ÉTUDE QUANTITATIVE D'ORGANES OU DE TISSUS

II. — MÉTHODES DE MESURE DES SURFACES DE STRUCTURES CELLULAIRES

Aline SOLARI

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

RÉSUMÉ

Dans cet article, nous avons détaillé les méthodes de mesures des surfaces cellulaires à partir de l'observation de coupes histologiques. Différentes applications biologiques ont été présentées.

INTRODUCTION

L'objet de cet article est de présenter une méthode rapide de mesure des surfaces des cellules et de leurs constituants : surfaces des organites intracytoplasmiques, des membranes cellulaires, voire même des surfaces de contacts entre différents compartiments cellulaires.

Cette méthode, qui ne nécessite aucun appareillage coûteux, est une application des résultats de probabilité géométrique et de la théorie des corps convexes.

Dans la première partie de cet article, nous détaillons les méthodes de mesure des longueurs de courbes situées dans un plan, car sur coupes histologiques les sections de surface apparaissent comme des lignes plus ou moins sinueuses.

Dans la deuxième partie, nous présentons les relations existant entre les mesures faites sur coupes et celles des surfaces cellulaires réelles. Ces mesures sont obtenues en superposant des systèmes de réseaux sur coupes histologiques ou sur microphotographies.

Les différentes applications biologiques présentées ont été choisies en fonction de la particularité du tissu observé et de la forme du réseau.

A. — MÉTHODES DE MESURE DES PÉRIMÈTRES DE COURBES SITUÉES DANS UN PLAN

I. — Principes et méthodes de mesure

I. Cas d'un segment de droite.

Les mesures de segments de droite sont des applications du problème de l'aiguille de Buffon ⁽¹⁾ ou de la théorie des projections.

— Le problème de l'aiguille de Buffon s'énonce ainsi :

« On jette au hasard une aiguille parfaitement cylindrique sur un réseau constitué de parallèles équidistantes et on cherche à calculer avec quelle probabilité l'aiguille rencontre l'une des parallèles. »

On peut le résoudre soit en obtenant la solution par une intégrale, soit en utilisant la propriété de linéarité des espérances mathématiques ⁽²⁾ (DARMOIS, 1957 ; BOREL, DELTHEIL et HURON, 1962 ; KENDALL et MORAN, 1963 ; CALOT, 1967).

Il en résulte si :

a : longueur de l'aiguille

d : distance entre les parallèles et $a < d$

$$\text{Probabilité de rencontre} = P(R) = \frac{2a}{\pi d} \quad (1)$$

Pour un nombre élevé de jets, la rencontre de l'aiguille avec l'une des parallèles (événement favorable) se produit avec une fréquence proche de sa probabilité ce qui autorise à écrire

$$\frac{I}{M} = \frac{2a}{\pi d} \quad (1 \text{ bis}) \quad (3)$$

M et I étant respectivement le nombre de jets de l'aiguille et le nombre de rencontres (ou d'intersections) de l'aiguille et des parallèles.

Cependant, ce n'est pas l'estimation de la probabilité de rencontre qui nous

⁽¹⁾ C'est BUFFON (1777) qui en a donné le premier, la solution correcte, les auteurs suivants ayant contribué à la formulation définitive.

⁽²⁾ $E(x)$ = espérance mathématique de x .

Pour x variable discrète de probabilité P_x : $E(x) = \sum x P_x$.

Pour x variable continue de densité de probabilité $f(x)dx$: $E(x) = \int x f(x) dx$.

⁽³⁾ Le résultat (1 bis) se prête facilement à une vérification expérimentale car lorsque le nombre de jets augmente la valeur $\frac{2a}{d}$ divisée par $\frac{I}{M}$ tend vers π .

Les résultats de quelques expériences sont rapportés par KENDALL et MORAN (1963) et figurent dans le tableau 1.

On doit remarquer l'écart particulièrement faible entre certains résultats et la valeur théorique de π ; cet écart est plus faible que ne le voudrait le hasard seul. L'expérience de LAZZERINI, en particulier, présente, une erreur de 3×10^{-7} (MANTEL, 1953). KENDALL et MORAN (1963) l'expliquent par l'arrêt de l'expérience au moment le plus judicieux, c'est-à-dire choisi en raison de la faible différence entre la valeur observée et théorique.

intéresse ici, mais celle de la longueur de l'aiguille que l'on déduit de la fréquence des rencontres et des valeurs des constantes d et π . Soit :

$$a = \frac{1}{M} \frac{\pi d}{2} \quad (2)$$

Par conséquent, la longueur d'un segment de droite est proportionnelle à la fréquence des intersections du segment et des parallèles d'un réseau.

TABLEAU I

Exemples d'expériences rapportées par KENDALL et MORAN

Expérimentateur	Rapport de la longueur de l'aiguille à la distance entre les parallèles	Nombre de jets (M)	Nombre de rencontres (I)	$\widehat{\pi}$ Estimation de π
WOLFF (1850)	0,8	5 000	2 532	3,159 6
SMITH (1855)	0,6	3 204	1 218,5	3,155 3
de MORGAN (1860)	1,0	600	382,5	3,137
FOX (1884)	0,75	1 030	489	3,159 5
LAZZERINI (1901)	0,83	3 408	1 808	3,141 592 9
REINA (1925)	0,541 9	2 520	859	3,179 5
GRIDGEMAN (1960)	0,785 7	2	1	3,143

— La théorie des projections évite à l'expérimentateur le dénombrement des intersections. En effet, considérons un segment de droite de longueur a qui forme un angle θ avec un axe ; la projection $a'(\theta)$ du segment sur l'axe est égale au produit de la longueur du segment par le cosinus de l'angle soit :

$$a'(\theta) = a |\cos \theta|$$

Si l'on admet que θ est distribué uniformément sur $(0, 2\pi)$ la longueur moyenne des projections sur l'axe s'exprime sous la forme suivante

$$\overline{a'} = \frac{1}{2\pi} \int_{0=0}^{\theta=2\pi} a |\cos \theta| d\theta$$

Ce qui entraîne, après résolution de l'intégrale, le résultat suivant dû à CAUCHY (rappelé par KENDALL et MORAN, 1963)

$$\overline{a'} = \frac{2a}{\pi} \quad \text{d'où} \quad a = \frac{\pi}{2} \overline{a'} \quad (3)$$

Par conséquent, la longueur d'un segment de droite est proportionnelle à la longueur moyenne de ses projections sur un axe.

En conclusion, si un segment de droite est placé de nombreuses fois au hasard, par rapport à un axe, la longueur du segment est égale au produit de $\left(\frac{\pi}{2}\right)$ par la longueur moyenne des projections du segment sur l'axe.

2. Extension à des courbes de forme quelconque.

Pour estimer des longueurs de courbes de forme quelconque, fermées ou non, l'expérimentateur peut dénombrer les intersections de la courbe et des parallèles d'un réseau ou mesurer les projections de cette courbe sur un axe.

Ces méthodes sont des généralisations de celles exposées dans le paragraphe précédent ; elles sont équivalentes et la facilité de leur mise en œuvre oriente le choix de l'expérimentateur vers l'une ou l'autre.

— Une courbe de forme quelconque peut être considérée comme la juxtaposition de segments de longueur a . On ne recherche plus alors avec quelle probabilité une des parallèles du réseau rencontre la courbe mais l'espérance mathématique du nombre d'intersections : $E(I)$. Si le périmètre de la courbe est égal à B ($B = \sum a$) on montre que (SMITH et GUTTMAN, 1953 ; MANTEL, 1953 ; MORAN, 1956 ; UNDERWOOD, 1968).

$$E(I) = \frac{2B}{\pi d}$$

FIG. 1. — Estimation du périmètre de courbe de forme quelconque

O : intersection des parallèles et du périmètre

d : distance entre les parallèles

I : nombre d'intersections = 14

Pour des positions aléatoires de la courbe sur le réseau ce paramètre est estimé par le nombre moyen d'intersections de la courbe et des parallèles du réseau (fig. 1)

$$E(I) = \frac{I}{M}$$

I et M étant respectivement le nombre d'intersections et le nombre de positions de la courbe sur le réseau.

On en déduit :

$$B = \frac{I}{M} \frac{\pi d}{2} \quad (4 a)$$

ou pour 1 jet

$$B = \frac{I \pi d}{2} \quad (4 b)$$

— Pour mesurer la longueur d'une courbe à partir de la longueur des projections on tient compte du nombre de fragments de courbe qui se projettent sur la même partie d'axe (fig. 2). Avec l'exemple de la fig. 2 on obtient pour une position donnée de la courbe :

$$B'(\theta) = 2 \text{ CD} + \text{DE} + 3 \text{ EF} + \text{FG} \quad (\text{KENDALL et MORAN, 1963}).$$

FIG. 2. — Projection sur un axe d'une courbe de forme quelconque

Pour des positions aléatoires de la courbe, la longueur moyenne des projections de la courbe sur un axe est égale au produit de la longueur de la courbe par $\frac{\pi}{2}$ (KENDALL et MORAN, 1963 ; MORAN, 1966 ; AHERNE, 1968).

Soit

$$\overline{B'} = \frac{\pi}{2} B$$

d'où

$$B = \frac{2}{\pi} \overline{B'} \quad (5)$$

II. — Domaines d'application dans le plan

Dès 1930 STEINHAUS a conseillé l'emploi de la méthode des projections pour les mesures linéaires au microscope, ou à la loupe. Les relations précédentes (4 ou 5) permettent l'estimation d'autres caractéristiques, telle que l'aire d'une surface plane, et trouvent leur application, en particulier, à des études histologiques de muscles dystrophiques (AHERNE, 1968).

AHERNE se référant aux travaux de CROFTON (1898), rappelle que l'aire A d'une surface plane est proportionnelle à son périmètre B soit :

$$A = B \frac{c}{\pi} \quad (6)$$

où, c représente la longueur d'une corde tracée au hasard, sur la surface.

Par ce procédé, AHERNE évalue l'aire moyenne de la fibre musculaire du muscle deltoïde, sur coupes histologiques de 5 μ d'épaisseur. L'auteur assimile la fibre à un contour fermé de forme simple et mesure, au micromètre oculaire, la longueur du périmètre (par la méthode des projections) et la longueur d'une corde prise au hasard sur la surface.

La projection du périmètre correspond à la distance entre deux points opposés de la fibre.

La longueur de la corde correspond à la distance entre les 2 points opposés constitués par les intersections des graduations du micromètre oculaire et du contour de la fibre.

Pour un champ microscopique donné, trois positions différentes de l'oculaire permettent d'obtenir 3 répétitions pour chaque type de mesure. A partir des valeurs obtenues sur les 250 fibres musculaires observées l'auteur trouve une aire moyenne de la fibre de $832,14 \mu^2 \pm 18,58$ (précision de 2,2 p. 100) et signale, en particulier, la grande rapidité du procédé.

B. — MÉTHODES DE MESURE DES SURFACES DE STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES A PARTIR DE COUPES HISTOLOGIQUES

I. — Définition et calcul de la densité de surface

De nombreux auteurs (TOMKEIEFF, 1945 ; CAMPBELL et TOMKEIEFF, 1952 ; SMITH et GUTTMAN, 1953 ; CHALKLEY, CORNFIELD et PARK, 1949 ; HENNIG, 1958 ; SALTIKOV, 1967) indépendamment les uns des autres et par des méthodes différentes ont établi la relation fondamentale suivante :

$$\frac{S}{V_T} = \frac{4}{\pi} \frac{B}{A} \quad (7)$$

où (fig. 3)

FIG. 3. — Généralisation du problème de l'aiguille de Buffon

S : mesure de la surface des structures ;

V_T : volume de référence dit volume test ;

B : longueur de périmètre des sections des structures ;

A : surface de référence sur le plan de coupe.

Soit, d'après les notations conformes aux conventions utilisées en stéréologie :

$$\frac{S}{V_T} = S_V \quad \text{et} \quad \frac{B}{A} = B_A$$

$$S_V = \frac{4}{\pi} B_A \quad (7 \text{ bis})^{(1)}$$

⁽¹⁾ Ce résultat peut être obtenu par l'étude de la projection des corps convexes (MORAN, 1944) ou en transposant dans l'espace le problème de l'aiguille de BUFFON (fig. 3).

On appelle la quantité S_v *densité de surface*.

Pour estimer la densité de surface S_v , il est nécessaire de supposer que les structures sont réparties au hasard dans le tissu. Si cette hypothèse est vérifiée, on mesure B_A sur plusieurs coupes prises au hasard et on calcule ensuite la moyenne des valeurs ainsi obtenues.

A partir de la densité de surface on déduit la surface des structures.

$$S = S_v V_T \quad (8)$$

II. — Systèmes de réseaux d'usage courant pour le calcul de B_A (NOURTIER, 1971 ; WEIBEL, 1969 ; UNDERWOOD, 1968)

La mise au point de réseaux de formes variées a facilité l'estimation de B_A sur coupes histologiques.

1. Réseaux constitués de droites parallèles.

Ces réseaux sont semblables à ceux utilisés pour l'estimation des longueurs de segments de droite (aiguille de BUFFON) ou des périmètres de surfaces de forme quelconque (fig. 1). D'après la relation 4, la longueur B du périmètre est proportionnelle aux nombres d'intersections des parallèles et du contour de la surface étudiée

$$B = \frac{\pi}{2} I d$$

En divisant la valeur précédente par l'aire observée sur la coupe $A = d L$, L représentant la longueur totale des parallèles constituant le réseau, on obtient la longueur par unité de surface

$$\frac{B}{A} = \frac{\pi}{2} \frac{I}{L} \quad \text{ou} \quad B_A = \frac{\pi}{2} I_L \quad (9)$$

En portant la valeur de B_A dans la relation 7 *bis* on obtient

$$S_v = 2 \frac{I}{L_T} = 2 I_L \quad (10)$$

Si l'on s'intéresse, par exemple, à l'estimation de la surface de reticulum endoplasmique par unité de volume du cytoplasme il convient :

- de mesurer sur la coupe histologique (ou sur la photographie de celle-ci) (photo 1 a) la longueur des lignes du réseau qui sont superposées au cytoplasmes, L_T ;
- de dénombrer les intersections des parallèles et du reticulum, I .

On obtient ainsi un cas particulier de la relation 10

$$S_v = 2 \frac{I}{L_T} \quad (11)$$

car

$$B_A = \frac{\pi}{2} \frac{I}{L_T}$$

PHOTO 1. — Ultrastructure de cellules de canal éfférent de *Lebistes reticulatus*

En pratique, on peut construire un réseau pour chaque cas particulier : la distance entre les parallèles dépend de certaines caractéristiques du tissu ; elle sera très faible pour l'estimation de la surface de microvillosités étant donné le nombre important de replis. Signalons, qu'il existe chez Zeiss, l'oculaire intégrateur II (fig. 4) réalisé à la suite des travaux de HENNIG (1958) et utilisé en microscopie optique.

FIG. 4. — Oculaire intégrateur II de Zeiss

2. Réseaux composés de droites non parallèles.

Le parallélisme des droites n'est pas une condition indispensable pour l'estimation de la densité de surface ; il doit même être évité si l'on soupçonne une orientation préférentielle des structures tissulaires. Certains expérimentateurs ont recherché le système le mieux adapté pour la résolution de leurs problèmes ; ils utilisent la relation (10) ou (11).

Exemples :

RICHARDSON (1953) compare les résultats obtenus sur des projections de coupes de glandes mammaires avec 8 modèles de réseau circulaire, de 19 cm de diamètre. Ces réseaux diffèrent entre eux par le nombre de lignes (1 à 24) et par la répartition — au hasard ou quelconque — de ces dernières dans le cercle (fig. 5). La longueur totale des lignes par réseau varie de 17 à 300 cm. Les résultats trouvés par l'auteur sont reproductibles quelle que soit la nature de la répartition des segments de droites.

Un des 8 réseaux ne comprend qu'une seule ligne de 19 cm de longueur. Sa position est déterminée au hasard et correspond à l'un des diamètres du cercle. L'emploi de ce réseau ne diminue aucunement la précision puisque les résultats diffèrent de 3 p. 100 seulement de ceux obtenus avec la grille composée de 24 lignes de 300 cm de longueur totale. En conséquence, l'auteur adopte pour l'étude de la glande mammaire une seule droite par réseau.

FIG. 5. — *Système testé par RICHARDSON*

DUNNILL (1962) pour l'examen du tissu pulmonaire, emploie également un réticule circulaire composé uniquement de 2 diamètres perpendiculaires. Dans ce cas particulier les intersections des diamètres avec les membranes des parois alvéolaires sont comptées doubles car les 2 faces membranaires sont contiguës. Ce qui donne

$$S_v = 4 \frac{I}{L_T} \quad (12)$$

3. Systèmes à usage multiple.

L'emploi de la relation (11) oblige l'expérimentateur à mesurer des longueurs.

Les deux systèmes présentés ici, évitent cette étape et permettent de mesurer en même temps la densité de surface et le volume relatif occupé par les structures étudiées (SOLARI, 1973).

FIG. 6. — *Grille de Saltikov*

○ : Intersection du périmètre et des droites de la grille ; $I = 18$

● : Points de la grille sur la surface limitée par le périmètre ; $P_T = 15$

La grille, proposée par SALTIKOV (1967) pour l'analyse des poudres métalliques, est composée de 2 groupes de parallèles équidistantes, le deuxième groupe étant perpendiculaire au premier (fig. 6). On appelle :

L : longueur totale des parallèles de la grille ;

P : nombre total des intersections des droites de la grille;

P_T : nombre d'intersections des droites de la grille qui se superposent à la section des structures.

FIG. 7. — Système composé de 21 segments de droite de longueur Z
(WEIBEL, 1966)

FIG. 8. — Système composé de 50 ou 84 segments de droite de longueur Z
(WEIBEL, 1966)

On peut montrer que

$$L_T = L \frac{P_T}{P} \quad (13) \quad (1)$$

En portant cette valeur dans la relation (11) on obtient

$$S_V = 2 \frac{I}{L} \frac{P}{P_T} \quad (14)$$

L'emploi de réseaux composés de courts segments de droite, de même longueur Z , qui sont soit parallèles et disjoints (fig. 7-8) soit distribués dans plusieurs directions (fig. 9) conduit à modifier en conséquence la relation (11) (WEIBEL, KISTLER et SCHERLE, 1968).

FIG. 9. — Système composé de 15 segments de droites de même longueur Z
(WEIBEL, 1963)

Les extrémités des segments représentent les points pour les numérations ponctuelles : elles sont en nombre P . Le nombre de droites est donc égal à $\frac{P}{2}$ ce qui entraîne pour la longueur totale des segments de droites :

$$L = \frac{PZ}{2}$$

En portant cette valeur dans l'équation (13) on en déduit

$$L_T = \frac{P_T Z}{2}$$

Par suite la densité de surface devient (photo 1 b)

$$S_V = \frac{4I}{P_T Z} \quad (15)$$

(1) $\frac{L_T}{L}$ ou $\frac{P_T}{P}$ sont des estimations du volume relatif V_V

$\frac{L_T}{L}$: d'après la méthode d'intégration linéaire,

$\frac{P_T}{P}$: d'après la méthode de numérations ponctuelles (SOLARI, 1973),

$V_V = \frac{V_T}{V}$: volume de la structure (T) rapporté au volume total de tissu.

Cette relation a été mise au point et préconisée pour déterminer le rapport de surface à volume de structures isolées ⁽¹⁾ (CHALKLEY, CORNFIELD et PARK, 1949 ; CORNFIELD et CHALKLEY, 1951) : par exemple le rapport surface à volume de noyaux cellulaires (photo 2).

PHOTO 2. — Ultrastructure de noyau de cellules de canal efférent de testicules de *Lebistes reticulatus* au stade T₁

III. — Application à des problèmes biologiques

1. Études de cellules hépatiques.

Les études cytologiques et en particulier la description quantitative des structures cytoplasmiques sont grandement simplifiées par l'emploi des méthodes stéréologiques et l'estimation des paramètres S_v et V_v .

LOUD (1962) aborde ainsi l'analyse morphométrique des cellules de foie de rat normal, il étudie ensuite l'effet des fixateurs (1965). Ultérieurement, sur des rats normaux, il compare les propriétés des cellules parenchymateuses pour différentes zones du foie (périphérique, intermédiaire et centrale) (1968). Il calcule, entre autre, les densités de surface du réticulum endoplasmique (lisse ou rugueux), des enveloppes des mitochondries et montre que 80 p. 100 des hépatocytes normaux sont similaires pour ces 2 constituants. Les cellules qui présentent le plus de variations sont situées au voisinage de la veine centrale. Cette analyse permet de quantifier cytologiquement

⁽¹⁾ Afin d'obtenir une confirmation expérimentale de la relation 15, CHALKLEY *et al.* (1949) incluent dans de la paraffine des fragments de bois de balsa coupés en cubes ou en parallélépipèdes de côtés déterminés. Deux lots sont constitués :

- Le 1^{er} ne contient que des cubes.
- Le 2^e contient un mélange de cubes et de parallélépipèdes accolés.

Les coupes des différents lots sont disposées côte à côte et sur la surface ainsi obtenue une aiguille est jetée de nombreuses fois. A chaque jet les valeurs du rapport $\frac{V}{S}$ sont calculées à partir de l'inverse de l'équation 15 et comparées à la valeur obtenue géométriquement d'après les dimensions connues. L'accord est satisfaisant puisque les auteurs trouvent un écart inférieur à 5 p. 100 entre les deux valeurs quel que soit le lot.

les altérations provoquées par la cortisone (WIENER *et al.*, 1968). La grille employée par ces auteurs est semblable à celle utilisée par SALTIKOV (fig. 6).

WEIBEL *et al.* (1969), STAUBLI (1969) étudiant (avec la grille n° 8) les effets du phénobarbital sur les hépatocytes de rat, ont montré l'évolution significativement différente entre les densités de surface du réticulum endoplasmique lisse et rugueux en fonction de la durée du traitement.

2. *Étude de cellules intestinales.*

Lorsque les structures sont réparties dans le tissu, suivant une direction préférentielle, l'hypothèse de distribution au hasard n'est plus vérifiée.

C'est le cas de la muqueuse intestinale qui a rarement été analysée par des procédés stéréologiques. Les observations étaient jusqu'alors basées sur des mesures — au micromètre oculaire — de l'épaisseur de la muqueuse, de la profondeur des cryptes et des longueurs des villosités (photo 3). La surface des villosités était rapportée au centimètre de muqueuse selon la technique proposée par FISHER (1950).

PHOTO 3. — *Ultrastructure de jejunum de rat axénique*

Ces mesures reposent souvent sur une appréciation plus ou moins subjective du niveau où les cryptes et les villosités commencent (DUNNILL et WHITEHEAD, 1971). Une définition arbitraire de la structure à quantifier risque d'introduire une perte de précision préjudiciable pour les expérimentateurs qui cherchent à détecter de faibles degrés d'atrophie villositaire. DUNNILL et WHITEHEAD suggèrent donc l'emploi des méthodes stéréologiques, facilement standardisables et qui offrent la possibilité d'obtenir un grand nombre de données dans un minimum de temps.

Sur des biopsies intestinales humaines les auteurs appliquent un réseau simi-

laire à celui de la figure 9 (photo 3) et ils calculent le rapport de la surface des villosités au volume de muqueuse. Ils ont ainsi pu mettre en évidence des différences hautement significatives entre 3 lots qui, par une simple analyse histologique, n'étaient pas dissemblables (tabl. 2).

TABLEAU 2

Résultats de biopsies intestinales d'après DUNNILL et WHITEHEAD

Lot	Témoin	Intermédiaire	Malades
Nombre d'individus	11	6	12
Observations cliniques	individus sains	syndromes de mauvaise absorption	mauvaise absorption
Observations histologiques (qualitatives)	rien à signaler	légère détérioration de la muqueuse mais aucune conclusion possible	nette hyperplasie des cryptes, sévères atrophies des villosités
$\frac{S_z}{V} \pm SD$	46 ± 12	HS $\longleftrightarrow$ $23,7 \pm 2,9$	HS $\longleftrightarrow$ $8,4 \pm 3,6$
Nombre moyen de points par champs sur les villosités $\pm SD$	$19,1 \pm 4,1$	$15,6 \pm 2,4$	$19,2 \pm 2,5$

SD : Déviation standard.

HS : Différence hautement sinificative $P < 0,01$.

Des problèmes analogues se rencontrent fréquemment en médecine où il est fondamental de pouvoir découvrir un dérèglement cellulaire ou autre à son début. Cette recherche s'avère d'autant plus difficile que l'évolution du phénomène est de nature progressive ⁽¹⁾.

3. Études de la sécrétion et de la respiration.

Les phénomènes de sécrétion cellulaire ou d'échanges gazeux entre différents compartiments peuvent également être étudiés par les méthodes décrites dans les pages précédentes. Ainsi, à partir de l'observation de tissu mammaire de chèvre, RICHARDSON (1953) trouve une corrélation significative entre la densité de surface de l'épithélium alvéolaire et la quantité de lait produite.

De même, dans l'étude de la respiration pulmonaire, DUNNILL (1962-1964) met en évidence une différence nette entre le poumon normal et le poumon anormal

⁽¹⁾ Cette méthode pourrait permettre de caractériser en particulier des phénomènes progressifs d'atrésie des follicules ovariens.

à partir des mesures de surface alvéolaire par unité de volume pulmonaire. Ce même auteur (1962) étudie également la croissance de la membrane pulmonaire en fonction de l'âge (0 à 8 ans).

Les réticules employés par ces 2 auteurs ont déjà été décrits (p. 10).

4. *Autres exemples.*

La méthode des intersections a été utilisée dans des domaines variés. Citons par exemple :

— les estimations des surfaces du cortex cérébral (ELIAS et SCHWARTZ, 1967-1969) ;

— les estimations de la surface osseuse ou « trabeculae » nécessaire pour les études de formation et absorption osseuse (DUNNILL, ANDERSON, WHITEHEAD, 1967 ; BENITZ et DAMBACH, 1964 ; LLOYD *et al.*, 1968).

IV. — *Conclusion*

L'estimation de la densité de surface apporte une information quantitative sur des changements d'état physiologique des cellules. Elle constitue, en outre, un précieux outil pour détecter l'altération des activités cellulaires sous l'action de drogues : altérations souvent caractérisées par des modifications des membranes.

L'étude des méthodes stéréologiques a été très développée et approfondie par le groupe de Morphologie Mathématique dirigé par MM. MATHERON et SERRA ⁽¹⁾. Cette équipe a mis au point un appareil, l'analyseur de texture (KLEIN, SERRA, 1972), sur lequel les différentes techniques stéréologiques peuvent être programmées.

Reçu pour publication en avril 1975.

SUMMARY

QUANTITATIVE STUDY OF ORGANS OR TISSUES.

II. — METHODS FOR MEASURING THE SURFACE AREAS OF CELL STRUCTURES

The purpose of this paper is to supply a rapid method for measuring the surface areas of cells and of their components : surface areas of the cytoplasmic organoids, of the cell membranes and even the contact areas between different cell compartments.

This method, which does not require any expensive device, represents the application of the results of the geometrical probability and of the theory of convex bodies.

In the first part, a detailed description is made of the methods used to measure curve lengths situated on a plane, because, histologically, cross-sections of surface areas appear as more or less sinuous lines.

In the second part, the relationships between the measurements made on sections and those performed on real cell surface areas, are presented. These measures were obtained by superposing network systems on histological sections or on photo-micrographies.

The different biological applications were chosen according to the particularity of the tissue studied and the form of the network.

⁽¹⁾ École des Mines, Laboratoire de Morphologie mathématique, 35 Bd Saint-Honoré, Fontainebleau.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHERNE W., 1968. A method of determining the cross sectional area of muscle fibres. *J. Neurol. Sci.*, **7**, 519-528.
- BENITZ K. F., DAMBACH F., 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**, 929-939.
- BOREL E., DELTHEIL R., HURON R., 1962. *Probabilités et erreurs*. Armand Colin, n° 34, Paris.
- CALOT G., 1967. *Cours de calcul des probabilités*. Dunod, Paris.
- CAMPBELL H., TOMKEIEFF S. I., 1952. Calculation of the internal surface of a lung. *Nature*, **170**, 117.
- CHALKLEY H. W., CORNFIELD J., PARK H., 1949. A method for estimating volume-surface ratios. *Science*, **110**, 295-297.
- CORNFIELD J., CHALKLEY H. W., 1951. A problem in geometric probability. *J. Washington Acad. Sci.*, **41**, 226.
- DARMOIS G., 1957. *Calcul des probabilités*. Centre de documentation universitaire. Les cours de Sorbonne.
- 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.
- DUNNILL M. S., ANDERSON J. A., WHITEHEAD R., 1967. Quantitative histological studies on age changes in bone. *J. Path. Bact.*, **94**, 275-291.
- DUNNILL M. S., WHITEHEAD R., 1972. A method for the quantitation of small intestinal biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.*, **25**, 243-246.
- ELIAS H., SCHWARTZ D., 1969. Surface areas of the cerebral cortex of mammals determined by stereological methods. *Science*, **166**, 111-112.
- ELIAS H., KOLODNY S., SCHWARTZ D., 1967. In ELIAS, *Stereology*, Springer-Verlag New York, 77-78.
- FISHER R. B., PARSONS D. S., 1950. The gradient of mucosal surface area in the small intestine of the rat. *J. Anat. London*, **84**, 272-282.
- HENNIG A., 1958. Considérations critiques sur les mesures de volume et de surface en microscopie. *Bulletin technique Zeiss* n° 30.
- KENDALL M. G., MORAN P. A. P., 1963. *Geometrical probability*. London, Griffin and Co, 125 p.
- KLEIN J. C., SERRA J., 1972. The texture analyser. *J. Microscopy*, **95**, 349-356.
- LLOYD E., ROWLAND R. E., HODGES D., MARSHALL J. H., 1968. Surface to volume ratios of bone determined by computer analysis of microradiographs. *Nature*, **218**, 365-366.
- LOUD A. V., 1962. A method for the quantitative estimation of cytoplasmic structures. *J. Cell. Biol.*, **15**, 481-487.
- LOUD A. V., BARANY W. C., PACK B. A., 1965. Quantitative evaluation of cytoplasmic structures in electron micrographs. *Lab. Invest.*, **14**, 996-1008.
- LOUD A. V., 1968. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.*, **37**, 27-46.
- MANTEL N., 1953. An extension of the Buffon needle problem. *Ann. Math. Stat.*, **24**, 674-677.
- MORAN P. A. P., 1944. Surface area of small objects. *Nature*, **154**, 173.
- MORAN P. A. P., 1966. Measuring the length of a curve. *Biometrika*, **53**, 359-364.
- NOURTIER C., 1971. Méthodes d'estimation quantitative au service de la cytologie. *Ann. Biol.*, **20**, 241-278.
- RICHARDSON K. C., 1953. Measurement of the total area of secretory epithelium in the lactating mammary gland of the goat. *J. endocrin.*, **9**, 170-184.
- SALTIKOV S. A., 1967. In ELIAS, *Stereology*. Springer-Verlag, New York, 63-64.
- SMITH C. S., GUTTMAN L., 1953. Measurement of internal boundaries in three dimensional structures by random sectioning. *J. metals*, **5**, 81-87.
- SOLARI A., 1973. Étude quantitative d'organes ou de tissus. I. Méthodes d'estimations des volumes. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, **13**, 247-265.
- STAÜBLI W., HESS R., WEIBEL E. R., 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.*, **42**, 92-112.
- STEINHAUS H., 1930. Zur Praxis der Rektifikation und zum Längenbegriff. *Akad. Wiss. Leipzig, Ber.*, **82**, 120-130.
- TOMKEIEFF S. I., 1945. Linear intercepts areas and volume. *Nature*, **155**, 24.
- UNDERWOOD E. E., 1968. In DEHOFF-RHINES, *Quantitative microscopy*, 77-127, McGraw Hill, Book Company, New York.

- 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. L., 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell. Biol.*, **30**, 23-38.
- WEIBEL E. R., STÄUBLI 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., 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, **26**, 235-302.
- WIENER J., LOUD A. V., KIMBERG D. V., SPIRO D., 1968. A quantitative description of cortisone-induced alterations in the ultrastructure of rat liver parenchymal cells. *J. Cell. Biol.*, **37**, 47-61.
-