

Etude immunocytochimique du développement de la cavité buccale du rat

CASASCO, A.* , CALLIGARO, A.** , MARCHETTI, C.** , POGGI, P.** , CASASCO, M.** , MENGHINI, P.*

* Clinique Odontostomatologique, Université de Pavia et Policlinico IRCCS « S.Matteo », Pavia.

** Institut d'Histologie et d'Embryologie Générale, Université de Pavia.

RÉSUMÉ

Afin d'évaluer avec précision la prolifération cellulaire dans un tissu ou un organe, on emploie couramment la cytofluorimétrie en flux ainsi que les techniques autoradiographiques, qui permettent d'obtenir des informations sur le nombre de cellules en phase S et par conséquent en prolifération.

Récemment, de nouvelles techniques non autoradiographiques ont été mises au point pour l'identification des cellules en prolifération. Ces techniques exploitent l'incorporation de la 5-bromo-2'déoxyuridine (BrdUrd), analogue de la thymidine, dans le DNA en voie de duplication. Ces techniques utilisent un anticorps monoclonal dirigé contre la BrdUrd pour évaluer l'incorporation de cette dernière dans les cellules en phase S. L'emploi de cet anticorps en immunocytochimie permet une facile identification « in situ », sur des coupes de tissu, des cellules en prolifération.

Nous avons utilisé ce procédé immunocytochimique pour repérer et identifier les cellules en prolifération dans la dent et dans d'autres organes de la cavité buccale du rat nouveau-né, organes qui sont donc encore en cours de développement. Nous estimons que la technique utilisée dans cette recherche peut constituer, par sa précision et sa simplicité, un instrument valable pour l'étude de la prolifération cellulaire ainsi que de la différenciation cellulaire dans les tissus de la dent et de la cavité buccale, aussi bien dans le domaine de l'organogenèse que dans celui de la pathologie tumorale.

MOTS CLÉ :

Appareil odontostomatognathique. Prolifération cellulaire. Différenciation cellulaire. Bromodéoxyuridine. Immunocytochimie.

SUMMARY

Flow cytometry and autoradiography are extensively used for the evaluation of the number of cells in S-phase in order to study the proliferative activity within tissues and organs. The recent development of a monoclonal antibody against 5-bromo-2'deoxyuridine (BrdUrd), a nonradioactive thymidine analogue that is incorporated within DNA-synthesizing cells, allows the immunochemical detection of proliferating cells. The use of this antibody allows an immunocytochemical detection of proliferating cells « in situ » on tissue sections.

We have applied this new technique for the identification of proliferating cells within the tooth and other organs of rat mouth during development. We believe that this technique, for its precision and simplicity, may be a powerful tool for studying the cytokinetic and the differentiation of normal and neoplastic cells within the mouth as well as in other districts of the body.

KEY-WORDS :

Odontostomatognathic system. Cell proliferation. Cell differentiation. Bromodeoxyuridine. Immunocytochemistry.

INTRODUCTION

L'étude du potentiel de prolifération des cellules appartenant à des tissus normaux et pathologiques peut être également une source d'information concernant le processus de différenciation cellulaire.

Les techniques le plus couramment utilisées jusqu'à maintenant sont la cytométrie en flux et l'autoradiographie. La possibilité d'avoir actuellement à notre disposition un anticorps monoclonal spécifique pour la 5-bromo-2' déoxyuridine (BrdUrd), analogue non radioactif de la thymidine, incorporé dans les cellules en train de multiplier leur DNA, est à la base d'une nouvelle technique pour l'étude de la prolifération cellulaire dans un tissu (Gratzner, 1982; Dolbeare et coll., 1983; Dean et coll., 1984). Comme on le sait, en effet, le nombre de cellules qui se trouvent dans la phase S du cycle cellulaire est un indice digne de foi pour évaluer le potentiel de croissance d'un tissu. L'application de l'anticorps anti-BrdUrd en immunocytochimie permet, en outre, d'identifier « in situ », sur des coupes de tissu, des cellules qui ont incorporé la BrdUrd et qui, par conséquent, sont en prolifération (Harms et coll., 1986; Morstyn et coll., 1986; de Fazio et coll., 1987; Casasco et coll., 1988 a, b).

Ce travail présente les résultats obtenus en utilisant une nouvelle technique immunocytochimique pour l'étude de la prolifération cellulaire dans certains tissus de la cavité buccale du rat pendant le développement.

MATERIEL ET METHODES

Des rats nouveau-nés de souche Wistar ont été sacrifiés deux heures après leur avoir administré la 5-bromo-2' déoxyuridine (BrdUrd) par voie péritonéale. Les mandibules ont été prélevées, fixées dans un formol tamponné et incluses en paraffine. Parmi les coupes de 5 μ m d'épaisseur qui ont été ensuite préparées, certaines ont été traitées pour l'identification immunocytochimique de la BrdUrd, d'autres, adjacentes aux précédentes, ont été colorées avec hématoxyline et éosine.

Le procédé immunocytochimique pour mettre en évidence la présence de BrdUrd dans les coupes de tissu a déjà été décrit en détail (Harms et coll., 1986; de Fazio et coll., 1987; Casasco et coll., 1988 a, b); le processus immunoenzymatique employé dans notre recherche prévoit l'utilisation du système streptavidine-biotine et de la peroxydase pour révéler les sièges de la réaction entre BrdUrd et l'anticorps spécifique. Les coupes déparaffinées ont été d'abord

traitées avec une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 3%, afin d'inhiber les activités de la peroxydase endogène, puis placées dans une solution de 3N de HCl, afin de rendre la BrdUrd accessible à l'anticorps spécifique (Moran et coll., 1985). On a procédé ensuite à la digestion par la pepsine et, par la suite, à l'incubation, pendant une nuit, à 4 degrés centigrades, avec l'anticorps monoclonal anti-BrdUrd (Becton Dickinson, Mountain View, CA) dilué 1:40 en solution tampon. Après lavage, les préparations ont été mises en incubation avec un anticorps dirigé contre l'anticorps primaire marqué avec la biotine (Vector Laboratories, Burlingame, CA), pendant une heure à température ambiante et successivement avec des complexes formés de streptavidine biotinylée et de peroxydase (Amersham International, Amersham, U.K.). Les coupes ont été enfin placées dans une solution de 3.3' diaminobenzidine à 0.03%, à laquelle on a ajouté, juste avant l'emploi, du peroxyde d'hydrogène (0.02% en eau v/v).

RESULTATS

L'incorporation de la BrdUrd est révélée par la présence du produit de la réaction immunocytochimique de couleur marron, dans les noyaux des cellules en phase S.

Dans le germe dentaire au stade de cloche, nous pouvons observer de nombreuses cellules immunoréactives (fig. 1). Dans le contexte de la composante épithéliale de la dent, nombreuses sont les cellules de l'épithélium interne de l'organe de l'émail, disposées dans la partie inférieure de la cloche, qui se trouvent en phase S; le nombre de cellules immunoréactives de l'épithélium interne diminue à mesure qu'on s'élève vers le haut de la cloche. Toutefois, dans la zone de l'interface épithélio-mésenchymateuse, dans laquelle une couche de dentine s'est déjà formée — c'est-à-dire dans la partie la plus haute de la cloche — on peut encore distinguer certaines cellules de l'épithélium interne colorées par la réaction immunocytochimique (fig. 2). Des cellules en phase de synthèse du DNA sont présentes dans l'épithélium externe de l'organe de l'émail, surtout dans la zone à proximité de l'épithélium de la cavité buccale (fig. 3); leur nombre est cependant inférieur à celui des cellules immunoréactives de l'épithélium interne. Alors que le réticulum étoilé montre peu de cellules en phase S, la couche intermédiaire en est particulièrement riche. Dans cette couche, l'immunoréactivité est localisée de façon analogue à ce qui a été observé dans l'épithélium interne; les cellules positives à la réaction sont par conséquent nombreuses dans la partie basse de la

cloche et en nombre réduit dans la partie haute (figs. 1, 2). En ce qui concerne la pulpe en voie de formation, les cellules immunoréactives sont nombreuses, surtout dans la partie la plus périphérique de la portion inférieure de la cloche et, dans la couche subodontoblastique, dans la portion supérieure. Un petit nombre de préodontoblastes est immunoréactif, alors qu'aucun odontoblaste sécréteur ne se trouve en phase S. De nombreuses cellules d'aspect mésenchymateux, qui constituent le sac dentaire, sont immunoréactives (figs. 1, 2). La langue, au cours de cette phase de son développement, apparaît riche en cellules en prolifération, disposées de façon apparemment fortuite dans le contexte de la composante musculaire (fig. 4).

Des cellules en état de prolifération sont reconnaissables aussi dans le conduit de la glande sublinguale et dans la paroi des gros vaisseaux qui courent en dessous de la langue (fig. 4).

De nombreuses cellules immunoréactives sont présentes, en outre, dans la couche basale des épithéliums de revêtement du plancher de la bouche et de la langue.

Les cellules immunoréactives, reconnaissables dans le contexte des cartilages mandibulaires, sont rares, tandis que dans l'os en voie de formation, le contingent cellulaire qui se trouve en phase S du cycle, apparaît important (fig. 4).

DISCUSSION

La technique immunocytochimique utilisée ici fournit des images d'une extrême clarté et, comparée aux techniques autoradiographiques, se révèle d'une application plus facile, tout en fournissant des résultats superposables (de Fazio et coll., 1987; Schuttle et coll., 1987).

En ce qui concerne le germe dentaire, les études autoradiographiques effectuées pour mieux définir la croissance de la dent sont nombreuses (Messier et Leblond, 1960; Chiba et coll., 1967; Robins, 1967; Zajicek et Bar-Lev, 1971, Osman et Ruch, 1976, 1978; Smith et Warshawsky, 1975, 1977). Plus spécialement, les résultats que nous avons obtenus avec la méthode immunocytochimique sont comparables à ceux fournis par Smith et Warshawsky (1975) avec l'autoradiographie dans l'incisive du rat, en tenant compte cependant du fait que cette dernière est une dent à croissance continue, à la différence de la molaire.

Nos images montrent comment, dans certains organes, au cours de leur développement, il existe des

zones dans lesquelles les processus de prolifération sont particulièrement actifs, contrairement à d'autres zones où les cellules en phase S sont peu nombreuses et dispersées apparemment au hasard.

Il est en outre possible de reconnaître des tissus ou des portions d'organes à faible activité de prolifération, comme par exemple le reticulum étoilé. L'absence d'éléments immunoréactifs dans la couche des odontoblastes sécréteurs indique que ces cellules ne sont plus susceptibles de division, à la différence des préodontoblastes, qui se montrent parfois colorés par la réaction immunocytochimique. Nos résultats, obtenus avec la technique immunocytochimique pour l'identification de la BrdUrd, sont en parfait accord avec les résultats obtenus par d'autres auteurs au moyen de l'autoradiographie (Robins, 1967). Les liens entre le potentiel de prolifération et les processus de différenciation sont connus. Le potentiel de prolifération d'une souche cellulaire peut donc représenter un indice valable quant au degré de différenciation atteint par la souche cellulaire elle-même; c'est précisément le cas des odontoblastes, cellules qui, lorsqu'elles atteignent leur complète maturation (coincidant avec le commencement de leur activité sécrétoire), ne se trouvent jamais en phase S.

Les informations concernant le potentiel de prolifération d'un tissu peuvent avoir une certaine importance pour mieux comprendre la dynamique des processus de guérison des blessures ou pour évaluer la réelle capacité d'un organe à répondre à certains stimuli spécifiques (par exemple médicaments ou stimuli mécaniques).

Initialement, les méthodes qui prévoient l'emploi de la BrdUrd et l'identification de cette substance avec un anticorps, ont été utilisées pour l'étude de processus pathologiques de nature néoplasique, dans le but d'obtenir des informations concernant le comportement biologique des cellules qui constituent la tumeur. Il a été en effet possible d'étudier «in vivo», chez l'homme, les caractéristiques, du point de vue du potentiel de prolifération, de certaines tumeurs, en administrant la BrdUrd directement au patient, cette substance apparaissant relativement peu toxique (Hoshino et coll., 1985; Wilson et coll., 1985; Danova et coll., 1987). Il est probable que ce procédé est utile, non seulement pour approfondir les connaissances sur l'activité tumorale en général, mais aussi pour déterminer la sensibilité d'une tumeur particulière à la thérapie pharmacologique et à la radio-

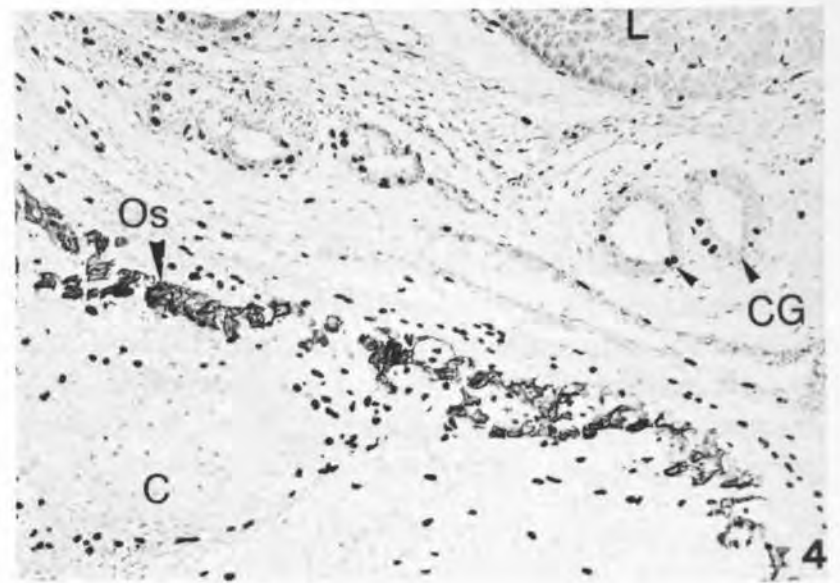
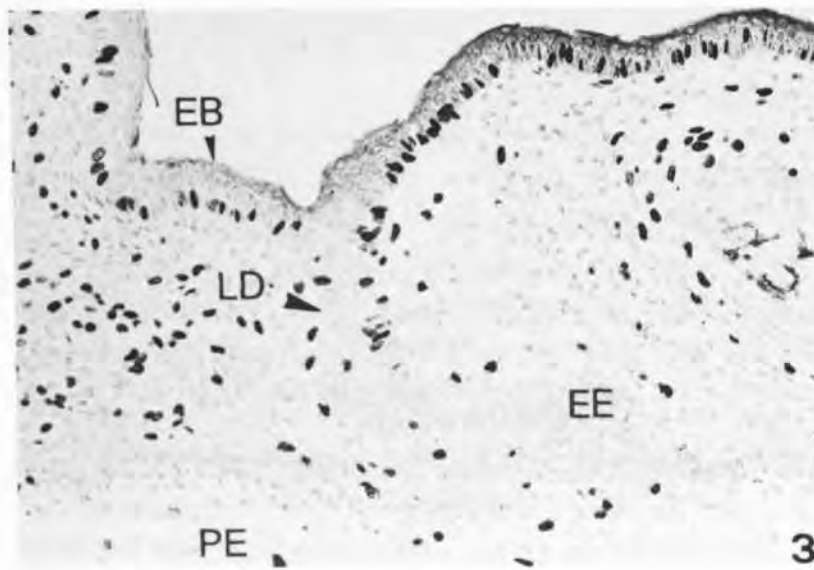
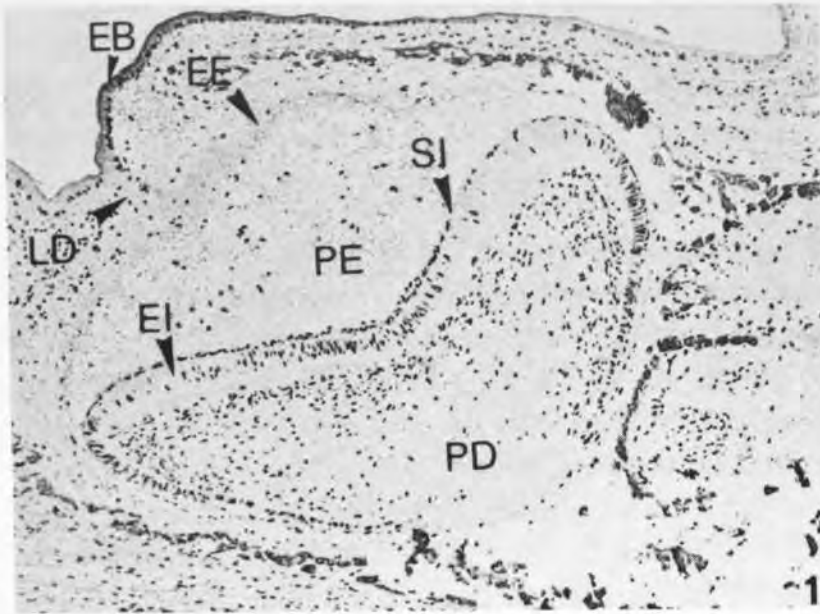


Fig. 1: germe dentaire de la première molaire inférieure du rat nouveau-né. Les noyaux des cellules qui ont incorporé la BrdUrd paraissent sombres. EB: épithélium buccal; LD: lame dentaire; EE: épithélium externe de l'organe de l'émail; PE: pulpe de l'émail; SI: stratum intermedium; EI: épithélium interne de l'organe de l'émail; PD: papille dentaire. 77 ×.

Fig. 1: First lower molar tooth germ of newborn rat. The nuclei of the cells that incorporated BrdUrd appear dark in the figure. EB: buccal epithelium; LD: dental lamina; EE: enamel organ outer epithelium; PE: stellate reticulum; SI: stratum intermedium; EI: enamel organ inner epithelium; PD: dental papilla. Magn. 77 ×.

Fig. 2: Détail à plus fort grossissement de la fig. 1. EI: épithélium interne de l'organe de l'émail; D: dentine; PD: papille dentaire. 465 ×.

Fig. 2: Part of fig. 1 is shown at higher magnification. EI: enamel organ inner epithelium; PD: dental papilla. Magn. 465 ×.

Fig. 3: Détail à plus fort grossissement de la fig. 1. EB: épithélium buccal; LD: lame dentaire; EE: épithélium externe de l'organe de l'émail; PE: pulpe de l'émail. 204 ×.

Fig. 3: Part of fig. 1 is shown at higher magnification. EB: buccal epithelium; LD: dental lamina; EE: enamel organ outer epithelium; PE: stellate reticulum. Magn. 204 ×.

Fig. 4: Les noyaux immunoréactifs sont reconnaissables dans d'autres tissus aussi: dans le tissu musculaire de la langue (L); dans l'épithélium des conduits glandulaires (CG); dans le tissu osseux en voie de formation (Os). C: cartilage. 126 ×.

Fig. 4: Immunoreactive nuclei are detectable within tongue muscles (L), epithelium of a gland duct (CG) and in developing bone (Os). C: cartilage. Magn. 126 ×.

thérapie. A ce jour, à notre connaissance, aucune recherche prévoyant l'emploi de la BrdUrd pour marquer les cellules en train de proliférer n'a été faite sur les tumeurs de la sphère bucco-pharyngienne, bien que de tels processus néoplasiques soient souvent traités par radiothérapie.

En conclusion, il nous semble que la BrdUrd représente une technique valable pour l'étude de la détermination de l'état de différenciation des tissus normaux et pathologiques. Elle permet, de façon simple et précise, de localiser les zones de croissance de certains organes du rat nouveau-né au cours du développement de son système odontostomatognathique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Casasco, A., Calligaro, A., Marchetti, C., Poggi, P., Brugnattelli, S. — Studio immunocitochimico sulla proliferazione cellulare nella polpa dentaria di ratto neonato. *Boll. Soc. Med. Chir. Pavia*, 102: 31-35, 1988a.
- [2] Casasco, A., Calligaro, A., Casasco, E., Marchetti, C., Poggi, P., Casasco, M. — An immunocytochemical method for studying embryo cytokinetics. *Bas. Appl. Histochem.*, 32: 293-296, 1988b.
- [3] Chiba, M., Nakagawa, K., Mimura, T. — DNA synthesis and cell division cycle at the base of the maxillary incisor tooth of the young rat. *Archs oral Biol.*, 12: 865-876, 1967.
- [4] Danova, M., Wilson, G., Riccardi, A., Mazzini, G., Ucci, G., Giordano, M., Brugnattelli, S., Mc Nally, J., Ascari, E. — In vivo administration of bromodeoxyuridine and flow cytometry for cell kinetic studies in human malignancies. *Haematologica*, 9: 72-115, 1987.
- [5] Dean, P.N., Dolbeare, F., Gratzner, H., Rice, G.R., Gray, J.W. — Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet.*, 17: 427-436, 1984.
- [6] de Fazio, A., Leary, J.A., Hedley, D.W., Tattersall, M.H.N. — Immunohistochemical detection of proliferating cells in vivo. *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 571-577, 1987.
- [7] Dolbeare, F.A., Gratzner, H.G., Pallavicini, M.G., Gray, J.W. — Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5573-5577, 1983.
- [8] Gratzner, H.G. — Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 218: 474-475, 1982.
- [9] Harms, G., van Goor, H., Koudstaal, J., de Ley, L., Hardonk, M.J. — Immunohistochemical demonstration of DNA-incorporated 5-bromodeoxyuridine in frozen and plastic embedded sections. *Histochemistry*, 85: 139-143, 1986.
- [10] Hoshino, T., Nagashima, T., Murovic, J., Levin, E.M., Levin, V.A., Rupp, S.M. — Cell kinetic studies of in situ human brain tumors with bromodeoxyuridine. *Cytometry*, 6: 627-32, 1985.
- [11] Messier, B., Leblond, C.P. — Cell proliferation and migration as revealed by autoradiography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *Am. J. Anat.*, 106: 247-285, 1960.
- [12] Moran, R., Darzynkiewicz, Z., Staiano-Coico, L., Melamed, M.R. — Detection of 5-bromodeoxyuridine (BrdUrd) incorporation by monoclonal antibodies: role of the DNA denaturation step. *J. Histochem. Cytochem.*, 33: 821-827, 1985.
- [13] Morstyn, G., Pyke, K., Gardner, J., Ashcroft, R., de Fazio, A., Bhathal, P. — Immunohistochemical identification of proliferating cells in organ culture using bromodeoxyuridine and a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.*, 34: 697-701, 1986.
- [14] Osman, A., Ruch, J.V. — Répartition topographique des mitoses dans l'incisive et la 1ère molaire inférieure de l'embryon de souris. *J. Biol. Buccale*, 4: 331-348, 1976.
- [15] Osman, A., Ruch, J.V. — Contribution à l'étude des paramètres du cycle cellulaire au cours de l'odontogenèse chez la souris. *J. Biol. Buccale*, 6: 43-54, 1978.
- [16] Robins M.W. — The proliferation of pulp cells in rat incisors. *Archs. oral Biol.*, 12: 487-501, 1967.
- [17] Schutte, B., Reynders, M.M.J., Bosman, F.T., Blijham, G.H. — Studies with anti-bromodeoxyuridine antibodies: II. Simultaneous immunocytochemical detection of antigen expression and DNA synthesis by in vivo labeling of mouse intestinal mucosa. *J. Histochem. Cytochem.*, 35: 371-374, 1987.
- [18] Smith, C.E., Warshawsky, H. — Cellular renewal in the enamel organ and the odontoblast layer of the rat incisor as followed by radioautography using 3H-thymidine. *Anat. rec.*, 183: 523-562, 1975.
- [19] Smith, C.E., Warshawsky, H. — Quantitative analysis of cell turnover in the enamel organ of the rat incisor. *Anat. Rec.*, 187: 63-98, 1977.
- [20] Wilson, G.D., Mc Nally, N.J., Dunphy, E., Karcher, H., Pfragner, R. — The labelling index of human and mouse tumours assessed by bromodeoxyuridine staining in vitro and in vivo and flow cytometry. *Cytometry*, 6: 641-647, 1985.
- [21] Zajicek, G., Bar-Lev, M. — Kinetics of the inner enamel epithelium in the adult rat incisor. II. Computer model. *Cell Tissue Kinet.*, 4: 163-170, 1971.

Adresse des Auteurs: Dr. Andrea Casasco, Clinica Odontoiatrica, IRCCS «S. Matteo», 27100 Pavia, Italy.