallonger ou compliquer davantage les procédures et tout en nous assurant que les étapes rencontraient toujours les exigences d'un échantillonnage systématique, aléatoire, uniforme et efficace [2, 14, 19]. De plus, l'axe vertical devait être conservé à toutes les étapes de coupe, ce qui amène un niveau de difficulté lors de la manipulation des tissus pulmonaires et une demande accrue d'attention de la part du manipulateur. Une procédure complexe augmente également la possibilité d'introduire des erreurs de manipulation et du biais dans la méthode.

Deux types d'échantillons ont été incorporés dans les étapes de l'échantillonnage afin d'obtenir des spécimens isotropiques nous permettant d'avoir accès à tous les paramètres stéréologiques pour l'analyse des sections histologiques : 1) les échantillons obtenus avec « isector » et 2) les sections verticales. Les deux genres de spécimens ont été inclus dans le protocole, puisque du point de vue histologique, il était au départ incertain s'il serait facile d'identifier les voies respiratoires dans des échantillons obtenus avec l'« isector ». De plus, une banque de tissu polyvalente est nécessaire pour élargir l'éventail des questions scientifiques pouvant être adressées dans notre laboratoire.

Méthode de Cavalieri

Pour l'application de la méthode de Cavalieri, certains critères doivent être considérés. La bonne fixation du poumon et la consistance résultant de l'emploi de certains fixateurs (ex : Formaldéhyde vs. Glutaraldéhyde) doivent être optimales

pour la coupe des tranches de poumon. Un pré-enrobage dans un médium tel l'agar ou la gélatine, a été démontré faciliter la coupe en diminuant la compression du tissu pulmonaire et en facilitant le positionnement du départ aléatoire [31]. L'étape du pré-enrobage n'a pas été incluse dans cette étude due à la très grande taille du poumon équin rendant la méthode coûteuse et fastidieuse, et rallongeant considérablement le protocole.

Lors de la prise de photo, des tranches trop épaisses peuvent causer un biais de surprojection sur les images surestimant alors la surface sur laquelle le comptage des points sera estimé [31]. Des précautions lors de la prise des photos de tranches de poumons doivent être prises pour éviter ce phénomène, notamment l'optimisation de l'éclairage et la prise de notes sur les ambiguïtés observées. Une attention particulière doit aussi être portée durant le comptage des points pour s'assurer de la bonne délimitation de la surface de chaque tranche sur l'écran d'ordinateur.

Études futures

L'étude du poumon par stéréologie avec les techniques d'imagerie avancées [52] représente sans aucun doute la voie du future. Cette modalité présente plusieurs avantages, dont la possibilité d'évaluer quantitativement le poumon *in vivo*, puis de corréliser les trouvailles avec les études post-mortem par histologie, par expression protéique ou génique, par culture cellulaire, etc. La combinaison des deux approches permettra d'approfondir nos connaissances entre autres sur les changements tissulaires amenés par les pathologies et leur traitement, sur le développement normal du poumon et les changements structurels associés, et ce sur une période de temps donnée et sur l'entièreté de l'organe. La coupe exhaustive du poumon ne sera plus nécessaire pour son étude et de ce fait, plusieurs investigations pourront être conduites sur un même animal. En conséquence, le développement de techniques d'imagerie avancée à haute

résolution promet d'ouvrir de multiples portes pour l'étude quantitative de la relation entre la structure et la fonction pulmonaire.

Conclusion

Un protocole de fixation à pression constante et d'échantillonnage selon les principes de la stéréologie a été développé pour le poumon équin. Lors de son élaboration, aucune des procédures décrites dans la littérature ne s'appliquait au cheval. L'emploi d'une approche stéréologique dans un laboratoire représente une avancée en recherche pulmonaire puisqu'elle est la technique recommandée pour l'étude quantitative du poumon depuis 2010. En outre, elle permet la génération de données pouvant être reliées à la réalité tridimensionnelle d'un organe en son entier. Les deux étapes primordiales d'une approche quantitative suivant les principes de la stéréologie sont l'échantillonnage et les mesures effectuées sur les spécimens, et elles se doivent toutes deux d'être exemptes de biais. Ainsi, ce projet constituait une étape majeure pour l'implantation de la méthode dans notre laboratoire et nous permettra maintenant de concentrer nos efforts sur le développement des protocoles d'analyse d'images à l'aide du logiciel spécialisé de stéréologie.

Bien sûr, plusieurs ajustements devront être apportés au protocole, afin de le perfectionner et de le rendre pratique et efficace. Son utilisation permettra son raffinement, et améliorera sans contredit la qualité des données scientifiques qui seront obtenues à partir des nos échantillons pulmonaires. Le développement de ce protocole pourra bénéficier à la recherche sur le système respiratoire des chevaux, permettant l'avancement de la recherche en médecine vétérinaire, mais aussi l'amélioration de la compréhension globale du rôle de la structure sur la fonction pulmonaire.

Bibliographie

1. Weibel, E.R., *Stereological Methods: Vol.: 1.: Practical Methods for Biological Morphometry* 1979: Academic Press.
2. Weibel, E.R., C.C. Hsia, and M. Ochs, *How much is there really? Why stereology is essential in lung morphometry.* J Appl Physiol, 2007. **102**(1): p. 459-67.
3. Hsia, C.C., et al., *An official research policy statement of the American Thoracic Society/European Respiratory Society: standards for quantitative assessment of lung structure.* Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(4): p. 394-418.
4. Bachofen, H., et al., *Perfusion fixation of lungs for structure-function analysis: credits and limitations.* J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1982. **53**(2): p. 528-33.
5. Tomashefski, J.F., D.H. Dail, and SpringerLink (Service en ligne), *Dail and Hammar's pulmonary pathology. Vol. 1, Non-neoplastic lung disease* 2008, New York ; London: Springer. 1 texte électronique.
6. Lum, H. and W. Mitzner, *Effects of 10% formalin fixation on fixed lung volume and lung tissue shrinkage. A comparison of eleven laboratory species.* Am Rev Respir Dis, 1985. **132**(5): p. 1078-83.
7. Dyce, S.a.W., *Textbook of Veterinary Anatomy* Fourth Edition ed 2010, St-Louis: Saunders, Elseviers. 834.
8. McGorum, B.C., *Equine respiratory medicine and surgery* 2007, Edinburgh ; New York: Saunders Elsevier. xii, 705 p.

9. Parent, R.A., *Treatise on pulmonary toxicology* 1992, Boca Raton: CRC Press. v.
10. Nakakuki, S., *The bronchial tree and lobular division of the horse lung*. J Vet Med Sci, 1993. **55**(3): p. 435-8.
11. Couetil, L.L., F.S. Rosenthal, and C.M. Simpson, *Forced expiration: a test for airflow obstruction in horses*. J Appl Physiol (1985), 2000. **88**(5): p. 1870-9.
12. Kiernan, J.A., *Histological and histochemical methods : theory and practice*. 4th ed 2008, Bloxham: Scion. xvi, 606 p.
13. LTD., A. *Zinc Formalin Fixatives*. Available from: <http://www.anatechltdusa.com/index.html>.
14. Ochs, M. and C. Muhlfield, *Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 1: basic principles of lung stereology*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(1): p. L15-22.
15. Howard, V. and M.G. Reed, *Unbiased stereology : three-dimensional measurement in microscopy*. 2nd ed 2010, Liverpool: QTP. xiii, 278 p.
16. Bolender, R.P., D.M. Hyde, and R.T. Dehoff, *Lung morphometry: a new generation of tools and experiments for organ, tissue, cell, and molecular biology*. Am J Physiol, 1993. **265**(6 Pt 1): p. L521-48.
17. Hsia, C.C., et al., *How to measure lung structure--what for? On the "Standards for the quantitative assessment of lung structure"*. Respir Physiol Neurobiol, 2010. **171**(2): p. 72-4.
18. Ochs, M., *Design-based Stereology*, Visiopharm, Editor 2009.
19. Gundersen, H.J. and R. Osterby, *Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'*. J Microsc, 1981. **121**(Pt 1): p. 65-73.

20. Stuart, A., *Basic ideas of scientific sampling* 1962, New York: Hafner Pub. Co.
21. Gundersen, H.J. and E.B. Jensen, *The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*. J Microsc, 1987. **147**(Pt 3): p. 229-63.
22. Weibel, E.R., *Measuring through the microscope: development and evolution of stereological methods*. J Microsc, 1989. **155**(Pt 3): p. 393-403.
23. Cruz-Orive, L.M., *Toward a more objective biology*. Neurobiol Aging, 1994. **15**(3): p. 377-8; discussion 379-80.
24. Reed, M.G., C.V. Howard, and D.E.Y. GS, *One-stop stereology: the estimation of 3D parameters using isotropic rulers*. J Microsc, 2010. **239**(1): p. 54-65.
25. Gundersen, H.J., et al., *The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis*. APMIS, 1988. **96**(10): p. 857-81.
26. Hyde, D.M., N.K. Tyler, and C.G. Plopper, *Morphometry of the respiratory tract: avoiding the sampling, size, orientation, and reference traps*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(1): p. 41-8.
27. Baddeley, A.J., H.J. Gundersen, and L.M. Cruz-Orive, *Estimation of surface area from vertical sections*. J Microsc, 1986. **142**(Pt 3): p. 259-76.
28. Mattfeldt, T., et al., *Estimation of surface area and length with the orientator*. J Microsc, 1990. **159**(Pt 3): p. 301-17.
29. Nyengaard, J.R., H.G. Jorgen, and H.J. Gundersen, *The isector: a simple and direct method for generating isotropic, uniform random sections from small specimens*. Journal of Microscopy, 1992. **165**(3): p. 427-431.
30. Weibel, E.R., *Stereological methods*. Vol. 2. 1980: Academic Press London.

31. Michel, R.P. and L.M. Cruz-Orive, *Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area*. J Microsc, 1988. **150**(Pt 2): p. 117-36.
32. Gundersen, H.J., et al., *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. APMIS, 1988. **96**(5): p. 379-94.
33. Cruz-Orive, L.M., *Precision of Cavalieri sections and slices with local errors*. J Microsc, 1999. **193**(Pt 3): p. 182-98.
34. Weibel, E.R., *Stereological methods in cell biology: where are we--where are we going?* J Histochem Cytochem, 1981. **29**(9): p. 1043-52.
35. Weibel, E.R., G.S. Kistler, and W.F. Scherle, *Practical stereological methods for morphometric cytology*. J Cell Biol, 1966. **30**(1): p. 23-38.
36. Gundersen, H.J.G., *Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect*. J Microsc, 1977. **111**(2): p. 219-223.
37. Sterio, D.C., *The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector*. J Microsc, 1984. **134**(Pt 2): p. 127-36.
38. Mayhew, T.M. and H.J. Gundersen, *If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space*. J Anat, 1996. **188** (Pt 1): p. 1-15.
39. Gundersen, H.J., *The smooth fractionator*. J Microsc, 2002. **207**(Pt 3): p. 191-210.
40. Gundersen, H.J., *Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson*. J Microsc, 1986. **143**(Pt 1): p. 3-45.
41. Hyde, D.M., et al., *Total number and mean size of alveoli in mammalian lung estimated using fractionator sampling and unbiased estimates of the*

- Euler characteristic of alveolar openings. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004. **277**(1): p. 216-26.
42. Dorph-Petersen, K.A., J.R. Nyengaard, and H.J. Gundersen, *Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. J Microsc*, 2001. **204**(Pt 3): p. 232-46.
 43. Stockmeier, C.A., et al., *Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. Biol Psychiatry*, 2004. **56**(9): p. 640-50.
 44. Hayatdavoudi, G., et al., *Factors determining degree of inflation in intratracheally fixed rat lungs. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1980. **48**(2): p. 389-93.
 45. Canene-Adams, K., *Chapter Fifteen - Preparation of Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue for Immunohistochemistry*, in *Methods in Enzymology*, L. Jon, Editor 2013, Academic Press. p. 225-233.
 46. Mohan, C., *Buffers: A guide for the preparation and use of buffers in biological systems.*, 2003, Calbiochem, EMD Biosciences inc.
 47. Wikipedia, T.F.E. *Agar*. December 4th 2014; Available from: <http://en.wikipedia.org/wiki/Agar>.
 48. Ochs, M., *Vertical Sections*, 2012: Bern Conference on Stereology.
 49. Ochs, M., *Vertical Sections*: Institute of Functional and Applied Anatomy, Hannover Medical School.
 50. Pascale Brudon, J.-D.R., Michael R. Reich. *Essential Medicines and Health Products Information Portal, Indicateurs pour le suivi de la mise en oeuvre des politiques pharmaceutiques nationales, Annexe 3*. 1996 2014; Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jwhozip15f/9.html>.
 51. Hill, A.B., *A short textbook of medical statistics*. 10th ed 1977, London: Hodder and Stoughton. ix, 325 p.

52. Weibel, E.R., *A retrospective of lung morphometry: from 1963 to present*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(6): p. L405-8.
53. Muhlfield, C. and M. Ochs, *Quantitative microscopy of the lung: a problem-based approach. Part 2: stereological parameters and study designs in various diseases of the respiratory tract*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **305**(3): p. L205-21.
54. Johnson, L., et al., *Morphometric examination of the equine adult and foal lung*. Anat Rec (Hoboken), 2014. **297**(10): p. 1950-62.
55. LTD., A., *Z-Fix, Material and Safety Data sheet*, 2011, Anatech LTD.

Annexe

Annexe A: Horloge uniforme

