

# Coupe frontale de l'articulation fémoro-tibiale dans les études de toxicité par voie intra-articulaire chez le beagle et le macaque

ERBC



## Auteurs:

Corinne Bernard<sup>1</sup>, Axel Legrand<sup>1</sup>, Caroline Tellier<sup>1</sup>, Elise Lupo<sup>1</sup>, Cécile Sobry<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ERBC Blois, 6 rue des Champs Godin, 41220, Saint Laurent Nouan, FRANCE  
alegrand@erbc-group.com

## Contexte

L'évaluation histopathologique reste le paramètre le plus important dans l'évaluation de la toxicité par voie intra-articulaire. L'articulation fémoro-tibiale est généralement coupée sur un plan para-sagittal (coronal) dans les études réglementaires de toxicologie préclinique dans toutes les espèces, rongeurs (Fossey et al., 2016) et non-rongeurs. Or il est recommandé d'utiliser des sections frontales pour la voie intra-articulaire (Emami et al., 2018). Chez les rongeurs, les sections frontales des articulations sont utilisées plus couramment pour les modèles animaux de maladies articulaires dégénératives et les études d'efficacité (Bendele, 2001 ; Bolon et al., 2011). A cause de la taille des articulations, la coupe frontale s'avère moins couramment réalisée chez les espèces non-rongeurs que chez les rongeurs. Cet axe de coupe permet pourtant d'évaluer une plus grande surface articulaire et de visualiser les régions latérales et médiales de l'articulation. En effet, les différences de concentration de produit injecté entre le côté latéral et le côté médial peuvent influencer le développement des lésions. Alors que la méthode de section frontale de l'articulation de rongeurs est décrite dans la littérature (Bolon et al., 2011), ce n'est pas le cas pour les non-rongeurs, en particulier le chien.

Nous présentons ici la technique de coupe frontale de l'articulation fémoro-tibiale que nous avons mise au point pour les études par voie intra-articulaire chez le beagle et le macaque cynomolgus, en illustrant les résultats obtenus par les colorations histologiques les plus couramment utilisées dans l'évaluation des articulations (Schmitz et al., 2010).

## Objectif

L'objectif de la mise au point est d'obtenir une coupe frontale d'articulation fémoro-tibiale entière sur une lame de taille standard (76x25 mm), applicable à des études BPL dans des conditions acceptables de qualité, reproductibilité et rendement.

## Matériels et méthodes

**Espèces :** Chien Beagle, Macaque Cynomolgus (*Macaca fascicularis*).

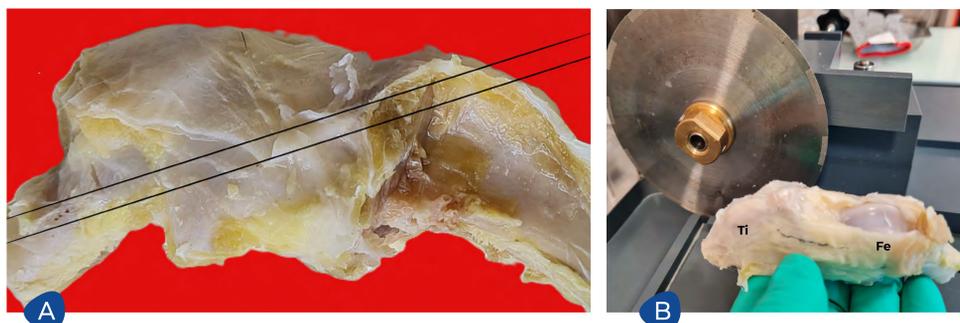
**Fixateur :** Formol 72h puis transfert en PBS.

**Nombre d'animaux (naïfs) utilisés pour la mise au point :** 3 chiens, 3 macaques.

Ces animaux étaient par ailleurs utilisés pour d'autres essais et prélèvements selon les recommandations des 3Rs.

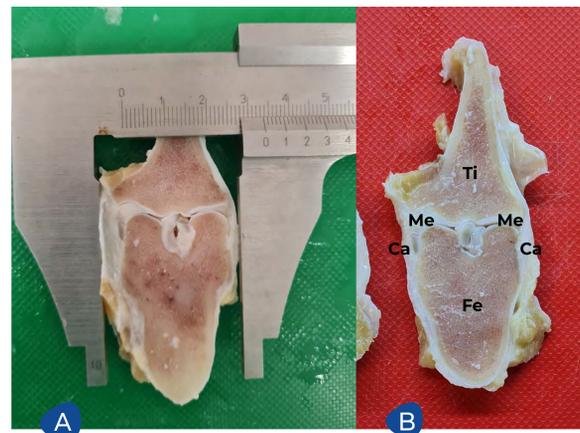
**Matériel :** Scie à eau « Diamond Slitting Saw » - Material Science Burnley Limited®

- 1 Dégraisser l'articulation fémoro-tibiale.
- 2 Retirer le péroné et les muscles.
- 3 A l'aide d'un scalpel, enlever la rotule pour localiser les têtes du fémur et tibia.
- 4 Couper l'articulation à une épaisseur de 8 mm avec une scie à eau (plan frontal) et placer les coupes en cassettes.
- 5 Disposer les cassettes dans une solution de Kristenson pendant 6 jours (un test à l'aiguille sera effectué à J4 et J6 pour vérifier la décalcification).
- 6 Couper le tibia le plus court possible pour avoir le plus de surface de fémur possible sur la lame avec plaque de croissance et métaphyse.
- 7 Laver abondamment la coupe et lancer la déshydratation pour l'inclusion en paraffine.
- 8 Couper au microtome à 4 µm.
- 9 Colorer au Bleu de Toluidine et Safranin O Fast Green.



**Figure 1 :** Axe de coupe (A) et coupe avec une scie à eau (B) de l'articulation fémoro-tibiale d'un chien.

Ti	Tibia
Fe	Fémur



**Figure 2 :** Vue macroscopique d'une coupe frontale de l'articulation fémoro-tibiale de chien illustrant la taille (A) et les régions évaluées (B).

Ca	Capsule
Fe	Fémur
Me	Ménisque
Ti	Tibia

## Résultats

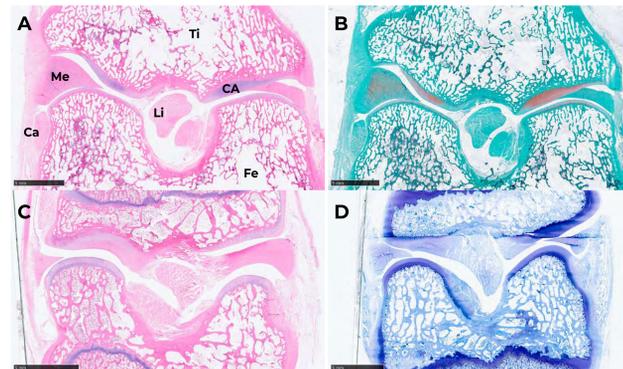
A la recoupe, le temps de préparation d'une coupe frontale est 30% plus long qu'une coupe sagittale. Néanmoins, les sections générées étant plus fines, les temps de décalcification sont réduits de 40%.

La méthode de recoupe décrite permet de visualiser les structures suivantes :

- les surfaces articulaires du fémur et du tibia (i.e. cartilage hyalin),
- la membrane synoviale,
- les ligaments intra-articulaires,
- les ménisques,
- la cavité articulaire,
- la capsule fibreuse,
- l'épiphyse,
- la plaque de croissance (en fonction de l'âge de l'animal),
- la métaphyse du fémur.

Chez le chien, la capsule fibreuse est présente souvent de façon partielle sur un côté à cause de la taille de l'articulation.

La section additionnelle longitudinale de la partie adjacente du fémur permet l'évaluation de l'os cortical de la diaphyse.



**Figure 3 :** Photomicrographies d'une coupe frontale de l'articulation fémoro-tibiale colorée par les colorations Hématoxyline-Eosine et Safranin O Fast Green chez le chien (A-B) et Hématoxyline-Eosine et Bleu de Toluidine chez le macaque (C-D).

Ca	Capsule
CA	Cartilage Articulaires
Fe	Fémur
Li	Ligament
Me	Ménisque
Ti	Tibia

## Discussion

La coupe frontale illustrée dans ce poster permet de mieux visualiser l'articulation, tout en évitant l'usage de méga-blocs et méga-lames qui alourdissent le processus technique. La seule limite a été rencontrée chez le chien à cause de la taille de l'articulation, avec capsule ou ménisques parfois partiellement absents. Chez les chiens plus âgés (dans une étude de toxicologie de 6 ou 9 mois par exemple), la réalisation de deux blocs après une deuxième coupe médiale (non évaluée dans le cadre de ce poster) pourrait s'avérer nécessaire.

Bien qu'il soit recommandé que les études de toxicité par voie intra-articulaire portent sur des animaux dont la plaque de croissance est fermée pour être plus représentatif de la clinique, il est rare que la plaque soit complètement fermée pour les chiens inclus dans les études sub-chroniques de toxicité réglementaire (Yamasaki, 1995). Dans cette espèce, en coupant au plus court la portion du tibia, et en incluant le plus possible de fémur, la plaque de croissance est visible sur la section.

Les animaux d'une étude ayant le même âge, la taille des os est similaire. Nous recommandons, pour avoir une symétrie d'axe de recoupe, de réaliser un nombre défini de coupes à la scie (à épaisseur identique) et de toujours prendre la même section pour mise en bloc.

## Références

Bendele AM. Animal models of osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001;1(4):363-376.

Bolon B, Stolina M, King C, et al. Rodent preclinical models for developing novel antiarthritic molecules: comparative biology and preferred methods for evaluating efficacy. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:569068. doi:10.1155/2011/569068

Emami A, Tepper J, Short B, et al. Toxicology Evaluation of Drugs Administered via Uncommon Routes: Intranasal, Intraocular, Intrathecal/Intraspinal, and Intra-Articular. *Int J Toxicol.* 2018;37(1):4-27 doi:10.1177/1091581817741840

Fossey S, Vahle J, Long P, et al. Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Rat and Mouse Skeletal Tissues (Bones, Joints, and Teeth). *J Toxicol Pathol.* 2016;29(3 Suppl):495-1035. doi:10.1293/tox.29.3S-2

Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, Aigner T. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18 Suppl 3:S113-S116. doi:10.1016/j.joca.2010.05.026

Yamasaki K. Histologic study of the femoral growth plate in beagle dogs. *Toxicol Pathol.* 1995;23(5):612-616. doi:10.1177/019262339502300507

Woicke J, Al-Haddawi MM, Bienvenu JG, et al. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND): Nonproliferative and Proliferative Lesions of the Dog. *Toxicol Pathol.* 2021;49(1):5-109. doi:10.1177/0192623320968181

## Conclusion

La technique de coupe frontale de l'articulation fémoro-tibiale mise au point chez les non-rongeurs permet de visualiser l'ensemble des structures nécessaires à l'évaluation histopathologique de l'articulation fémoro-tibiale mais aussi du fémur (Woicke et al., 2021).

D'un point de vue opérationnel, la technique de recoupe à la scie à eau nécessite une grande précision et attention/vigilance de la part du technicien. Elle permet cependant de diminuer significativement le temps de décalcification,

d'augmenter la qualité de la décalcification et d'améliorer la qualité globale de la coupe. La coupe frontale est donc une vraie alternative à la coupe sagittale applicable à un laboratoire soumis à des obligations de productivité.

Cette technique peut être étendue à des études de toxicologie par d'autres voies qu'intra-articulaire dans le cas où l'articulation est un organe cible potentiel ou avéré.