ÉTUDE QUANTITATIVE D'ORGANES OU DE TISSUS

I. — MÉTHODES D'ESTIMATION DES VOLUMES

Aline SOLARI

*Station centrale de Physiologie animale,
Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,
78350 Jouy en Josas*

RÉSUMÉ

Après une tentative simple de justification et une démonstration du principe de DELESSE, différentes méthodes d'estimation des surfaces relatives sont présentées et critiquées.

La méthode des pesées et la planimétrie, bien que toujours employées, sont longues et fastidieuses puisqu'elles nécessitent le dessin des différents constituants à mesurer. Elles peuvent être remplacées avantageusement par deux autres procédés qui font l'objet principal de cet article :

- l'intégration linéaire,
- la numération ponctuelle.

L'intégration linéaire consiste à superposer sur la coupe histologique une grille de parallèles équidistantes et à mesurer les longueurs respectives des segments de droites qui recouvrent le constituant et l'ensemble du tissu. Le rapport des différentes longueurs fournit une estimation des surfaces relatives, donc des volumes relatifs. Une vérification empirique et une démonstration confirment la validité de la méthode qui a été utilisée avec succès pour l'étude de l'activité thyroïdienne et la quantification des divers constituants des cellules de foie.

L'emploi d'une grille de points disposés régulièrement sur la surface étudiée, caractérise la méthode des numérations ponctuelles. Le dénombrement des points se superposant au constituant remplace les mesures de longueurs pour l'estimation des surfaces relatives. Les principaux réseaux d'utilisation courante sont ceux de : CHALKLEY, HAUG, WEIBEL et HENNIG. La validité de la méthode est testée par une vérification empirique et une démonstration. Elle a été employée pour l'étude quantitative de la spermatogenèse chez le Carassin.

Les précautions à prendre lors de l'échantillonnage, pour une éventuelle analyse statistique des résultats, sont analysées brièvement. Le choix d'une orientation judicieuse du plan de coupe évite les résultats biaisés. Celle-ci dépend de la localisation et de la répartition du constituant dans le tissu, ce qui implique une étude préliminaire de l'organe avant toute expérimentation. L'épaisseur des coupes doit être largement inférieure aux dimensions des objets à mesurer ; quant au grossissement de l'objectif il est choisi de telle sorte que l'intervalle entre les lignes ou les points du réseau soit égal ou supérieur au diamètre équivalent du constituant. Quelques généralités sur le choix et le nombre de champs microscopiques et de coupes terminent cet article.

L'analyse quantitative des tissus porte aussi bien sur les dimensions ou le nombre de cellules d'une catégorie donnée, que sur la part de volume qu'elles occupent. Nous envisageons dans cet article de décrire des méthodes indirectes d'estimation des volumes comme la planimétrie, l'intégration linéaire et la numération ponctuelle, utilisables sur coupes histologiques. Leur emploi permet d'obtenir des estimations correctes des volumes, à condition toutefois, de prendre certaines précautions indispensables lors de l'échantillonnage. Il est essentiel en effet, de pouvoir appliquer le principe fondamental dit principe de DELESSE.

I. — PRINCIPE DE DELESSE

C'est au géologue DELESSE (1842) que nous devons le principe qui sert de base à de nombreuses études quantitatives en biologie. Il s'énonce ainsi : « Dans une coupe, la part de volume occupée par un composant peut être estimée par la part de surface occupée par les sections du composant sur la coupe. »

Soit :

$$\boxed{V_{\alpha}/V = A_{\alpha}/A} \quad (1)$$

avec V : Volume de la coupe

V_{α} : Volume du composant

A : Surface totale de la coupe observée

A_{α} : Surface des sections de composant

Cependant, l'équivalence entre volume relatif et surface relative ne se justifie que si l'épaisseur de la coupe est faible par rapport à celle du composant.

A. — Tentative simple de justification (NEUER, 1966)

Des particules (α) sont réparties uniformément dans une coupe histologique d'épaisseur h . Si la valeur h est très faible par rapport aux dimensions des particules, celles-ci pourront être, à la limite, assimilées à de petits éléments cylindriques de même hauteur. Dans ce cas, V_{α} , le volume occupé par les particules est égal à :

$$V_{\alpha} = A_{\alpha} \cdot h$$

où A_{α} est la surface des particules sur la coupe de surface A .

De même, le volume total de la coupe est égal à :

$$V = A \cdot h$$

Le rapport des deux expressions précédentes donne le volume relatif V_v :

$$V_v = V_{\alpha}/V = A_{\alpha} \cdot h/A \cdot h$$

Nous conviendrons de représenter le rapport des surfaces pour une coupe par l'expression A_A :

$$\boxed{V_v = A_{\alpha}/A = A_A} \quad (2)$$

B. — Estimation du rapport V_V dans un cube de tissu

(WEIBEL, 1963 ; HILLIARD, 1968 ; UNDERWOOD, 1969)

Des granules (α) de taille et de forme quelconques sont uniformément répartis dans un cube de côté L , et de volume $V = L^3$. Ils occupent un volume total V_α et il s'agit d'estimer leur volume relatif V_V :

$$V_V = V_\alpha/V = V_\alpha/L^3$$

Soit dV_α/dV la part de volume occupée par les granules dans des coupes parallèles au plan zy (fig. 1). La coupe se réduit à un plan lorsque son épaisseur « dx » tend vers 0 et le volume relatif dV_α/dV s'assimile alors au rapport des surfaces $A_A(x)$ valeur qui varie avec la position de la coupe, c'est-à-dire avec x .

$$dV_\alpha/dV = A_A(x)$$

FIG. 1. — Représentation d'une coupe d'épaisseur dx prélevée dans un cube contenant des granules (WEIBEL, 1963)

En tenant compte de l'ensemble des coupes le volume total des granules s'écrit :

$$V_\alpha = \int_0^L dV_\alpha = \int_0^L A_A(x) \cdot dV \quad \text{avec} \quad dV = L^2 dx$$

$$V_\alpha = \int_0^L A_A(x) L^2 dx = V_V \cdot L^3$$

Comme L est constant :

$$V_V = \frac{1}{L} \int_0^L A_A(x) dx \quad (3)$$

Le volume relatif est donc égal à la moyenne des surfaces relatives (fig. 2).

$$V_V = \bar{A}_A \quad (4)$$

En conclusion il semble possible d'estimer la part de volume occupée par des particules dans un organe, par la moyenne des surfaces relatives, à condition d'utiliser un grand nombre de coupes dont l'épaisseur est inférieure à celle des particules.

Nous ne développerons pas toutes les démonstrations présentées ici car ce n'est pas l'objet principal de l'article.

FIG. 2. — Variation de la surface relative $A_A(x)$ en fonction de la position de la coupe (WEIBEL, 1963)

II. — APPLICATION DU PRINCIPE DE DELESSE

A. — Méthode des pesées et planimétrie

La méthode des pesées consiste à dessiner sur du papier calque d'épaisseur constante les projections de la coupe histologique ainsi que celles des composants. Les images respectives sont découpées et pesées et les volumes relatifs se déduisent du rapport des poids.

La mesure directe des surfaces par planimétrie remplace avantageusement le procédé précédent. Le gain de temps est considérable et il devient facile d'augmenter le nombre des mesures. Il existe des microplanimètres permettant l'évaluation directe des surfaces au microscope. Par contre, d'autres appareils nécessitent la photographie ou la projection des coupes.

Cependant, en l'absence de planimètres perfectionnés, des méthodes indirectes d'estimation des surfaces, comme l'intégration linéaire et la numération ponctuelle, peuvent être employées.

B. — Méthode d'intégration linéaire

a) Présentation de la méthode.

C'est le géologue ROSIWAL (1892) qui le premier a substitué aux mesures de surfaces des mesures de longueurs. Cette méthode ne nécessite aucun appareillage complexe, il suffit de superposer à la coupe histologique une grille constituée de lignes parallèles équidistantes et de mesurer les longueurs respectives des segments de droites qui recouvrent le constituant et l'ensemble du tissu.

La relation (1) devient :

$$\begin{aligned} V_\alpha/V &= A_\alpha/A = L_\alpha/L \\ \text{soit} \\ V_V &= A_A = L_L \end{aligned}$$

(5)

b) Validité de la méthode.

α) Méthode empirique de justification.

Soient deux cercles concentriques, de surface relative égale à 0,174, sur lesquels on superpose une grille de parallèles équidistantes (fig. 3). Quel que soit l'écart entre les parallèles, la moyenne des longueurs relatives obtenues par translation de la grille sur les deux cercles est très peu différente de la surface relative réelle (tabl. 1). La mesure directe des surfaces par planimétrie ne fournit pas des estimations plus précises (tabl. 2).

TABLEAU I

Valeurs des longueurs relatives L_L pour des positions différentes de la grille et des écarts variables entre les parallèles

Position de la grille	Écart d (cm)			
	1	1,5	2	3
1 ^{re}	0,167	0,187	0,155	0,133
2 ^e	0,177	0,154	0,176	0,186
3 ^e	0,156	0,169	0,158	0,199
4 ^e	0,177	0,187	0,188	0,183
Moyenne	0,169	0,174	0,169	0,176

TABLEAU 2

Valeurs des surfaces relatives obtenues par planimétrie

Cercle	Essai		
	1	2	Moyenne
Surface du grand cercle...	113,1	112,4	112,75
Surface du petit cercle....	21	21	21
Surface relative.....	0,186	0,187	0,186

FIG. 3. — Estimation de la surface relative de 2 cercles concentriques à partir de différentes positions d'une grille de parallèles équidistantes

β) *Estimation de la surface relative sur coupe* (WEIBEL, 1963 ; HILLIARD, 1968 ; UNDERWOOD, 1969).

Des zones pointillées de surface totale A_α , sont uniformément réparties dans un carré de côté L et de surface A (fig. 4). Soit $L_L(x) = dA_\alpha/dx$ la part de surface occupée par les zones pointillées dans un rectangle de longueur L et de largeur dx . Lorsque cette dernière valeur tend vers 0, $L_L(x)$ devient la portion de ligne se superposant à l'aire pointillée (fig. 4). Il s'ensuit que :

$$A_\alpha = \int_0^L dA_\alpha = \int_0^L L_L(x) dx = \int_0^L L_L(x) L dx$$

ou

$$A_\alpha = A_A \cdot A = A_A L^2$$

donc

$$A_A = \frac{1}{L} \int_0^L L_L(x) dx = \bar{L}_L$$

FIG. 4. — *Intégration linéaire*

La moyenne des longueurs relatives est une estimation de la surface relative.

Par conséquent :

$$A_A = \bar{L}_L \quad (6)$$

et si le principe de DELESSE est vérifié nous pouvons écrire :

$$V_V = \bar{A}_A = \bar{\bar{L}}_L \quad (7)$$

La méthode ne tient pas compte de la forme ni de la taille des constituants.

c) *Application de la méthode à l'étude de problèmes biologiques.*

α) *Étude de l'activité thyroïdienne* (UOTILA et KANNAS, 1952).

Pour les auteurs, la détermination de l'activité thyroïdienne nécessite la connaissance de la proportion du tissu épithélial, de colloïde et de stroma dans la glande. Pour chaque glande thyroïde ils prélèvent 3 coupes de 6 μ d'épaisseur également espacées. La projection de 5 zones par coupe sur un réseau constitué de parallèles équidistantes, permet de mesurer les portions de droites couvertes respectivement par l'ensemble du tissu et par ses composants. Les longueurs relatives sont comparées aux valeurs obtenues sur les mêmes échantillons par la méthode des pesées (tabl. 3) UOTILA et KANNAS constatent l'accord des deux techniques et préfèrent la méthode d'intégration linéaire qui est *plus simple, plus rapide et moins pénible pour l'expérimentateur*.

β) *Étude des cellules de foie au microscope électronique* (LOUD, 1962).

LOUD étudie les ultrastructures des cellules de foie de Ratte. A partir d'une photographie initiale, l'auteur détermine la zone à étudier afin de l'agrandir et sur cette deuxième photographie, il superpose une grille de 13 lignes parallèles équidistantes. Les résultats sont reproductibles quelle que soit l'orientation de la grille (tabl. 4). Il répète ensuite l'opération sur plusieurs cellules échantillonnées au hasard.

TABLEAU 3

Proportion de tissu épithélial, de colloïde et de stroma dans la thyroïde

Groupe	Tissu								
	Épithélium			Colloïde			Stroma		
	A (%)	B (%)	(A - B)	A (%)	B (%)	(A - B)	A (%)	B (%)	(A - B)
Thyroïde humaine (témoin)	39,2	39,3	— 0,1	44,6	44,7	— 0,1	16,2	16	+ 0,2
Thyroïde humaine (goitre)	12,9	12,5	+ 0,4	86,3	86,2	+ 0,1	0,8	1,3	— 0,5

A : Méthode des pesées.

B : Intégration linéaire.

TABLEAU 4

Mesure des composants cellulaires pour différentes positions de la grille
(Photographie n° 2164 e)

Position de la grille	P. 100 de surface cytoplasmique occupée par :		
	Mitochondrie	Peroxisome	Hyaloplasme
Normale	22,1	3,0	74,9
A partir de la position normale, rotation de :			
— 45°	19,3	3,3	78,6
+ 45°	19,4	2,0	77,4
+ 90°	19,3	2,4	80,4
Moyenne (SE)	20,0 (0,7)	2,7 (0,3)	77,8 (1,2)

C. — Méthode de numérations ponctuelles

a) Principe de la méthode.

Le mérite de cette méthode revient à GLAGOLEV (1934) qui a substitué aux mesures de longueurs des dénombrements de points. En effet, si l'on distribue au hasard des points dans un tissu contenant un composant α en proportion V_α , le rapport du nombre de points en contact avec le composant au nombre total de points sur le tissu donne une estimation de V_α . Le procédé habituellement utilisé consiste à superposer un réseau de points fixes sur la coupe histologique. Pour un nombre total de points égal à P, P_α points sont comptés sur le composant et la relation (1) devient :

$$\begin{aligned} V_\alpha/V &= A_\alpha/A = P_\alpha/P \\ V_\alpha &= A_\alpha = P_\alpha \end{aligned}$$

(8)

On affecte la valeur $1/2$ aux points dénombrés à la limite de 2 catégories cellulaires.

b) Réseau de points de CHALKLEY.

L'estimation du rapport nucléo-cytoplasmique des cellules de foie de Lapin par CHALKLEY (1943) est une des premières applications du principe de GLAGOLEV en histologie. CHALKLEY place sur l'oculaire quatre fils dont les extrémités libres servent de points de repère (fig. 5). Le nombre relatif de points comptés respectivement sur le cytoplasme et sur le noyau est égal à 5,82 alors que pour les mêmes cellules il trouve, par planimétrie, une surface relative égale à 6,2. Les deux méthodes semblent équivalentes. Les résultats sont stables à partir du dénombrement de 350 points (fig. 6).

FIG. 5. — Oculaire de CHALKLEY

FIG. 6. — Variation du rapport cytoplasme-noyau en fonction du nombre total de points comptés sur le noyau

Ultérieurement, il quantifie avec cet oculaire, les modifications vasculaires des tissus normaux et cancéreux (ALGIRE, CHALKLEY *et al.*, 1945).

Sa facilité d'emploi a tenté de nombreux expérimentateurs. ESCHENBRENNER *et al.* (1948) l'utilisent pour étudier les effets des rayons gamma sur le poids testiculaire de Souris, sur les variations du tissu interstitiel et des éléments de la spermatogenèse en fonction de la dose administrée.

c) Autres réseaux d'utilisation courante.

α) Réseau de HAUG.

HAUG suggère de prendre comme points de repère les intersections de 11 droites parallèles et équidistantes avec 11 autres droites perpendiculaires aux premières et équidistantes entre elles (fig. 7) ; le réseau contient 121 points. Il est d'un emploi pénible pour l'observation au microscope optique et les risques d'erreur sont grands. On peut le réserver pour l'étude quantitative sur photographie.

β) Réseau de WEIBEL.

Le réseau de WEIBEL *et al.* (1966) (fig. 8) est une généralisation de celui de HAUG. Il est constitué par un quadrillage principal (lignes en impression très contrastée) ; chaque carré de ceréseau est lui-même subdivisé en 25 carrés élémentaires. Lorsque la proportion du composant varie entre 20 et 80 p. 100, on utilise le réseau de droites en impression contrastée et l'ensemble des droites afin d'avoir une meilleure précision lorsque la proportion de composants est soit supérieure à 80 p. 100, soit inférieure à 20 p. 100.

γ) Réseau de HENNIG.

Étant donné le nombre important de points à dénombrer, les réseaux de HAUG et de WEIBEL sont difficilement utilisables en microscopie optique. De nombreux expérimentateurs emploient dans ce cas l'oculaire intégrateur I de Zeiss, réalisé par HENNIG (1958-1963). L'oculaire contient une grille sur laquelle 25 points sont disposés à l'intérieur d'un cercle (fig. 9).

FIG. 7. — Réseau de HAUG

FIG. 8. — Réseau de WEIBEL

FIG. 9. — Réseau de HENNIG

d) Validité dans la numération ponctuelle.

α) Vérification empirique.

Des fragments de taille et de formes irrégulières occupent 27,3 p. 100 d'une surface connue où ils sont répartis uniformément sans se superposer. De la surface totale, 19 zones différentes mais d'égale superficie sont sélectionnées et observées avec un réseau de 25 points fixes (similaire au

réseau de WEIBEL). Le dénombrement de 475 points fournit une estimation de la surface relative égale à 27,37 p. 100 (130/475, tabl. 5). Il a fallu un minimum de 400 points pour obtenir un pourcentage stable et proche de la valeur réelle (fig. 10) (GANDER, 1970).

TABLEAU 5

Résultats des dénombrements obtenus avec un réseau de 25 points

Surfaces observées	Nbre de points témoins * par surface	Nbre cumulé de témoins	Nbre total de points	Fréquence des témoins
1	5	5	25	0,200 0
2	9	14	50	0,280 0
3	8	22	75	0,293 3
4	5	27	100	0,270 0
5	4	31	125	0,248 0
6	6	37	150	0,246 7
7	6,5	43,5	175	0,248 6
8	10,5	54	200	0,270 0
9	6	60	225	0,266 7
10	6	66	250	0,264 0
11	4,5	70,5	275	0,256 4
12	7,0	77,5	300	0,258 3
13	10	87,5	325	0,269 2
14	7	94,5	350	0,270 0
15	7,5	102	375	0,272 0
16	7	109	400	0,272 5
17	8	117	425	0,275 3
18	5,5	122,5	450	0,272 2
19	7,5	130	475	0,273 7

* Nombre de témoins : on appelle nombre de témoins le nombre de points se superposant au constituant à mesurer.

FIG. 10. — Variation des fréquences de points témoins en fonction du nombre total de points comptés

β) *Démonstration* (WEIBEL, 1963 ; HILLIARD, 1968 ; UNDERWOOD, 1969).

Un composant quelconque est réparti dans un carré de surface A. Il occupe une superficie égale à A_α telle que :

$$A_\alpha = A_A \cdot A$$

Pour l'estimation de A_A , on calcule la probabilité pour qu'un point placé au hasard sur l'ensemble précédent, se superpose au composant. On peut considérer un point comme un carré d'aire infiniment petite et égale à $dx \cdot dy$ (fig. 11). Le nombre de points P_α pouvant recouvrir le carré de surface A est égal à : $A/dx \cdot dy$, alors que le nombre de points P_α qui se superposent au composant est égal à $A_\alpha/dx \cdot dy$.

On calcule la probabilité par le rapport du nombre de points sur le composant au nombre de points sur le carré, c'est-à-dire :

$$P_\alpha/P = A_\alpha/A$$

comme A_α/A correspond à la surface relative

$$A_A = P_P$$

soit d'après DELESSE

$$V_V = \bar{A}_A = \bar{P}_P$$

FIG. 11. — Méthode des numérations ponctuelles

On peut retrouver ce résultat en calculant la probabilité qu'un point placé au hasard dans un volume rencontre un constituant donné.

Signalons que l'équipe de Matheron Serra a donné des démonstrations rigoureuses de ces résultats dans leur théorie de la morphologie mathématique.

e) *Application de la numération ponctuelle sur coupes histologiques.*

α) *Analyse quantitative de la spermatogenèse.*

Des testicules de Carassin (*Carassius auratus*) sont prélevés pendant la période d'activité spermatogénétique. Les spermatozoïdes qui se concentrent dans la lumière des lobules testiculaires, ne peuvent pas se dénombrer aisément.

L'estimation de leur volume relatif dans le testicule peut constituer une évaluation indirecte de leur quantité (photo 1).

L'étude porte sur 2 animaux (A et B) respectivement en début et fin de spermatogenèse. Pour chaque animal 10 coupes de la zone médiane du testicule ont été observées avec l'oculaire intégrateur I de Zeiss au grossissement $\times 250$.

Sur l'ensemble des points comptés, 3 200 pour l'animal A et 3 250 pour le B, 42,2 p. 100 et 73,3 p. 100 sont dénombrés sur les zones contenant des spermatozoïdes (fig. 12).

Il y a une grande stabilité des résultats à partir de 60 champs observés, soit 1 500 points pour l'animal A et 50 Champs soit 1 200 points pour l'animal B.

La différence supposée entre les animaux est de ce fait confirmée et quantifiée par les pourcentages obtenus.

PHOTO 1. — *Exemple d'utilisation du réseau de HENNIG*
(On dénombre 5 points sur la surface occupée par les spermatozoïdes)

FIG. 12. — *Variation du pourcentage de points sur les spermatozoïdes en fonction du nombre de champs observés*

β) Autres applications.

BENITZ et DAMBACH (1964) utilisent aussi l'intégrateur I de Zeiss pour comparer l'effet de 2 antithyroïdiens sur l'épithélium et autres composants de la thyroïde de Rats. DUNNILL l'emploie également dans le cadre d'études quantitatives en pathologie pulmonaire chez l'Homme (1962) ainsi que pour l'évaluation de la croissance postnatale du poumon (1962). Quant à AHMAD et LENNOX ils estiment par cette même technique le volume des cellules de Leydig chez l'Homme (1969).

Il apparaît donc que les méthodes indirectes de mesure des surfaces et des volumes sont d'un emploi facile et non restrictif.

Des trois méthodes présentées, planimétrie, intégration linéaire et numération ponctuelle, la dernière est la plus simple, la plus rapide et la moins fastidieuse. On l'emploie de plus en plus fréquemment.

III. — EXPLOITATION STATISTIQUE DES DONNÉES

Malgré l'emploi d'un réseau dont les points sont répartis régulièrement, on utilise les résultats fondamentaux de la loi normale ⁽¹⁾ et de la loi binomiale (GLADMAN et WOODHEAD, 1960 ; HENNIG, 1963). Leur application permet une étude plus approfondie des dénombrements réalisés sur les Carassins (voir exemple des numérations ponctuelles). En particulier, l'ajustement d'une distribution normale à la distribution du nombre de témoins ⁽²⁾ par champ semble acceptable, car l'écart entre les fréquences expérimentales et théoriques n'est pas significatif (fig. 13 a et 13 b). Dans ce cas

FIG. 13. — Ajustement d'une distribution normale à la distribution du nombre de témoins par champ

le probit de la fréquence cumulée est une fonction linéaire du nombre de témoins (méthode graphique de HENRI, fig. 14).

La comparaison des volumes relatifs moyens et le calcul des limites de l'intervalle de confiance à 95 p. 100 (tabl. 6) confirment l'hypothèse d'une différence significative entre les quantités de spermatozoïdes par animal.

⁽¹⁾ Pour les lois binomiale et normale se référer à l'ouvrage de MORICE : Méthode statistique. SCHWARTZ : Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes (Flammarion).

⁽²⁾ On appelle nombre de témoins le nombre de points du réseau qui se superposent au constituant α .

FIG. 14. — *Ajustement graphique d'une loi normale*
(Méthode de HENRI)

TABLEAU 6
Résultats sur carassins

	Animal	
	A	B
Nombre de champs.....	128	130
Nombre moyen de points se superposant aux spermatozoïdes par champs	10,66	18,32
Estimation de V_v (%).....	42,62	73,29
Intervalle de confiance à 95 %.	$42,62 \pm 1,70$ (40,93 — 44,32)	$73,29 \pm 1,58$ (71,72 — 74,87)

IV. — GÉNÉRALITÉS SUR LES MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE

L'analyse statistique ne se justifie que si l'échantillon est représentatif de sa population d'origine, ce qui pose le problème du choix des coupes, de leur orientation, du nombre de lignes ou de points par réseau, etc.

A. — *Orientation des plans de coupe* (De HOFF, 1967)

L'exemple simple suivant illustre l'importance de l'orientation du plan de coupe : il s'agit d'estimer la part de volume occupée par un composant (α) localisé dans la partie gauche d'un cube (fig. 15). Pour obtenir un échantillon représentatif il est néces-

saire d'observer les plans parallèles à l'axe des x et non pas perpendiculaires, car dans ce dernier cas les surfaces relatives sont nulles ou égales à l'unité. Par conséquent l'orientation du plan de coupe dépend de la localisation et de la répartition du constituant dans le tissu. Ceci implique qu'avant toute expérimentation on procède à une étude préliminaire, pour apprécier l'hétérogénéité du tissu.

FIG. 15. — Choix de l'orientation du plan de coupe lorsque le composant a une distribution localisée (R. T. De Hoff, 1967)

B. — Épaisseur des coupes : effet de Holmes (HILLIARD, 1968 ; ELIAS *et al.*, 1971)

L'égalité entre les surfaces et les volumes relatifs n'est valable que si l'épaisseur des coupes est largement inférieure aux dimensions des objets à mesurer (principe de Delesse).

FIG. 16. — Effet de HOLMES

En microscopie optique l'emploi d'objectifs dont la profondeur de champ est faible permet de se rapprocher de la coupe fine idéale et évite ainsi l'enregistrement des sections d'objets localisés à différentes hauteurs. Certains constructeurs conseillent de fixer la valeur de l'épaisseur au $1/4$ ou au $1/10$ du diamètre équivalent ⁽³⁾ des constituants à mesurer.

(3) On appelle diamètre équivalent d'un constituant le diamètre d'une sphère de même volume.

D'autres sources d'erreur dans l'estimation des surfaces peuvent intervenir : la coupe n'est pas parfaitement plane (constituant en relief, figure. 16 a) ou elle est observée par lumière transmise (fig. 16 b). Dans ce dernier cas la projection sur la surface d'observation d'un corps opaque correspond à la dimension maximum de celui-ci dans la coupe. Il en résulte une surestimation des surfaces relatives proportionnelle à l'épaisseur de coupe. Cependant en biologie les corps parfaitement opaques sont rares et l'observateur constate une différence de densité dans la projection, ce qui entraîne la possibilité de mesurer des surfaces réelles projetées.

C. — *Grossissement de l'objectif*

(GLADMAN et WOODHEAD, 1960 ; HILLIARD et CAHN, 1961)

Afin que la transposition des hypothèses binomiales au domaine biologique soit valable, il faut que chaque point du réseau ait une chance égale V_v de se superposer au composant. L'équiprobabilité n'est pas vérifiée si plusieurs points adjacents peuvent rencontrer systématiquement les mêmes particules. En conséquence le coefficient de grossissement doit être tel que l'intervalle entre les points (et par analogie entre les lignes du réseau) soit égal ou supérieur au diamètre équivalent des constituants. En pratique, on tolère de 1 à 5 points maximum sur la section de la particule.

D. — *Échantillonnage proprement dit* (COCHRAN, 1966 ; DAGNELIE, 1964 ; NOURTIER, 1971 ; WEIBEL, 1970)

Il existe de nombreuses méthodes d'échantillonnage : au hasard, stratifié, systématique, etc. Le choix entre ces différents procédés ainsi que la taille de l'échantillon dépendent essentiellement de la structure du tissu que l'on désire étudier et de la précision souhaitée. Considérons un cas relativement courant : l'échantillonnage à 2 degrés (two stages sampling) de l'organe d'un animal. consiste à prélever un échantillon de p coupes (unités du 1^{er} degré) et pour chacune d'elles à déterminer n champs microscopiques à observer (unités du 2^e degré). Cette méthode s'emploie lorsqu'il existe une différence significative entre les unités du 1^{er} degré, c'est-à-dire entre les coupes. Si les unités du 1^{er} et du 2^e degré sont prélevées au hasard, on montre que la précision de la moyenne s'écrit :

$$V(\bar{x}) = \frac{\sigma_1^2}{p} + \frac{\sigma_2^2}{n \cdot p} \quad (\text{COCHRAN, 1966 ; DAGNELIE, 1964})$$

σ_1^2 et σ_2^2 étant les variances respectives des unités du 1^{er} et 2^e degré, on constate donc que l'augmentation du nombre (n) de champs microscopiques par coupe n'influe que sur le 2^e terme alors que celle du nombre p de coupes diminue les 2 variances partielles. Par conséquent, pour un même nombre total (np) de champs, on a intérêt, dans ce cas particulier, à augmenter p et diminuer n .

La répartition au hasard des champs microscopiques sur la coupe (à l'aide des tables de nombres au hasard) évite à l'observateur de choisir des zones ou d'en éliminer.

Il faut toutefois prendre garde de ne pas mesurer 2 fois le même champ (fig. 17).

En général, en microscopie optique on utilise les méthodes d'échantillonnage systématique. Dans ce cas les champs microscopiques sont également espacés (fig. 18 a).

Afin de respecter l'hypothèse fondamentale d'indépendance entre les individus d'un échantillon, on choisit le premier champ au hasard. Cependant, pour la validité des résultats, encore faut-il que la périodicité de l'échantillonnage diffère de celle du composant sur la coupe. En effet, il peut exister une variation des propriétés du composant avec sa localisation ou son orientation sur la coupe. C'est dans le sens de cette variation qu'il faut positionner les champs microscopiques pour obtenir un échantillon représentatif (fig. 18 b) : l'observation exhaustive étant un cas limite.

FIG. 17. — Répartition des champs microscopiques au hasard sur la coupe histologique

FIG. 18. — Échantillonnage systématique

Le choix et le nombre de coupes histologiques dépendent aussi du sens de variation des propriétés du constituant par rapport au plan de coupe : les problèmes d'échantillonnage étant semblables à ceux rencontrés pour la répartition des champs microscopiques sur la coupe. Retenons qu'en présence d'un gradient perpendiculaire au plan de coupe, l'observation, même exhaustive, de 2 coupes adjacentes, fournit moins d'information sur l'ensemble du tissu que celle de 2 coupes éloignées.

En définitive, il n'existe pas de technique générale d'échantillonnage applicable à tous les cas et ce problème, à lui seul, pourrait faire l'objet d'une étude particulière. WEIBEL (1962), WEIBEL *et al.* (1966), DUNNILL (1964) pour le poumon, WEIBEL *et al.* (1969) pour le foie, BILLARD *et al.* (1972) pour le testicule de Poisson donnent en détail la méthode d'échantillonnage employée ainsi que les raisons de leur choix.

V. — CONCLUSION

La mesure du volume relatif, simple et rapide, est cependant insuffisante pour apprécier le fonctionnement ou l'évolution des cellules d'un organe. Il est intéressant de pouvoir évaluer, en plus du volume, le nombre et la répartition des cellules dans le tissu, leur forme ainsi que la surface cellulaire ou membranaire. Ce dernier paramètre a une importance considérable dans l'étude d'une croissance de tissu, d'une organogenèse et nécessite une mise en œuvre théorique et technique particulière : nous aborderons ces méthodes dans de prochains articles.

Reçu pour publication en novembre 1972.

SUMMARY

QUANTITATIVE STUDY OF ORGANS OR TISSUES

I. — METHODS OF ESTIMATING VOLUME

Following a simple attempt to justify and demonstrate DELESSE's principle, different methods of estimating relative surfaces are presented and criticized.

The methods of weights and planimetry, which are always used, are long and tedious because the various constituents to be measured must be drawn. They may be profitably replaced by two other processes which are the object of this article :

- linear integration,
- point counting.

Linear integration consists of superposing lattice of equidistant parallels on the histologic cross-section and measuring the respective lengths of the line segments which cover the constituent and the whole tissue. The relation of the various lengths gives an estimation of relative surfaces and thus, of relative volumes. Empirical testing and demonstration confirm the value of the method, which is successfully used in studying thyroid activity and the quantification of various liver cell constituents.

The use of lattice points, regularly distributed over the surface, characterizes the method of point counting. Counting the points superposed over the constituent replaces measuring lengths in estimating relative surfaces. The main ordinary systems used are those of : CHALKLEY, HAUG, WEIBEL and HENNIG. The value of the method is tested empirically and demonstrated. It has been used in the quantitative study of spermatogenesis in the goldfish.

For obtaining a statistical analysis of results, precautions to take when sampling are briefly analyzed. Wise orientation of the cross-section plan avoids skewed results. This depends on the localization and distribution of the constituent in the tissue, which implies a preliminary study of the organ before any experimentation. As regards enlargement by the objective, the thickness of cross-sections should be much less than the dimensions of the objects to be measured, and is chosen so that the interval between the lines or points of the system are either equal to or greater than the equivalent diameter of the constituent. This article concludes with generalities on the choice and number of microscope fields and cross-sections.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHMAD K. N., LENNOX B., 1969. Estimation of the volume of Leydig cells in man. *Lancet*, **2**, 461-464.
 ALGIRE G. H., CHALKLEY H. W., LEGALLAIS, PARK H., 1945-1946. Vascular reactions of normal and malignant tissues *in vivo*. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J. Nat. Cancer Inst.*, **6**, 73-85.

- BILLARD R., SOLARI A., ESCAFFRE A. M., 1972. Méthode d'analyse quantitative de la spermatogenèse des poissons Téléostéens. En préparation.
- BENITZ K. F., DAMBACH G., 1964. Quantification of drug-induced morphologic changes with Hennig's point and line-sampling methods using Zeiss integrating eyepieces I and II. *Drug Research*, **14**, 929-935.
- CHALKLEY H. W., 1943. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J. Nat. Cancer Inst.*, **4**, 47-53.
- COCHRAN W. G., 1963. *Sampling techniques*, 413 p, 2^e ed. Wiley, New York.
- DAGNELIE P., 1965. *Cours de statistique mathématique*. Vol. II, 250 p. Association et Maison des étudiants. Gembloux.
- DELESSE M.-A., 1847. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *C. R. Acad. Sci.*, **25**, 544-545.
- DE HOFF R. T., 1967. Sampling of material and statistical analysis in quantitative stereology. Stereology : *Proc. II^e internat. Congr. stereology*, Chicago.
- DUNNILL M. S., 1962. Quantitative methods in the study of pulmonary pathology. *Thorax*, **17**, 320-328.
- DUNNILL M. S., 1962. Postnatal growth of the lung. *Thorax*, **17**, 329-333.
- DUNNILL M. S., 1964. Evaluation of a simple method of sampling the lung for quantitative histological analysis. *Thorax*, **19**, 443-448.
- ELIAS H., HENNIG A., SCHWARTZ D. E., 1971. Stereology : applications to biomedical research. *Physiol. Rev.*, **51**, 158-200.
- ESCHENBRENNER A. B., MILLER E., LORENZ E., 1948. Quantitative histologic analysis of the effect of chronic whole body irradiation with gamma rays on the spermatogenic elements and the interstitial tissue of the testes of mice. *J. Nat. cancer. Inst.*, **9**, 133-147.
- GANDER R., 1970. Les bases de la microstéréologie : exemples pratiques. *Microskopion*, **18-19**, 14.
- GLADMAN T., WOODHEAD J. H., 1960. The accuracy of point counting in metallographic investigations. *J. Iron Steel Inst.*, **194**, 189-193.
- GLAGOLEV A. A., 1934. Quantitative analysis with the microscope by the point method. *Eng. Min. J.*, **135**, 399-400.
- HILLIARD J. E., CAHN J. W., 1961. An evaluation of procedures in quantitative metallography for volume fraction analysis. *Trans. Metal. Soc. AIME*, **221**, 344-352.
- HILLIARD J. E., 1968. Measurement of volume in volume 45-74, in De Hoff, Rhines. *Quantitative microscopy*, Mc Graw-Hill, N. Y.
- HENNIG A., 1958. Considérations critiques sur les mesures de volume et de surface en microscopie. *Bull. Tech. Zeiss*, n° 30.
- HENNIG A., MEYER-ARENDT J. R., 1963. Microscopic volume determination and probability. *Lab. Invest.*, **12**, 460-464.
- LOUD A. V., 1962. A method for the quantitative estimation of cytoplasmic structures; *J. Cell. Biol.*, **15**, 481-487.
- NEUER H., 1966. Analyse quantitative avec le microscope. *Bull. Tech. Zeiss*, n° 60, 65-69.
- NOURTIER C., 1971. Méthodes d'estimation quantitative au service de la cytologie. *Ann. Biol.*, **10**, 242-277.
- ROSIWAL A., 1898. Über geometrische Gesteinanalysen. Ein einfacher Weg zur ziffermässigen Feststellung des Quantitätsverhältnisses der Mineralbestandteile gemengter Gesteine. *Verhandl. k. k. geol. Reichsanstalt Wien.*, 43-175.
- UNDERVOOD E. E., 1969. Stereology, or the quantitative evaluation of microstructures. *J. Micros.*, **89**, 161-180.
- UOTILA U., KANNAS O., 1952. Quantitative histological method of determining the proportions of the principal components of thyroid tissues. *Acta. Endocr.*, **11**, 49-60.
- WEIBEL E. R., 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.*, **12**, 131-155.
- WEIBEL E. R., KISTLER G. S., SCHERLE W. E., 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.*, **30**, 23-38.
- WEIBEL E. R., STAUBLI W., GNÄGI H. R., HESS F. A., 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell. Biol.*, **42**, 68-91.
- WEIBEL E. R., 1970. An automatic sampling stage microscope for stereology. *I. Microsc.*, **91**, 1-18.