

REVUE FRANÇAISE

HISTO

REVUE DE
TECHNOLOGIE



ÉVALUATION DE TROIS SUBSTITUTS DU FORMOL SUR LA FIXATION DES TISSUS BIOLOGIQUES D'ANIMAUX

*Lydie GUIGAND^{1,2}, Mireille LEDEVIN^{1,2}, Bernard FERNANDEZ^{1,2},
Julie MASSONNEAU^{1,2}, Yan CHEREL^{1,2}, Thibaut LARCHER^{1,2}
*lydie.guigand@oniris-nantes.fr

- 1) INRA, UMR 703 Ecole Nationale Vétérinaire Agro-Alimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique
2) LUNAM, UMR 703 Ecole Nationale Vétérinaire Agro-Alimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique

Oniris - La Chantrerie, BP 40706 - 44307 Nantes Cedex3

RESUME

Le formaldéhyde, fixateur des tissus biologiques, a été classé « cancérogène de groupe I » par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). La réglementation française impose donc sa substitution, sous condition que cela soit techniquement possible. Nous avons évalué la possibilité de substituer le formol dans les laboratoires d'anatomie pathologique, en prenant compte des contraintes liées à une pratique vétérinaire, domaine d'exercice où les protections sont particulièrement peu répandues.

Trois substituts aux compositions représentatives des différentes solutions sur le marché (acide acétique, glyoxal, mélange glyoxal/acide acétique) ont été testés, en comparaison au formol, sur un panel de dix tissus biologiques d'animaux. L'influence de la taille de l'échantillon et de la durée de fixation a aussi été envisagée.

La qualité du prélèvement a été évaluée en aveugle, au moment de la recoupe des échantillons, de la coupe au microtome et de l'observation microscopique après coloration topographique de routine et de trois colorations spéciales.

Tous les substituts utilisés possèdent des qualités de fixation suffisantes pour une observation histologique et permettent de poser un diagnostic de routine, après coloration Hémalum-Eosine-Safran (HES). Le substitut à base de glyoxal permet d'obtenir des préparations histologiques comparables à celles observées avec le formol, assurant même une meilleure qualité de fixation sur certains tissus réputés difficiles. Les essais d'immunomarquages ont révélé un signal interprétable pour trois anticorps, sur un panel de cinq utilisés en routine. Aucun substitut de fixation ne permet d'utiliser tous les anticorps testés sans une adaptation technique préalable.

Chaque laboratoire devra donc évaluer la possibilité de substituer le formol en fonction des techniques qu'il utilise couramment.

Mots clés : Fixation ; substitut ; formol ; histologie ; immunohistochimie.

INTRODUCTION

Depuis son introduction par Ferdinand Blum en 1893 (1), le formol est universellement devenu le fixateur de référence, nécessaire à la préservation des tissus pour une observation microscopique ultérieure. C'est ainsi, à partir de prélèvements fixés par le formol qu'ont été décrites les structures histologiques normales et leurs altérations lésionnelles, ces descriptions servant de support au diagnostic et au pronostic en pathologie humaine et animale. L'usage du formol exige le respect d'un protocole strict d'utilisation, afin d'assurer des résultats optimaux. Les échantillons, d'une épaisseur maximale de 1 cm, doivent être plongés dans une quantité de fixateur équivalente à 10 fois le volume de la pièce. Le temps de fixation varie de 2 heures (biopsies) à 24 heures, voire 48 heures pour les pièces les plus volumineuses. Dans ces conditions, le formol est un fixateur qui a pour avantages d'une part, de permettre la conservation des tissus à long terme, et d'autre part, d'être compatible avec les colorations histologiques de routine, ainsi qu'avec les techniques d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ*. Commercialisé sous forme de solutions aqueuses contenant 40% en poids de formaldéhyde, il est relativement économique et son conditionnement en solutions prêtes à l'emploi rend, depuis quelques années, son utilisation plus aisée.

D'un point de vue chimique, le formaldéhyde (HCHO) est un aldéhyde qui se pré-

sente, à température ambiante, sous forme d'un gaz incolore, fortement irritant. Soluble dans l'eau et certains solvants organiques, il est plus connu en solution aqueuse, sous le nom de formol (2).

Le formaldéhyde est largement utilisé dans l'industrie en tant que conservateur (produits cosmétiques...), agent anti-microbien (produits ménagers...) et entre dans la composition de certains produits (résines, colles, peintures...). Cette large utilisation est à l'origine d'une forte exposition des personnes, tant dans le cadre professionnel que domestique. Le formaldéhyde pénètre dans l'organisme par voie pulmonaire, digestive et percutanée et est à l'origine d'irritations (2). Une gêne oculaire et respiratoire est perceptible par la majorité des individus, dès que les concentrations dans l'air atteignent 1 à 3 parties par million (ppm). Le formaldéhyde est également allergisant : une exposition chronique pouvant entraîner une sensibilisation cutanée (eczéma, urticaire) et respiratoire (rhinite, asthme) (4). Des enquêtes épidémiologiques récentes rapportent l'importance des risques professionnels liés à l'inhalation de formaldéhyde, et place le secteur de la santé, et tout particulièrement celui de l'anatomie pathologique, comme étant à haut risque (10). Ces enquêtes soulignent également que des expositions répétées à long terme à des pics de formaldéhyde, peuvent conduire à un risque de cancer naso-pharyngé (10, 13). Il favoriserait également l'apparition de leucémies (3).

Devant ces risques démontrés ou supposés, le formaldéhyde fait l'objet de mesures préventives. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a classé, en juin 2004, le formaldéhyde dans la catégorie des agents chimiques cancérigènes du groupe I (3). En Europe, le for-

malaldéhyde est classé cancérigène de catégorie 3 (effets cancérigènes possibles, preuves insuffisantes). À ce titre, les préparations contenant du formaldéhyde en concentration supérieure ou égale à 1% sont soumises à un étiquetage particulier (phrase de risque R40) (3). Dans le cadre d'une exposition professionnelle, la Valeur Limite d'Exposition Professionnelle (VLEP) au formaldéhyde est fixée à 0,5 ppm (sur 8 heures) en France, en Suède et aux États-Unis, à 0,3 ppm au Canada et en Allemagne, et à 2 ppm au Québec (3, 5). En raison du classement du formaldéhyde dans le groupe I du CIRC, mais aussi du nombre important de travailleurs potentiellement exposés au formaldéhyde et, dans l'attente d'une révision de sa classification européenne, les autorités françaises ont décidé de soumettre les travaux à l'origine d'une exposition au formaldéhyde, aux règles particulières de prévention des risques d'exposition aux agents cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction de catégorie **1 ou 2** à compter du 1^{er} janvier 2007 (6). Cette réglementation s'applique aux laboratoires d'histopathologie et impose, dans un premier temps, la substitution du formol si la mesure est techniquement possible (7).

En histotechnologie, certaines étapes sont à l'origine d'une exposition quotidienne au formol : préparation et aliquotage des solutions de formaldéhyde, macroscopie et mise en cassette des prélèvements. D'autres étapes sont à l'origine d'une exposition régulière : élimination des échantillons et du formol usagé. Depuis plusieurs années, le risque associé à la manipulation du formol a incité les histopathologistes à prendre des mesures de protection collective (hotte à aspiration basse ou frontale, ventilation de la pièce, armoire de stockage ventilée) et individuelle (protection oculaire, gants et

masque respiratoire, formation sur les risques, contrôle par dosages aériens). Cependant, l'étape de fixation des échantillons sur les sites de prélèvement (salle d'autopsie ou bloc opératoire) est, dans la majeure partie des cas, effectuée sans protection particulière avant l'acheminement des échantillons vers le laboratoire d'histopathologie.

Pour limiter cette exposition, un certain nombre de substituts sont maintenant disponibles sur le marché français. Il s'agit essentiellement de fixateurs alcooliques, soit sans aldéhyde contenant ou non de l'acide acétique (Finefix, RCL2, Hydrosalfe), soit à base d'un aldéhyde, le glyoxal en quantité supérieure à 10% (Excell plus), ou à base de glyoxal et d'acide acétique (Glyofixx, Histofix). À noter que ces substituts sont tous inflammables, plus ou moins irritants et que, seule la VLEP, est connue pour le glyoxal, (publiée aux USA : inférieure à 1ppm) (12). La généralisation de l'utilisation des substituts nécessite une évaluation préalable spécifique de leurs caractéristiques. Selon l'Association Française d'Assurance de Qualité en Anatomie et Cytologie Pathologique (AFAQAP), les caractéristiques d'un substitut peuvent se résumer comme suit : *« conservation des caractéristiques morphologiques et antigéniques des tissus, résultats reproductibles, stabilité des caractéristiques tissulaires pendant plus de 10 ans, potentiel biocide équivalent à celui du formol, risque chimique faible ou nul pour les utilisateurs, compatibilité avec le fonctionnement des automates d'inclusion conventionnels »*. Les premières études comparatives des qualités de fixation des substituts du formol en anatomo-cyto-pathologie, ont d'abord confirmé la supériorité du formol sur les autres fixateurs en terme de qualité de fixation des tissus (en particulier des

tumeurs) (8, 9). Les fixateurs à base de glyoxal ont toutefois été identifiés parmi d'autres, comme possédant des qualités de fixation les plus proches de celles du formol. Un certain nombre de questions se sont toutefois posées : difficultés d'adaptation des techniques à un fixateur de substitution, difficultés de transposition des données histologiques disponibles dans les publications scientifiques et les banques de données industrielles utilisant toutes le formol (8). Aucune étude ne s'est intéressée au contexte vétérinaire, qui se caractérise pourtant par un certain nombre de particularités : les pièces anatomiques sont prélevées sans protection particulière par rapport à l'exposition au formol, elles sont parfois volumineuses (exérèse tumorale tardive) et placées dans des volumes de fixateur relativement faibles (taille standardisée des flacons à prélèvement).

Pour ces raisons, nous avons comparé, dans un contexte vétérinaire, les propriétés de fixations sur des tissus animaux de trois substituts, par rapport à celles du formol, afin d'identifier celui garantissant une qualité diagnostique la plus proche de celle du

formol. Notre sélection de substituts intègre des fixateurs de composition différente reflétant le spectre actuel de produits disponibles (glyoxal ou acide acétique). L'évaluation des substituts s'est faite sur la base des caractéristiques des prélèvements lors des étapes de macroscopie, de microtomie, de coloration (HES et colorations spécifiques) et d'immunomarquage.

MATERIELS ET METHODES

Animaux et prélèvements

Les échantillons (Tableau 1) ont été prélevés sur l'encéphale, les muscles fessiers, la peau, les nœuds lymphatiques, le foie, l'estomac, l'intestin grêle et les côtes d'un bovin femelle adulte, sur les testicules d'un chien mâle adulte et sur une tumeur mammaire d'une chienne femelle adulte, tous trois autopsiés à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes-Atlantique.

Deux tailles d'échantillons ont été réalisées, (i) une taille « **idéale** » correspondant à un cube de 1cm de côté, ce qui cor-

TAILLE DES PRÉLÈVEMENTS			
Organes	« Idéale »	« Grossière »	Conditions de fixation
Encéphale	1 x 1 x 1 cm	5 x 5 x 5 cm	Courte, mixte, longue
Muscle	1 x 1 x 1 cm	Non réalisé	Courte, mixte, longue
Peau	1 x 1 cm	Non réalisé	Courte, mixte, longue
Nœud lymphatique	1 x 1 x 1 cm	5 x 5 x 5 cm	Courte, mixte, longue
Intestin	1 x 1 x 1 cm	Non réalisé	Courte, mixte, longue
Estomac	1 x 1 x 1 cm	Non réalisé	Courte, mixte, longue
Foie	1 x 1 x 1 cm	5 x 5 x 5 cm	Courte, mixte, longue
Os	1 x 1 x 1 cm	5 x 5 x 5 cm	Courte, mixte
Testicule	1 x 1 x 1 cm	Non réalisé	Courte, mixte, longue
Tumeur mammaire	Non réalisé	5 x 5 x 5 cm	Courte, mixte, longue

Tableau I : Taille des prélèvements et conditions de fixation pour chaque fixateur : Excell plus, RCL2, Histofix et formol 4%

respond aux recommandations d'utilisation pour obtenir des résultats optimaux et (ii) une taille « **grossière** », correspondant à un cube de 5 cm de côté, taille souvent observée dans le contexte vétérinaire, où une grosse pièce est plongée dans un petit volume de fixateur.

Traitement des échantillons

Chaque prélèvement a été immergé immédiatement dans un des quatre fixateurs suivants : « Excell plus » à base de glyoxal (MM France, Microm Microtech, Francheville, France), « RCL2 » à base d'acide acétique (Alphelys, Plaisir, France), « Histofix » à base de glyoxal et d'acide acétique (Panréac, Barcelone, Espagne) et Formol 4% (Panréac, Barcelone, Espagne). L'étude comparative a ensuite été réalisée en aveugle.

Trois conditions de fixation ont été testées (Tableau I) : (1) une fixation dite « **courte** » où les échantillons de taille « idéale » ont été fixés durant 48 heures, fixation prolongée de 24 heures après recoupe pour les échantillons de taille « grossière ». (2) Une fixation dite « **mixte** » où les échantillons ont été fixés durant 48 heures dans le fixateur puis durant 24 heures dans le formol. (3) Une fixation dite « **longue** » où les échantillons ont été fixés pendant deux mois dans le fixateur.

Sans modification des protocoles classiques utilisés en routine dans le laboratoire, les échantillons ont ensuite été déshydratés par immersion successive dans des bains (1h30 chaque) d'éthanol (2x80°-2x95°-3x100°) et de méthycyclohexane (2x) et inclus en paraffine. Les coupes de 4µm ont été colorées avec de l'HES. Des colorations spéciales ont été réalisées sur les échantillons de taille « idéale » : acide périodique

de Schiff, Bleu de Toluidine et Gram respectivement sur le muscle, la peau et intestin grêle. Des marquages immunohistochimiques, ont été réalisés selon les recommandations du fabricant, sur les échantillons de taille « idéale » et « grossière » du muscle, de la peau et de l'intestin grêle respectivement au moyen des anticorps anti-vimentine au 1/1000 (Dako, Trappes, France), anti-cytokératine au 1/500 (Dako), et anti-Ki67 au 1/50 (Dako). Enfin les anticorps anti-CD3 dilué au 1/200 (Dako), et anti-CD79 dilué au 1/50 (Dako), ont été utilisés sur les échantillons de nœud lymphatique.

Évaluation de la qualité de fixation

La qualité des prélèvements a été évaluée selon les critères suivants. Trois critères ont été retenus à la recoupe : dureté, couleur, odeur ; sept à la coupe : rétraction, dureté, effritement, faisabilité d'un ruban de coupe, absence de plis, étalement au bain-marie, séchage des coupes et quatre à l'observation microscopique, après coloration de routine à l'HES : homogénéité de la coloration, présence de plis, respect des structures histologiques, finesse des détails cellulaires et nucléaires. Pour les colorations spéciales nous nous sommes attachés à ces deux critères : homogénéité de la coloration, finesse des détails cellulaires et nucléaires et pour les immunomarquages à ces quatre critères : intensité de bruit de fond, présence de marquage non spécifique, intensité du marquage spécifique, finesse des détails. Chaque critère a fait l'objet d'une notation allant de 1 à 3 : 1 correspondant à une qualité insuffisante, 2 acceptable et 3 optimale.

Les résultats ont fait l'objet d'une analyse statistique au moyen du logiciel StatView (SAS Institute, Cary, USA).

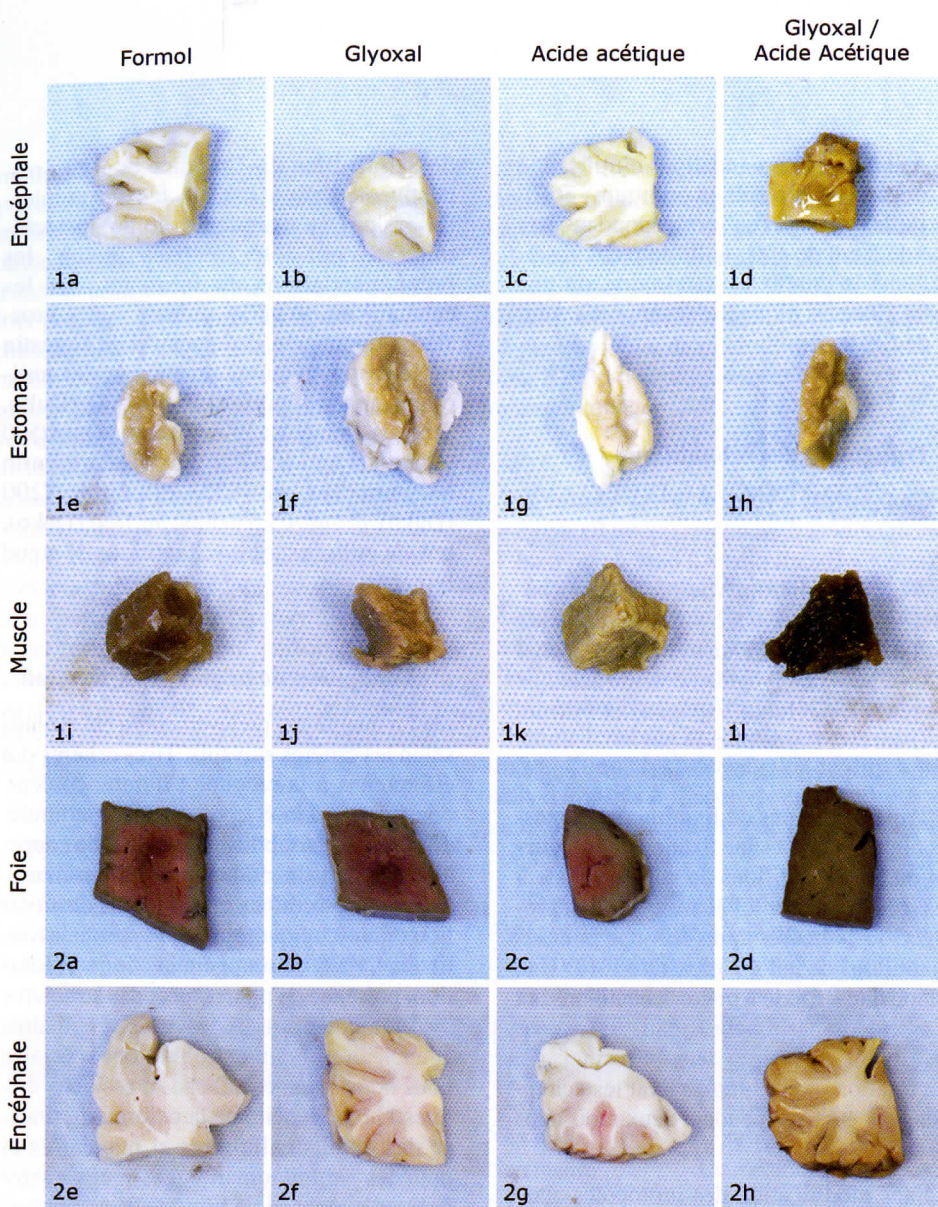


PLANCHE I

Figures 1. Cliché macroscopique d'échantillons de taille dite « idéale » (cube de 1cm de côté) d'encéphale, d'estomac et de muscle. (a, e, i) fixation dans le formol, (b, f, j) fixation dans le glyoxal, (c, g, k) fixation dans l'acide acétique, (d, h, l) fixation dans un mélange glyoxal/acide acétique

Figures 2. Cliché macroscopique d'échantillons de taille dite « grossière » (cube de 5cm de côté) de foie et d'encéphale après recoupe. (a, e) fixation dans le formol, (b, f) fixation dans le glyoxal, (c, g) fixation dans l'acide acétique, (d, h) fixation dans un mélange glyoxal/acide acétique

RESULTATS

Modifications de l'aspect morphologique habituel

A l'examen macroscopique, des différences d'aspect sont relevées selon le fixateur utilisé. Les prélèvements fixés dans le formol sont fermes et possèdent une couleur grise, bien connue des pathologistes. Le contraste entre les différents composantes tissulaires, comme la substance grise et la substance blanche du système nerveux central (Figure 1a), est important. Les tissus fixés dans le mélange glyoxal/acide acétique possèdent une consistance caoutchouteuse pouvant gêner en partie la recoupe des échantillons et sont d'une couleur brune masquant le plus souvent le contraste entre les composantes tissulaires (Figures 1d, 1h, 1i). Les tissus fixés dans le glyoxal sont fermes. Certains tissus (muscle, foie), sont particulièrement pâles (Figure 1j), par rapport à une fixation avec du formol (Figure 1i). Le contraste entre les composantes tissulaires est peu marqué (Figure 1b). Une pâleur extrême associée à un manque total de contrastes des tissus biologiques fixés dans l'acide acétique sont remarqués, en particulier concernant les prélèvements d'intestin, d'estomac (Figure 1g), de testicule, de muscle (Figure 1k) et de foie. La présence de nombreux cristaux regroupés en amas de 0,5 à 5 mm à la surface de la plupart des organes, n'interfère pas significativement avec la recoupe. Les tissus sont fermes.

Concernant la pénétration tissulaire des fixateurs, on note dans un tissu au parenchyme dense comme le foie, une couleur rouge, au centre des échantillons de grande taille, signe d'une fixation incomplète avec le formol (Figure 2a), le glyoxal (Figure 2b) et l'acide acétique seul (Figure 2c). Ce même constat est posé sur les échantillons d'en-

céphale, fixés avec l'acide acétique (Figure 2g) ou avec le glyoxal (Figure 2f). Le mélange glyoxal/acide acétique est le fixateur qui pénètre le mieux au sein du tissu (Figure 2h).

A l'examen microscopique optique, avec tous les fixateurs testés et quelle que soit la taille initiale du prélèvement, la qualité des prélèvements permet une observation compatible avec une analyse histologique de type diagnostique. La préservation des structures tissulaires est globalement bonne à l'exception du tissu musculaire pour lequel, des artefacts de dissociation de fibres, voire de micro déchirures sont relevés suite à la fixation avec le formol et le mélange glyoxal/acide acétique et dans une moindre mesure avec le glyoxal seul et l'acide acétique.

Les intensités de colorations cytoplasmique et nucléaire varient fortement selon le fixateur utilisé. Avec les prélèvements fixés au formol, la coloration HES (Figure 3a) permet d'observer le cytoplasme cellulaire et les détails chromatinien nucléaires. En comparaison, la fixation glyoxal/acide acétique (Figure 3d) est à l'origine d'une hypoéosinophilie cytoplasmique légère, sans altération de l'aspect des noyaux. On note également une hypocolorabilité marquée des hématies rendant difficile leur observation. L'acide acétique seul est à l'origine d'une hyperéosinophilie très marquée, qui compromet en grande partie la coloration différentielle du collagène par le safran (Figure 3c). Les détails chromatinien nucléaires manquent de finesse. Enfin, les prélèvements fixés au glyoxal (Figure 3b) sont légèrement hypercolorables par rapport à ceux fixés au formol et présentent une très grande finesse des détails cytoplasmiques et nucléaires.

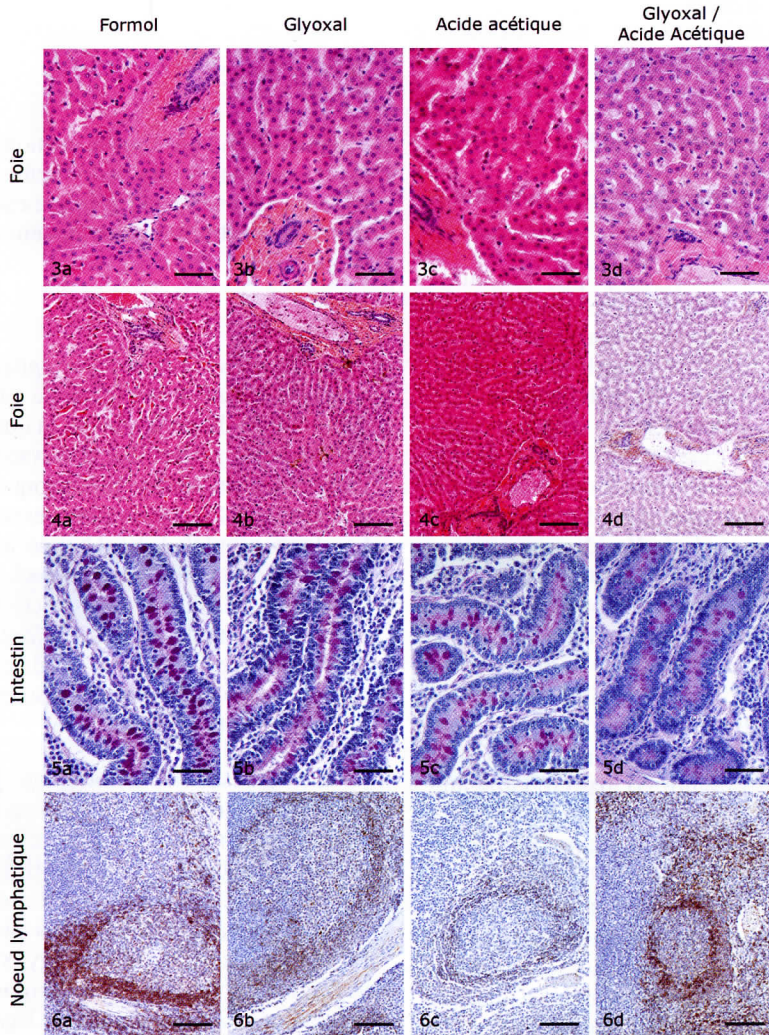


PLANCHE II

Figures 3. Cliché microscopique d'échantillons de foie de bovin ayant été fixés 48 heures dans (a) formol, (b) glyoxal, (c) acide acétique, (d) mélange glyoxal/acide acétique. Coloration Hémalum Eosine Safran

Figures 4. Cliché microscopique d'échantillons de foie de bovin ayant été fixés 2 mois dans (a) formol, (b) glyoxal, (c) acide acétique, (d) mélange glyoxal/acide acétique. Coloration Hémalum Eosine Safran

Figures 5. Cliché microscopique d'échantillons d'intestin de bovin ayant été 48 heures dans (a) formol, (b) glyoxal, (c) acide acétique, (d) mélange glyoxal/acide acétique. Coloration Acide Périodique Schiff

Figures 6. Cliché microscopique d'échantillons de nœud lymphatique de bovin après fixation dans (a) formol, (b) glyoxal, (c) acide acétique, (d) mélange glyoxal/acide acétique. Immunomarquage du CD79 et révélation Diaminobenzidine

Des colorations spéciales ont également été réalisées sur l'ensemble des échantillons. On n'observe pas de différence, quel que soit le fixateur utilisé après coloration de Gram sur coupes d'intestins. Une coloration au bleu de Toluidine, sur échantillons de peau permet l'identification des mastocytes dans tous les cas, avec cependant une intensité de coloration supérieure des granulations cytoplasmiques pour la fixation au formol. La coloration à l'acide priodique de Schiff sur coupes d'intestin permet l'observation des cellules sécrétrices de mucus, quel que soit le fixateur utilisé (Figures 5a, 5b, 5c, 5d), l'intensité de coloration étant supérieure avec le formol (Figure 5a) et le glyoxal (Figure 5b). On note que les contours des granules de sécrétion cytoplasmiques de mucus ne sont visibles qu'après fixation au formol.

Influence du fixateur sur les immunomarquages

Sur un panel de cinq anticorps classiquement utilisés en routine sur des prélèvements fixés au formol, et sur la base des modes opératoires utilisés au laboratoire, aucun des trois substituts testés ne permet un marquage satisfaisant avec l'ensemble des anticorps choisis (Tableau II). En l'absence de mise au point spécifique, seuls les marquages de la vimentine et du CD3 sont satis-

faisants avec les quatre fixateurs. L'immunomarquage du CD79 (Figures 6a, 6b, 6c, 6d) est d'intensité similaire sur les tissus fixés avec du formol et ceux fixés avec le mélange glyoxal/acide acétique. On note cependant la présence d'un marquage non spécifique faible des travées collagéniques avec ce dernier fixateur. L'immunomarquage du Ki67 sur coupes intestinales n'est interprétable que sur les tissus fixés avec du formol, en raison d'un marquage faible et hétérogène sur les prélèvements fixés avec l'un des trois substituts. L'immunomarquage de la cytokératine sur coupe de peau est satisfaisant sur les prélèvements fixés avec du formol, de l'acide acétique ou du glyoxal. Le marquage est presque totalement absent sur les coupes fixées dans le mélange glyoxal/acide acétique. Pour tous les immunomarquages, la contre coloration à l'Hématoxyline de Gill des noyaux est moins intense sur les tissus fixés avec l'un des trois substituts par rapport à celle obtenue sur les tissus fixés avec le formol.

Influence des conditions de fixation

Le transfert des prélèvements dans du formol après 48 heures de fixation dans un des substituts (fixation dite « mixte »), ne modifie pas la qualité des coupes colorées obtenues. L'impact de la fixation dite «longue» n'est pas uniforme pour les quatre

	formol	glyoxal	acide acétique	glyoxal/ acide acétique
CD3	+	+	+	+
CD79	+	+/-	+/-	+
Ki67	+	-	+/-	+/-
Cytokératine	+	+	+	+/-
Vimentine	+	+	+	+

Tableau II : Evaluation de la qualité de 5 immunomarquages courants selon le fixateur utilisé

fixateurs : un allongement de la durée de fixation avec le formol améliore l'intensité de coloration et le contraste des coupes colorées à l'HES (Figure 4a). Une fixation longue dans le glyoxal (Figure 4b), augmente légèrement l'intensité de coloration de l'hémalum. Au contraire, l'augmentation de la durée de fixation avec le mélange glyoxal/acide acétique (Figure 4d) est à l'origine d'une hypocolorabilité générale. Enfin, on note un renforcement de l'hypercolorabilité des tissus fixés à l'acide acétique (Figure 4c) dans le cas d'une fixation prolongée. L'observation histologique est donc compromise dans ces deux derniers cas. En revanche, l'allongement de la durée de fixation ne modifie pas les résultats obtenus avec les colorations spécifiques et avec la plupart des immunomarquages. On note que le marquage du Ki67 disparaît totalement lors d'une fixation longue des prélèvements.

L'observation des lames conservées à l'obscurité pendant trois ans, montre une perte importante de l'intensité de coloration nucléaire et cytoplasmique quel que soit le fixateur utilisé et quelle que soit la coloration choisie, HES ou coloration spéciale. Seule la fixation à l'acide acétique, à l'origine d'une hypercoloration précédemment décrite, permet de conserver des contrastes satisfaisants entre les composantes tissulaires. Pour tous les fixateurs utilisés, une meilleure conservation de la basophilie des noyaux en coloration HES est obtenue pour les prélèvements ayant subi une fixation dite «longue». Enfin, quand ils existent, les marquages immunohistochimiques sont bien conservés dans tous les cas, mais la contre coloration des noyaux subie la même dégradation que celle observée sur les coupes colorées en HES.

L'observation de nouvelles lames, obtenues à partir des mêmes blocs conservés

pendant trois ans, montre une bonne conservation des caractéristiques histologiques et tinctoriales pour les quatre fixateurs, tant pour la coloration HES, que pour la coloration à l'acide périodique de Schiff et les immunomarquages du CD3 et du CD79.

Influence de la taille et de la nature du prélèvement

La taille des prélèvements (taille « idéale » de 1 cm de côté et taille « grossière » de 5 cm de côté), n'influence pas significativement la qualité de la coupe histologique, quel que soit le fixateur considéré.

Les structures histologiques de certains tissus (peau, os, système nerveux central, muscle, testicule) sont réputées difficiles à préserver après fixation au formol. Cette difficulté est retrouvée après une fixation avec l'un des trois substituts. Concernant la peau, après fixation avec le mélange glyoxal/acide acétique ou avec l'acide acétique seul, on note une difficulté particulière à la coupe occasionnant des déchirures du tissu. Dans le cas du système nerveux, à la suite d'une fixation au glyoxal ou à l'acide acétique, les difficultés de coupe constatées rappellent celles d'un tissu « sous fixé », les coupes histologiques obtenues sont de qualité inférieure à celles obtenues à partir de prélèvements fixés dans le formol. L'os se montre difficile à couper après fixation au formol et les coupes histologiques obtenues se caractérisent par un manque de détails cellulaires, en particulier nucléaires par rapport aux autres fixateurs. Comparées aux coupes au microtome de muscle fixé dans du formol, celles de muscle fixé dans de l'acide acétique ou du glyoxal se sont révélées plus aisées, occasionnant moins d'effritements et permettant l'obtention de coupes plus respectueuses des structures histolo-

giques. Concernant les échantillons de testicule, on note des artefacts de dissociation des cellules germinales après la fixation au formol, dissociation moins marquée avec le mélange glyoxal/acide acétique ou avec le glyoxal seul.

DISCUSSION

Ces travaux ont évalué les caractéristiques de la fixation de trois substituts par rapport au fixateur de référence qu'est le formol. Ces travaux se sont attachés à compléter ceux déjà existants, en reproduisant des conditions opératoires souvent rencontrées en histologie vétérinaire (aucune protection, échantillon de grande taille, fixation longue, volume de fixateur faible). L'étude a été réalisée en aveugle sur un large spectre de tissus et sur deux espèces différentes.

Un fixateur doit, avant toute autre caractéristique, permettre l'observation microscopique des tissus dans des conditions compatibles avec l'établissement d'un diagnostic histopathologique. Cette condition est remplie pour les quatre fixateurs de notre étude, même lorsque la taille des prélèvements est excessive. On note pour la coloration HES, que l'intensité des colorations cytoplasmique et nucléaire varie fortement selon le fixateur. Les contrastes et la finesse des détails nucléaires sont optimaux avec le formol et le glyoxal, ce dernier ne permettant cependant pas l'observation des hématies. Des résultats similaires ont été obtenus par une équipe américaine en 2004, montrant également la supériorité du formol lors d'essais comparatifs avec différents substituts. Parmi les substituts utilisés (Glyo-Fixx, STF-Streck, Omnifix, Histochoice, HistoFix), le Glyo-Fixx (à base de glyoxal) donne des résultats similaires au formol pour la mor-

phologie nucléaire et cytoplasmique, mais des adaptations sont jugées nécessaires pour les colorations spéciales (9).

Concernant l'immunohistochimie, nos résultats montrent des différences entre substituts. Pour un même anticorps, les résultats varient selon le substitut testé, aucun d'entre eux ne permet cependant de reproduire l'ensemble des immunomarquages utilisés en routine sur les prélèvements fixés avec du formol. Sur les cinq anticorps testés, chaque substitut est compatible avec trois immunomarquages, différents selon le substitut. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude comparative de substituts réalisée par l'AFAQAP en 2007 (8). Des adaptations techniques (dilution des anticorps, prétraitement) seront nécessaires selon les immunomarquages envisagés. Il sera en tout cas impossible de garantir *a priori*, que la fixation de chaque substitut soit compatible avec la mise en évidence de tous les sites antigéniques, des clones de certains anticorps comme TTF1 et HER2 s'avérant d'ores et déjà réfractaires à l'utilisation de certains substituts (8).

La qualité de fixation avec le formol est souvent jugée médiocre pour certains tissus, comme le muscle, l'os, le testicule, l'architecture de ces tissus apparaissant souvent altérée après la coupe. Ces difficultés ne sont pas systématiquement rencontrées selon le substitut choisi. Ainsi le glyoxal permet d'obtenir des coupes d'excellente qualité à partir de muscle ou d'os, en revanche le formol assure de meilleurs résultats lorsque l'on s'intéresse à des prélèvements cutanés ou de système nerveux central. Si l'on n'a pas pour contrainte d'homogénéiser les pratiques et d'utiliser un même fixateur pour tous les tissus, il est donc envisageable d'utiliser préférentiellement le glyoxal pour les tissus désignés ci-dessus.

Pour préserver l'ensemble de l'architecture d'un tissu, en particulier sur les prélèvements de grande taille, un fixateur doit pouvoir diffuser rapidement dans l'ensemble du prélèvement. Nos essais comparatifs sur des échantillons de grande taille ont mis en évidence une pénétration limitée de tous les fixateurs (y compris le formol) dans un tissu dense comme le foie, et une fixation insuffisante de l'encéphale après fixation dans le glyoxal ou l'acide acétique. La plus forte capacité de pénétration du formol a également été observée par le laboratoire d'Anatomo-Cyto-Pathologie (ACP) du CHU de Nancy (10, 14) qui conclut que le glyoxal ne permet pas de conserver les pièces anatomiques. Outre la préservation de l'architecture, la fixation permet de contraster les structures tissulaires et d'observer macroscopiquement certaines lésions. Le glyoxal s'avère donner des résultats équivalents à ceux du formol, les contrastes obtenus avec les deux autres fixateurs étant par contre incompatibles avec une description lésionnelle macroscopique détaillée, après fixation. L'insuffisance de l'éthanol a aussi été soulignée dans ce domaine par une étude du laboratoire d'Anatomo-Cyto-Pathologie (ACP) de l'Institut Claudius Regaud portant sur 3 fixateurs (formol, glyoxal, éthanol) (10).

Les fixateurs sont aussi utilisés pour la conservation de pièces anatomiques à moyen ou long terme, tout en permettant des analyses histologiques ultérieures. Nous avons ainsi testé la qualité de fixation sur une période de deux mois. Le formol et le glyoxal permettent une bonne conservation des prélèvements et même une amélioration des qualités de la coloration. Par contre, l'hypercolorabilité et l'hypocolorabilité associées respectivement à l'acide acétique et au mélange glyoxal/acide acétique se trou-

vent accentuées, ce qui compromet l'observation microscopique.

Nous avons également évalué l'impact du fixateur sur la conservation des caractéristiques tinctoriales des préparations histologiques à long terme. Après une période de trois ans de conservation, nous avons constaté une perte importante de l'intensité de coloration, similaire pour les quatre fixateurs testés. Des observations internes tendent à montrer que le milieu de montage serait le déterminant principal de cette dégradation.

Enfin, parmi les qualités attendues d'un fixateur, son potentiel biocide conditionne la sécurité de manipulation de prélèvements potentiellement contaminés. Les performances du formol à cet égard sont largement reconnues (2). Nous n'avons pas testé nous-même le potentiel biocide des substituts utilisés dans cette étude en dépit du peu d'informations disponibles. L'étude comparative dans le laboratoire d'ACP du CHU de Nancy a montré une activité biocide restreinte du glyoxal, par observation de filaments mycéliens septés, dans les tissus fixés dans le glyoxal durant une période de quatre semaines (14).

CONCLUSION

Tant que la qualité de fixation des tissus obtenue avec les substituts n'égale pas celle du formol, il n'est pas envisageable de substituer à grande échelle, l'utilisation du formol. En France, l'Institut d'Histopathologie de Nantes a fait le choix de substituer le formol à 90%. L'emploi quotidien d'Excell+, un substitut à base de glyoxal, semble donner des résultats similaires au formol, même si des adaptations ont été nécessaires pour l'immunohistochimie (10). La Facul-

té de Médecine Vétérinaire de l'Université de Montréal utiliserait le « No Tox » (substitut au formol à base de composés dicarboxylés et d'éthanol) avec succès (11). La substitution du formol par des substituts de nature différente selon les laboratoires risque d'augmenter l'hétérogénéité des préparations histologiques entre les sites ce qui est en opposition avec la préoccupation actuelle d'homogénéisation des techniques.

Pour limiter l'exposition des praticiens qui exercent souvent sans protection individuelle, une possibilité alternative à la substitution totale, serait d'utiliser au moment du prélèvement un substitut, ce dernier étant ensuite remplacé par du formol dès réception par la structure d'anatomie pathologique. Cette condition de fixation dite mixte, testée dans cette étude, ne permet pas d'améliorer la qualité de fixation obtenue avec le seul substitut.

La substitution vise avant tout à se protéger des effets toxiques du formol. Cependant, si les risques sanitaires liés à la présence de formol dans les environnements professionnels ont fait l'objet de nombreuses études, il n'en va pas de même de ceux des solutions fixatrices de substitution proposées sur le marché français. Le glyoxal est un dialdéhyde bicarboné proche du formol et est classé mutagène de catégorie 3 par l'Union Européenne (12). Les seules VLEP connues pour ce produit, publiées aux USA, sont inférieures à 1 ppm (12). En dépit d'une

volatilité moindre, cela impose des précautions d'utilisation proches de celles mises en place pour le formol (10). L'Institut d'Histopathologie de Nantes (France), a également décrit des cas d'allergie de contact au glyoxal comparables à celles du formol, après huit mois d'utilisation de ce substitut (deux personnes sur trente) (10). D'autres substituts sont riches en composés alcooliques, fortement inflammables, qui nécessitent des équipements adaptés selon la directive européenne «ATEX» (Atmosphères Explosives) applicable depuis le 1^{er} juillet 2003 sur l'ensemble de la Communauté Européenne (8).

Les essais de substitution lancés, notamment par des laboratoires français d'Anatomie et Cytologie Pathologiques ont été réalisés en l'absence de coordination nationale, et restent sans résultats publiés à ce jour. Pour faire suite à une enquête préliminaire de l'AFAQAP, une étude nationale multicentrique, avec méthodologie stricte, va être mise en place sur un large spectre d'organes et de tissus (10). En attendant les conclusions de cette étude, il convient de systématiser l'utilisation des mesures de protection collective (hotte à aspiration basse ou frontale, ventilation des pièces, armoire de stockage ventilée, contrôle des ambiances de travail) et individuelle (protection oculaire, gants et masque respiratoire) et d'informer l'ensemble du personnel des risques associés à l'utilisation du formol.

BIBLIOGRAPHIE

1. FOX CH., JOHNSON FB., WHITING J., ROLLER PP. : Formaldéhyde fixation. *J Histochem. Cytochem.* 1985, **33**: 845.
2. INRS N°FT7, Aldéhyde formique et solutions aqueuses. 2008, 1-9.
3. INRS N°ND 2247-203-06, Exposition professionnelle au formaldéhyde en France : informations fournies par la base de données COLCHIC. 2006, 19-33.
4. INRS N°84 TR 26, Asthme professionnel dû aux désinfectants employés en milieu hospitalier. 2000, 435-443.
5. IRSST, Guide de prévention le formaldéhyde en milieu de travail. 2006, 1-51.
6. INRS N°ED 5032, Le point des connaissances sur le formaldéhyde. 2007, 1-4.
7. Articles R.231-56 à R.231-56-12 du code du travail.
8. AFAQAP, Formol et substituts - infos de l'AFAQAP sur 1 an. Liste des informations données par l'AFAQAP sur son site www.afaqap.org, 2007.
9. TITFORD ME., HONSTEIN MG. : Histomorphologic Assessment of Formalin Substitute Fixatives for Diagnostic Surgical Pathology. *Arch Pathol. Lab. Med.* 2004, **129** : 502-506.
10. Avis de l'AFSSET, Relatif aux risques sanitaires liés à la présence de formaldéhyde dans les environnements professionnels. 2004, 1-52.
11. IRSST N°RA8-386, Etude et recherche, impacts d'un abaissement de la valeur d'exposition admissible au formaldéhyde. 2004, 21.
12. INRS N°FT 229, Glyoxal et solutions aqueuse. 2005, 1-8.
13. INRS N°ED 835, Maladies professionnelles. Guide d'accès aux tableaux du régime général et du régime agricole de la Sécurité Sociale. 2010, 250-251.
14. MARCON N. : Le glyoxal : un possible substitut du formaldéhyde en anatomie pathologique. Thèse de doctorat en médecine, Université H Poincaré Nancy I. 2008, n° 47.

L'IMPORTANCE DE LA FIXATION EN HISTOCHIMIE

*Lydie VENTEO⁽¹⁾, Emilie VELOT⁽²⁾

* lydie.venteo@igbmc.fr

*(1) Ressources scientifiques, Institut Clinique de la Souris,
1 rue Laurent Fries, 67400 Illkirch*

*(2) Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, UMR 7213 CNRS-UDS,
Faculté de Pharmacie, 67400 Illkirch*

RESUME

Les techniques histologiques ont pour but l'obtention de coupes fines, colorées de matériels biologiques observables au microscope optique. Le matériel biologique à étudier va subir différents traitements avant de pouvoir être analysé au microscope : fixation, déshydratation, imprégnation, inclusion, coupe et coloration. Le résultat final doit refléter au plus juste l'état natif du prélèvement. Le tissu biologique doit donc être conservé dans un état aussi proche que possible de l'état vivant, tout en le rendant impu-trescible. Cette étape de conservation est assurée par des agents fixateurs. Un fixateur modifie les tissus en stabilisant notamment les protéines et les rend ainsi résistants à tout changement.

JR. BAKER (1) utilisait souvent cet exemple pour expliquer la fixation : quand une porte est ouverte, sa position peut être changée facilement mais si la porte est ouverte et fixée au sol, cela modifie un peu la porte, de sorte qu'elle est stabilisée et résistante au changement.

FONCTIONS DES FIXATEURS

Les fixateurs agissent sur les tissus biologiques aussi bien physiquement que chimiquement. Les principales modifications physiques sont la rétraction ou le gonflement des tissus biologiques. La majorité des fixateurs utilisés en histologie correspond à des mélanges d'agents fixateurs qui vont permettre un équilibre entre ces deux effets. Les étapes ultérieures de traitements des tissus biologiques vont également avoir une action sur ces tissus. Notamment lors de la préparation des échantillons pour une inclusion en paraffine : la déshydratation, la clarification et l'imprégnation des tissus par la paraffine provoquent une rétraction et un durcissement tissulaire.

Le volume final d'un échantillon fixé et inclus en paraffine correspond à 60-70% de son volume initial. La rétraction et le gonflement des tissus biologiques ne sont pas obligatoirement délétères mais doivent être pris en compte lors d'études d'histomorphométrie.

Une des fonctions majeures des fixateurs est de stabiliser les tissus afin de prévenir leur dégradation par putréfaction ou autolyse. La putréfaction due à la dégradation des tissus par les bactéries, peut être limitée dans la plupart des cas en travaillant de façon stérile. L'autolyse correspond à une dégradation enzymatique, même après l'arrêt de la circulation sanguine, des cellules et de ses constituants. Seul un procédé physique (cryocongélation) ou chimique (fixateurs) arrête l'action de ces enzymes. L'autolyse devient alors un problème capital, notamment si les tissus biologiques ne sont pas fixés rapidement. Une autolyse sévère va jusqu'à provoquer des artéfacts de coloration.

Une autre fonction des fixateurs est de maintenir en place toutes les structures histologiques entre elles. Cette stabilisation est très importante pour les différentes étapes de traitement du tissu biologique afin de limiter la distorsion des différents éléments tissulaires. De plus, la coloration est également augmentée, sublimée par la fixation. De façon générale, des tissus non fixés seront plus faiblement colorés que des tissus fixés.

Il existe différentes catégories d'agents fixateurs

Les fixateurs coagulants (également appelés dénaturants ou précipitants) vont provoquer une dénaturation irréversible des protéines. Il s'agit d'une action brutale avec des altérations des protéines globulaires qui s'agencent pour former une trame fibreuse. Une rupture de certaines liaisons protéiques et une apparition de groupements thiols (R-SH). (éthanol, acétone, méthanol, acide picrique...) peuvent se produire.

Les fixateurs non coagulants vont donner lieu à une combinaison chimique avec

les protéines, à l'établissement de liaisons nouvelles entre protéines et à une solidification de la trame protéique de la cellule. Il n'y a pas de modification structurale de la cellule. Ces fixateurs sont également appelés additifs. (aldéhyde : formaldéhyde, glyoxal, glutaraldéhyde...)

Les facteurs influençant la fixation

- La vitesse de pénétration de l'agent fixant dans le tissu biologique est propre à chaque agent fixateur. En pénétrant dans le tissu, le fixateur va agir sur les cellules en provoquant des artéfacts tels un gonflement, une rétraction ou un durcissement des éléments tissulaires. Le taux de pénétration du fixateur à l'intérieur du tissu biologique peut-être mesuré et exprimé généralement en mm de pénétration par heure. Il est facile de mesurer un objet avant et après fixation pour en déduire le degré de rétraction ou de gonflement. Cependant les chiffres ainsi obtenus ne sont valables que pour un tissu bien défini. La vitesse de pénétration d'un même agent fixateur peut varier du simple au triple suivant selon le tissu biologique (foie, rate, rein ou cerveau). La même remarque est valable pour la rétraction et le gonflement. La vitesse de pénétration est influencée par la chaleur mais pas par la concentration de l'agent fixateur. (Tableau I)

- La vitesse de réaction de fixation est un paramètre qui diffère de la vitesse de pénétration. La vitesse de réaction est plus difficile à déterminer puisque la réaction de fixation n'a pas lieu nécessairement dès que le tissu entre en contact avec l'agent fixateur.

De façon générale, les fixateurs dénaturants (ou coagulants) fixent les pièces aussi rapidement qu'ils les pénètrent. Concernant les fixateurs additifs, la fixation est progressive avec un temps de fixation des

échantillons plus long est nécessaire à l'établissement de liaisons entre protéines.

- Le volume du liquide fixateur est un paramètre important : la quantité de fixateur correspond au minimum à 10 x le volume de la pièce. Il est nécessaire d'utiliser des récipients adaptés au volume de la pièce à fixer. Il est important de noter qu'à volume égal, une pièce avec une surface importante et une épaisseur réduite sera fixée plus rapidement qu'une pièce de forme cubique. Il est nécessaire de recouper les échantillons à des épaisseurs de 0,5 cm maximum pour favoriser la fixation lorsque cela est possible. Le temps de fixation des échantillons va dépendre de l'épaisseur des pièces mais également du type de fixateur utilisé (dénaturant ou additif).

- La consistance propre aux tissus est directement impliquée dans la fixation: plus un tissu est dense, plus il est difficile à l'agent fixateur de pénétrer. Un tissu dense (prostate, utérus...) est plus susceptible de durcir de façon excessive. Des difficultés à la coupe de ces tissus sont fréquentes.

- Le pH des solutions de fixation varie en fonction des mélanges d'agents fixateurs

utilisés. La majorité des fixateurs ont un pH acide. (Tableau II)

Caractéristiques de quelques fixateurs : (2, 3, 4, 5, 6 et 7) et (Tableau III)

Le formaldéhyde : (monoaldéhyde CH₂O ou méthanal).

Le formol est le nom commercial de la solution contenant comme agent fixateur le formaldéhyde. La solution pure de formol contient entre 37-40% de formaldéhyde dissout dans l'eau. Le formaldéhyde est soluble dans l'eau sous forme de petits polymères (n= 2 à 8). Certaines solutions de formol contiennent également du méthanol (entre 10 à 14%) afin de limiter la polymérisation du formaldéhyde.

Le formaldéhyde peut s'oxyder en acide formique lors d'un stockage prolongé des solutions et a un effet délétère sur les tissus. L'utilisation de solutions tamponnées de formaldéhyde permet de limiter la formation de cet acide formique mais ne l'inhibe pas.

La concentration classique de formaldéhyde utilisée pour la fixation d'un tissu

Agents fixateurs	Vitesse de pénétration	Effets sur les tissus
Acide acétique	1,2 mm/heure	Gonflement suivi d'une très forte rétraction. Les pièces ne durcissent pas.
Éthanol	1 mm/heure	Très forte rétraction des tissus. Durcissement des pièces.
Formaldéhyde	0,8 à 1 mm/heure	Gonflement léger suivi d'une forte rétraction. Durcissement des tissus.
Acétone	+ lente que l'éthanol	Rétraction des tissus. Durcissement des pièces.
Méthanol	? + lente que l'éthanol	Rétraction des tissus. Durcissement des pièces.
Acide picrique	0,3 à 0,5 mm/heure	Rétraction très forte (= éthanol), mais ne durcit pas les tissus.

Tableau I : vitesse de pénétration et effets tissulaires des agents fixateurs

Fixateurs	Fournisseur	pH à 21°C
Formol 6,9	Labonord	6,9
Formol 7,4	-	7,4
Paraformaldéhyde	-	7,4
Liquide de Baker : formol - calcium	-	5,3
AFA : alcool – formol – acide acétique	-	3,3
FAAM : formol – acide acétique - méthanol	-	2,0
Liquide de Bouin aqueux : formol – acide picrique - acide acétique	-	1,4
Alcool 100°	-	3,6
Alcool 70°	-	8,6
Hydrosafe® : substitut du formol	Labonord	2,9
RCL2® : substitut du formol	Alphelys	4,2
Excell+® : substitut du formol : contient du glioxal	MM France	6,1

Tableau II : pH des différentes solutions de fixation

Agent fixateur	Ethanol - Méthanol - Acétone	Acide acétique	Formaldéhyde	Glyoxal	Acide picrique
Modification du volume tissulaire	↓ +++	↑ +++	Non	Non	↓ +
Réactions sur les protéines	Coagulant Non additif	Non légère extraction	Additif non coagulant	Additif non coagulant	Coagulant et additif
Réactions sur les acides nucléiques	Non	Précipitation	Légère extraction	Non	Hydrolyse partielle
Réactions sur les lipides	Extraction	Non	Préservés mais avec une perte dans le temps	?	Non
Effets sur l'activité enzymatique	Préservée si gardé à froid	Inhibition	Préservés (si congélation courte)	?	Inhibition
Effets sur les organites (mitochondries...)	Détruits	Détruits	Préservés	?	Distorsion

Tableau III : propriétés des agents fixateurs seuls

biologique est de 1/10^e de la solution pure de formol commercial soit une concentration de 4% de l'agent fixant (formaldéhyde). Une solution de formol à 25% (soit une concentration en formaldéhyde de 10%) donne un aspect brûlé aux tissus et doit être évitée.

Le temps de fixation va dépendre de la taille de l'échantillon, un temps de 12 heures est nécessaire pour les biopsies et 24 heures pour les pièces un peu plus grandes (échantillons de 0,5 cm à 1 cm).

La fixation par le formol peut être réalisée à 4°C ou à température ambiante. La fixation des échantillons biologiques (création des ponts entre protéines et autres molécules) est longue, une fixation à 4°C évite l'autolyse des tissus mais serait plus longue (30 heures). Les tissus seront moins rétractés, le maillage créé par le formol est moins important que dans la fixation à température ambiante que dans le tissu fixé à température ambiante pendant 24 heures.

Cependant, la fixation au formol n'est pas une réaction chimique au sens strict du terme, la cinétique de réaction est plus rapide à température ambiante qu'à 4°C, puisqu'il n'y a pas d'autolyse des tissus visible au microscope optique et que la qualité histologique est tout à fait correcte, la fixation à température ambiante est très souvent utilisées. Le nombre de ponts formolés étant plus important que dans la fixation à froid, il sera nécessaire de faire des prétraitements (restauration antigénique en immunohistochimie ou l'étape de digestion enzymatique pour l'hybridation *in situ*) un peu plus drastiques dans le cas de la fixation à température ambiante.

Il est intéressant de noter que le paraformaldéhyde qui est un autre fixateur aldéhydique, correspond à une polymérisation

des molécules de méthanal (CH₂O molécules fixatrices du formol) en polymères de grande taille (polymères insolubles, (CH₂O)_n, n>100).

Le glyoxal : (éthanedial ou oxalaldéhyde) appartient à la famille des aldéhydes : OHC-CHO.

Ce fixateur est utilisé comme substitut du formaldéhyde. La substance pure est liquide. Les solutions commerciales contiennent 30 à 40% de glyoxal et présentent des polymères et différentes formes du glyoxal. Le glyoxal peut se détériorer avec le stockage et va générer de l'acide glycolique. Cette réaction peut se produire très rapidement en solution neutre ou acide. Les solutions fixatrices contenant du glyoxal doivent être tamponnées et contenir une petite quantité d'alcool qui catalyse les réactions avec les protéines tissulaires.

Les réactions du glyoxal avec les protéines et autres macromolécules sont similaires à celles du formaldéhyde mais sont plus rapides. Les tissus de petite taille peuvent être fixés correctement après 1 heure d'immersion dans le glyoxal. Des échantillons de grande taille nécessitent une fixation de 9 heures minimum pour permettre la pénétration du fixateur dans le tissu.

L'éthanol : préserve la majorité des pigments, il dissout les graisses et a un effet de rétraction très important ainsi qu'un durcissement des tissus. Il est souvent utilisé pour la préservation du glycogène. L'éthanol précipite les acides nucléiques et certaines protéines. Lorsque le temps d'exposition est court, les acides nucléiques ne sont pas précipités et restent solubles dans l'eau.

Le méthanol : cet agent est un excellent fixateur pour la cytologie, il peut également être utilisé pour les coupes tissulaires congelées. Comme l'éthanol, le méthanol extrait les lipides des tissus biologiques. Cependant les carbohydrates ne sont pas éliminés. Cet agent fixateur ne durcit pas les tissus de façon aussi intensive que l'éthanol.

L'acétone : peut dénaturer les structures tissulaires. L'extraction des lipides est très importante mais les carbohydrates sont préservés. L'acétone est utilisé pour la fixation des frottis cellulaires et des coupes tissulaires congelées pour la préservation des antigènes leucocytaires de surface.

L'acide acétique : ne fixe pas les protéines mais coagule les acides nucléiques. Cet agent fixant présente une pénétration rapide dans le tissu avec un gonflement des structures tissulaires. Il est ajouté dans les mélanges de fixateurs pour préserver les chromosomes, précipiter la chromatine des noyaux interphasiques et s'opposer à l'action de rétraction des autres agents fixateurs tels que l'éthanol ou l'acide picrique.

L'acide picrique : (trinitrophénol de couleur jaune) est utilisé comme fixateur mais également dans certaines colorations histochimiques (ex coloration de Van Gieson (2 et 3)).

Une solution aqueuse saturée d'acide picrique (pH : 1,5 – 2,0) provoque la précipitation (coagulation) des groupements basiques des protéines par la formation de sels picrates. La précipitation des protéines n'a pas lieu si la solution présente un pH

neutre ; de même les protéines précipitées peuvent être dissoutes lors de la neutralisation de la solution d'acide picrique.

Les tissus fixés dans un mélange d'agents fixateurs contenant de l'acide picrique sont transférés directement dans une solution d'alcool 70° dans le but de coaguler les protéines précipitées. Lorsque d'autres agents fixateurs (ex : formol) sont mélangés avec l'acide picrique, toutes les protéines dans le tissu sont encore solubles dans l'eau jusqu'à la coagulation par l'éthanol.

Le faible pH des solutions d'acide picrique conduit à l'hydrolyse des acides nucléiques. Les fixateurs contenant de l'acide picrique doivent être évités lors d'analyses de l'ADN ou de l'ARN par hybridation *in situ*. A l'inverse, l'utilisation d'acide picrique dans un mélange de fixateurs permet d'obtenir des colorations histologiques de très bonne qualité et plus contrastées.

Le liquide de Bouin (ou Bouin aqueux) contient un mélange d'acide picrique, de formaldéhyde, d'acide acétique glacial et d'eau. Il préserve les caractéristiques morphologiques, plus particulièrement le noyau et le tissu conjonctif, cependant les érythrocytes sont lysés. Ce fixateur est utilisé pour des études histologiques classiques du fait d'une distorsion tissulaire minime. Les blocs de paraffine sont très faciles à couper et les colorations histologiques donnent généralement des couleurs intenses. En revanche, les organites cytoplasmiques sont mal conservés et la solution provoque une extraction de l'ARN ainsi qu'une hydrolyse de l'ADN. Une solution de Bouin alcoolique permet de conserver certains carbohydrates hydrosolubles (glycogène).

CONCLUSION

Les différents agents fixateurs utilisés en histologie ont des effets (gonflement, rétraction, durcissement, extraction de molécules...) sur les tissus biologiques. Le fixateur idéal n'existant pas, il est donc très important de déterminer le but pour lequel le tissu doit être préservé, les entités potentiellement pathologiques ou normales présentes dans le tissu, les substances à mettre en évidence et les différents procédés techniques (colorations histologiques, immunohistochimie, hybridation *in situ*...) à réaliser pour pouvoir sélectionner le fixateur adéquat. Il est également important de considérer l'épaisseur et la taille de l'échantillon, le volume de fixateur requis, la vitesse de pénétration et la durée de fixation en fonction du fixateur choisi. Tout nouveau fixateur doit être évalué pour les différentes techniques utilisées au laboratoire afin de connaître ses effets sur les tissus avant son utilisation en routine.

BIBLIOGRAPHIE

1. BAKER JR. Principles of biological microtechnique. Methuen and Co, London, 1958
2. CARSON FL. Histotechnology A self-instructional text. ASCP Press, Chicago 1997
3. CARSON FL, HADIK C. Histotechnology A self-instructional text. 3rd edition, ASCP Press, Hong-Kong 2009
4. LUNA L. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Amer Histolabs Pub Dept, Gaithersburg, 1993
5. KIERNAN JA. Histological and histochemical methods: theory and practice. Scion Publishing Ltd, Oxfordshire, 2008
6. GABE M. Techniques histologiques. Masson, Paris, 1968.
7. GANTER P, JOLLES G. Histologies normale et pathologique. Gauthier-Villars, Paris, tome 1 (1969), tome 2 (1970).

LA COUPE SOUS TOUS SES ANGLES : L'UNIVERS DE LA MICROTOMIE

*Sandra DOVERO

*sandra.dovero@u-bordeaux2.fr

CNRS UMR5293

Institut des Maladies Neurodégénératives

Université Bordeaux Segalen

146, rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux

RESUME

Une fois prélevés, les tissus, trop épais pour laisser passer la lumière nécessaire à la microscopie optique, doivent encore être coupés en lamelles extrêmement fines. C'est à la fin des années 1800, que l'invention des microtomes a permis la réalisation de coupes de tissus biologiques, suffisamment fines afin d'observer leurs différents composants tissulaires et cellulaires. Du microtome rotatoire au microtome laser, en passant par le cryostat ou encore le vibratome, l'univers de la microtomie est aujourd'hui très vaste et permet la coupe de tous les types de tissus, qu'ils soient végétaux ou animaux. Chaque technique de coupe a ses particularités et ses impératifs. Le choix de l'amincissement d'un tissu doit donc être adapté à ce que l'on cherche à observer dans le tissu biologique. L'objet de cette présentation est de guider les utilisateurs parmi le panel d'outils actuellement disponibles.

INTRODUCTION

On attribue en général à Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), le fait d'avoir attiré l'attention des biologistes sur l'utilisation du microscope optique, même si des loupes ordinaires étaient déjà fabriquées et utilisées au XVI^e siècle. Les tissus biologiques sont trop épais pour laisser passer la lumière, aussi doivent ils être coupés finement. Le microtome (du préfixe grec « mikros » qui signifie petit et du suffixe « tomê » qui signifie incision) est un outil qui permet de réaliser, dans un matériel animal ou végétal, des coupes suffisamment fines (quelques microns) pour être observées en microscopie optique. Les premiers microtomes sont donc apparus au commencement de la microscopie optique. L'un des premiers outils permettant de couper de très fines tranches de tissu biologique a été inventé en 1770 par George Adams, Jr. puis développé par Alexander Cummings. Ce type d'outil était manuel et le tissu biologique était poussé vers le haut d'un cylindre par

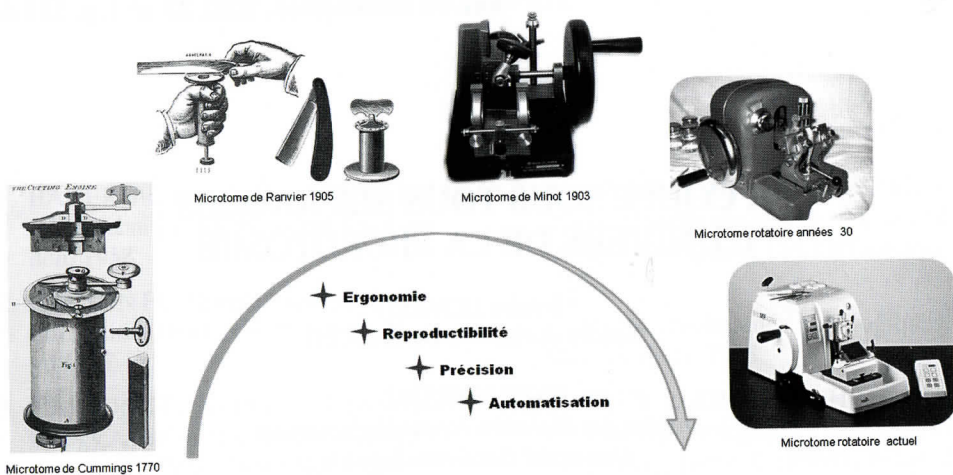
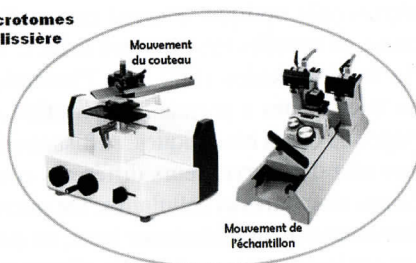


Figure 1 : L'évolution de la microtomie, des années 1800 à nos jours, a permis une amélioration de l'ergonomie, de la reproductibilité et de la précision mais également un gain de temps considérable par l'automatisation de certains modèles

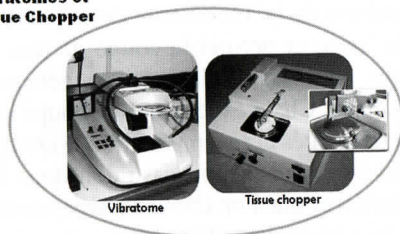
a : Microtomes rotatoires



b : Microtomes à glissière



c : Vibratomes et Tissue Chopper



Figures 2 : L'ensemble des microtomes peuvent être regroupés en trois grandes familles selon leur type de mécanisme : a- les microtomes rotatoires, b- les microtomes à glissière et c- les vibratomes et Tissue Chopper

une manivelle, puis coupé à l'aide d'un rasoir à main. En 1835, Andrew Prichard développa le premier modèle fixable à une table permettant de réaliser des coupes plus régulières. L'opérateur tenait le couteau à deux mains aux extrémités et pouvait réaliser la coupe sans que le support, contenant le tissu, ne bouge. Occasionnellement, l'invention du premier microtome est attribuée à l'anatomiste Wilhelm His, Sr. en 1865, mais plusieurs autres sources attribuent son développement au physiologiste tchèque Jan Evangelista Purkyne. Le modèle Purkyne serait alors décrit comme le premier microtome utilisé en pratique courante. Ce flou vient du fait que les premiers modèles étaient des outils très simples de coupes, et que la phase de développement des modèles plus mécanisés n'a pas du tout été documentée. C'est donc à la fin des années 1800, que les microtomes ont permis la réalisation de coupes de tissus biologiques suffisamment fines pour permettre l'observation des différents composants tissulaires et cellulaires d'un organe biologique. Aujourd'hui, la plupart des microtomes sont constitués d'un porte couteau et d'un porte objet, complétés par un mécanisme d'avancement semi-automatique ou automatique. Le tissu biologique est coupé soit par déplacement de l'échantillon vers le couteau, soit de façon inverse en fonction des modèles. Du microtome rotatoire au microtome laser, en passant par le cryostat ou encore le vibratome, l'univers de la microtomie est aujourd'hui très vaste et permet la coupe de tous les types de tissus biologiques, qu'ils soient végétaux ou animaux. L'amélioration des modèles, tant en terme d'ergonomie, de reproductibilité, de précision mais également d'automatisation est constante (Figure 1). Chaque technique de coupe a ses applications, ses particularités et ses impératifs. Le choix du mode de coupe d'un tissu bio-

logique doit donc être adapté à ce que l'on cherche à observer dans le tissu. L'objet de cet article est de guider les utilisateurs parmi le panel d'outils actuels.

QUELS SONT LES DIFFERENTS MICROTOMES ?

L'ensemble des microtomes existant à ce jour peut être classé en trois grandes familles selon leur type de mécanisme (Figure 2) :

1) Les microtomes rotatoires (Figure 2a), qui comprennent les cryostats, les ultracryotomes, les microtomes, et enfin les ultramicrotomes. Cette catégorie d'outils se caractérise par un mouvement rotatoire de l'objet à couper vers le couteau, qui lui, reste fixe. Les cryostats et les ultra-cryotomes permettent de couper des tissus congelés ($\pm 20^{\circ}\text{C}$), tandis que les coupes aux microtomes et ultra-microtomes se font à température ambiante.

2) Les microtomes à glissière ou « Sledge microtome » (Figure 2b), comme leurs noms l'indiquent, permettent une coupe par « glissement » horizontal. Dans la plupart des modèles, c'est le couteau qui glisse horizontalement vers l'objet qui est fixe, mais il existe certains modèles où à l'inverse, on fait glisser l'objet vers le couteau. Les coupes peuvent se faire à température ambiante ou sur tissu congelé, pour les modèles équipés de module refroidissant.

3) Les microtomes vibratoires ou les « tissus chopper » (Figure 2c), sont deux appareils distincts, dans lesquels le couteau est en mouvement sur le tissu. Les microtomes vibratoires sont plus souvent nommés vibratomes, car le rasoir vibre tout en avançant sur le tissu à couper. La coupe se fait à température ambiante ou dans un bain

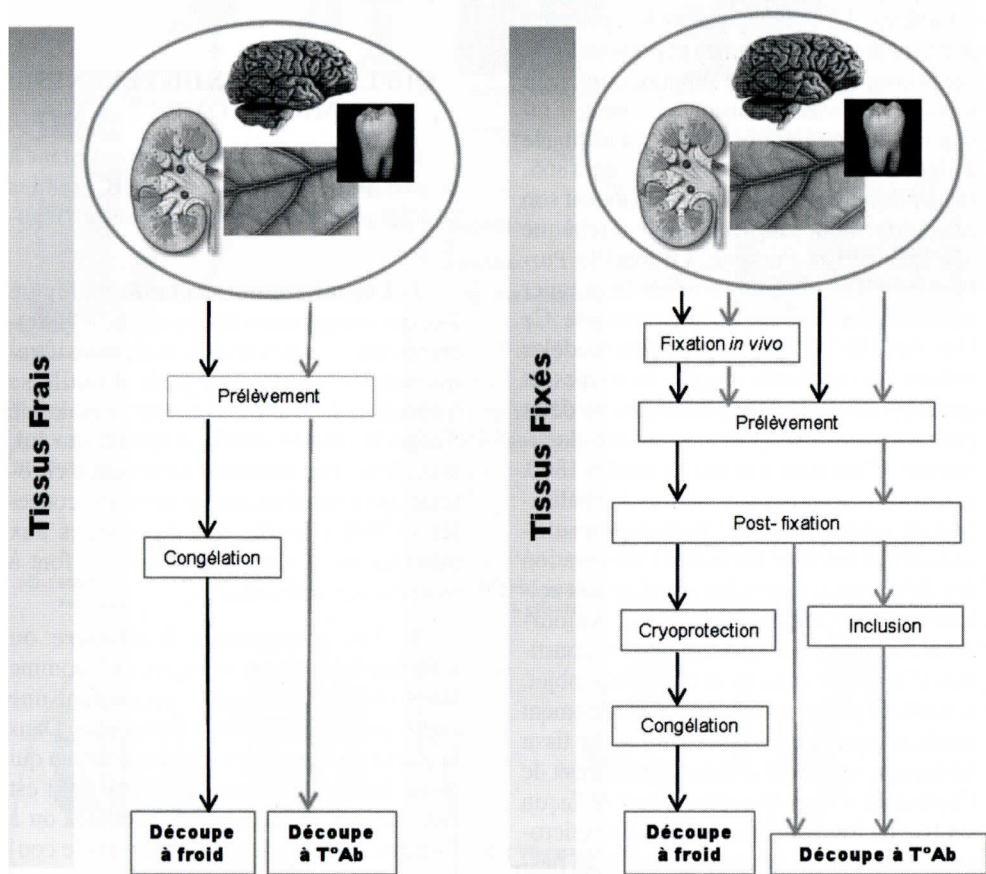


Figure 3 : Le choix de la coupe doit être adapté à la préparation du tissu

de glace pour faciliter la coupe, mais aussi pour retarder le processus de dégradation des tissus (protocole de biologie moléculaire, ou coupes de tissus pour cultures organotypiques par exemple). Dans le cas du « tissu chopper », l'échantillon est placé sur un plateau métallique circulaire qui se déplace lors de la coupe et ce à température ambiante ou refroidie. La lame tranchante est fixée à l'extrémité d'un bras de levier qui est soulevé, puis retombe sous l'action de son propre poids et d'un ressort de tension. La vitesse peut varier de 1 à 200 coupe(s) par minute d'une épaisseur de 100µm à 1mm. Une rotation du plateau permet également l'obtention de prismes ou de cubes. L'utilisation du « tissu chopper » est plus spécifique pour la coupe de petits organes ou de petits fragments biologiques pour lesquels, il serait difficile d'envisager des méthodes de coupes conventionnelles.

COMMENT CHOISIR SON OUTIL DE COUPE ?

Il y a plusieurs façons de choisir son outil pour couper les tissus. Les différentes contraintes auxquelles les manipulateurs peuvent être soumis, sont par exemple, le type et la préparation du tissu avant la coupe (tissu fixé, enrobé ou frais...). Le type d'outil à disposition au sein du laboratoire et/ou le niveau d'observation souhaité (macroscopique, cellulaire ou subcellulaire voire moléculaire...) sont aussi des paramètres que l'on doit bien évidemment prendre en compte.

1) Choisir son outil en fonction du type de tissu

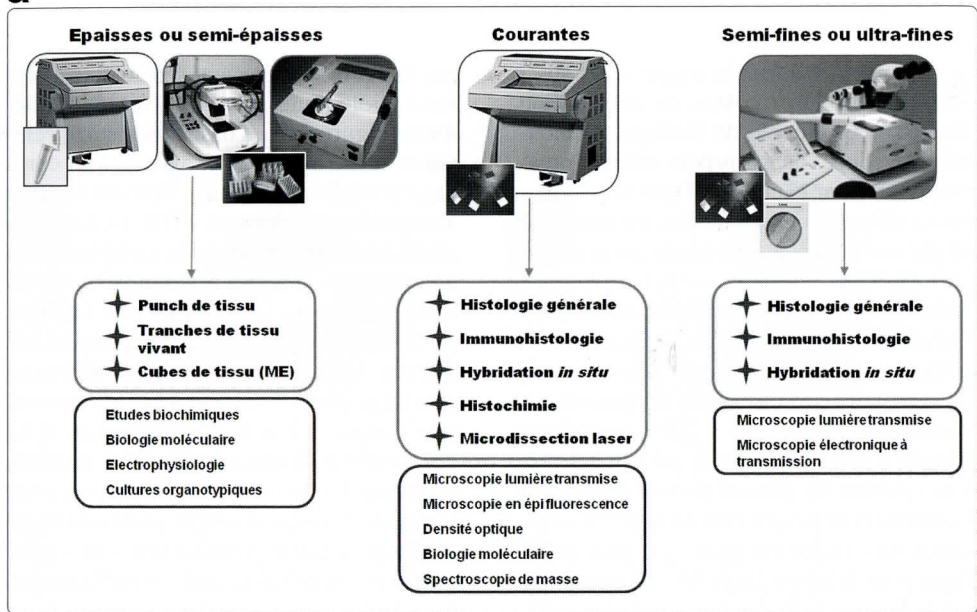
Dans certains cas, nous ne pouvons décider de la nature du tissu que nous avons à couper (tissus humains par exemple). Deux

cas de figure se présentent généralement : les tissus biologiques frais ou fixés chimiquement (Figure 3). Les tissus frais sont prélevés et directement coupés avec ou sans enrobage préalable dans de l'« Optimal Cutting Temperature compound » (OCT), à température ambiante ou congelés. Les tissus frais non congelés peuvent être coupés avec un « tissu chopper » ou un vibratome. La Figure 4a résume l'ensemble des possibilités offertes. Les tissus frais congelés offrent un plus large panel d'outils, puisqu'ils peuvent être coupés à l'aide d'un cryostat, d'un microtome à glissière ou encore d'un ultracryotome. Les tissus fixés, quant à eux, sont, soit fixés chimiquement par perfusion intracardiaque avant le prélèvement, soit « post-fixés » par immersion, après le prélèvement, dans le fixateur chimique (solutions tamponnées de formaldéhyde, glutaraldéhyde,...). Les tissus fixés non congelés ou inclus peuvent être coupés à température ambiante, seulement avec un vibratome. Les tissus fixés, congelés ou inclus (paraffine, gélatine, résines, OCT, ...), offrent encore une fois un plus large panel d'outils, ainsi que le réalisation des coupes plus fines. Les tissus fixés non enrobés congelés sont coupés au cryostat, au microtome à glissière à congélation (équipé du module de refroidissement), ou à l'aide d'un ultra cryotome. Les tissus fixés et enrobés (gélatine, paraffine, résine,...) sont coupés à température ambiante, au microtome (rotatoire ou à glissière) ou avec l'ultra microtome. La Figure 4b résume l'ensemble des possibilités offertes pour la coupe du tissu fixé.

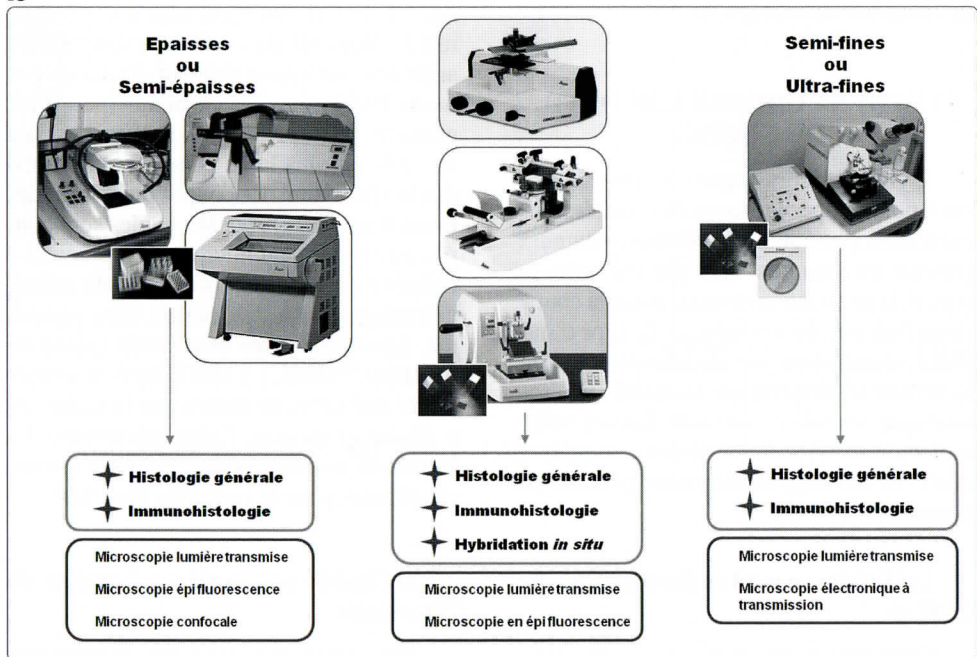
2) Choisir son outil en fonction de l'épaisseur

Trois catégories de coupes peuvent être schématiquement définies pour choisir son outil de coupe :

a



b



Figures 4 : Les alternatives de coupe du tissu frais (a) et fixé (b) selon l'épaisseur et l'application choisie

1- les coupes épaisses à semi-épaisses de 30 μm à 300 μm . Ces coupes peuvent être réalisées avec un vibratome, cryostat ou tissu chopper pour les plus épaisses ;

2- les coupes « courantes » de 4 à 30 μm qui peuvent être faites à l'aide d'un cryostat ou de microtomes ;

3- les coupes semi-fines à ultra-fines de 0.05 à 2 μm , réalisées à l'aide d'un ultra-microtome à congélation ou non.

3) Choisir son outil en fonction de l'application

L'ensemble des coupes réalisées ont diverses applications (Tableau I), quelles soient courantes, comme les techniques de coloration des tissus, l'histochimie, l'immunohistologie ou l'hybridation *in situ* ; ou bien plus spécifiques comme les cultures organotypiques, l'électrophysiologie, les études en biologie moléculaire, la microdissection laser ou encore la spectroscopie de masse (1). Chaque application requiert donc un type de coupe particulier sur un tissu biologique fixé ou non. Mais au delà de l'application, selon l'analyse menée, le marquage immunohistologique obtenu doit également parfois être pris en compte dans le choix de la coupe (coupe sériées et épaisseur minimale par exemple dans le cas des comptages stéréologiques, etc...).

LES COUPES ATYPIQUES

Certains outils de coupe sont dédiés à des applications très particulières et sont un peu plus confidentiels.

1) Le Tissue Micro Arrays ou (TMA)

La technique du TMA rassemble sur un même support des dizaines, voire des centaines de prélèvements de tissus biologiques,

d'origines différentes (Figure 5a). Les différentes carottes de tissus biologiques fixés, sont incluses dans un moule généralement constitué de paraffine. Le bloc ainsi constitué est ensuite coupé avec un microtome rotatoire ou à glissière à température ambiante. L'ensemble des prélèvements est récupéré sur la même lame et sera donc traité dans les mêmes conditions. Cette technique peut également s'appliquer à des carottes réalisées dans du tissu frais et congelé. Les prélèvements sont alors inclus dans un moule d'OCT à -20°C. Le bloc constitué est ensuite coupé avec un cryostat ou un microtome à glissière à congélation.

2) La coupe par transfert de film

Cette technique s'effectue dans un cryostat. Elle permet de réaliser des coupes très fines (jusqu'à 2 μm), tout en préservant l'intégrité et la morphologie du tissu (Figure 5b). Un film est déposé à la surface du bloc à couper avant de réaliser la coupe. Une fois la coupe faite, le film est déposé, avec la face du film qui porte la coupe, contre une lame de microscopie particulière. Une brève irradiation sous Ultraviolet (UV) de ce type de lame permet une polymérisation du tissu biologique. On parle alors de « transfert » de la coupe qui adhère parfaitement à la lame sans distorsions ou plis du tissu. Le film est finalement enlevé, et la coupe peut être utilisée pour les applications souhaitées.

3) La coupe de culots cellulaires

L'analyse de culots cellulaires peut être réalisée, après inclusion du culot dans un milieu d'enrobage (OCT, gélatine ou paraffine), ou bien après congélation rapide sous haute pression (Figure 5c). Le culot congelé est ensuite coupé à l'aide d'un cryostat, d'un ultra cryotome ou encore de microtomes à congélation.

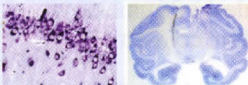
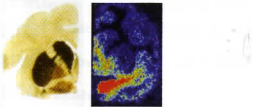
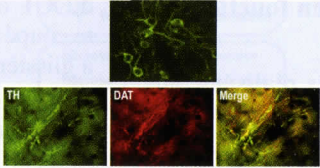
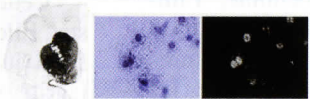
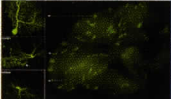
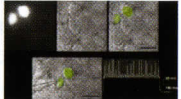
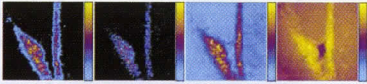
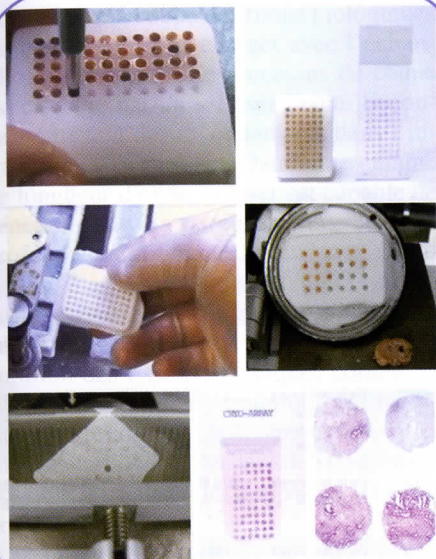
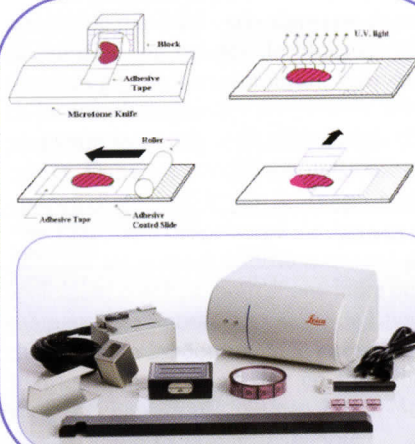
Applications	Illustrations	Type de coupes
Colorations		Tissu frais ou fixé
Histochimie		Tissu frais
Immunohistologie		Tissu frais ou fixé
Hybridation in situ		Tissu frais
Cultures organotypiques		Tissu vivant
Electrophysiologie		Tissu vivant
Biologie moléculaire		Tissu frais
Microdissection laser		Tissu frais
Spectroscopie de masse		Tissu frais

Tableau I : Différents exemples d'applications utilisées sur coupes de tissu

a : Tissue Micro Array



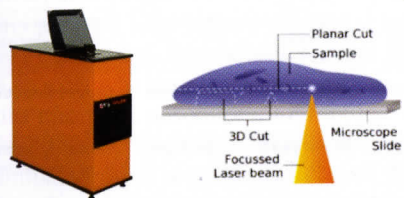
b : Découpe par transfert de film



c : Découpe de culots cellulaires



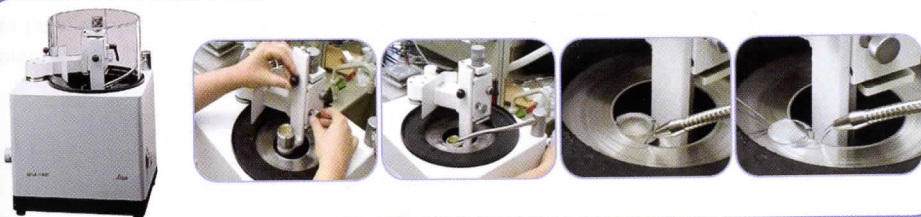
d : Microtome laser



e : Microtome « corps entier »



f : Microtome à scie



Figures 5 a-f : Les coupes atypiques en microtomie

	Outil	Type de tissu	Enrobage	T°C de découpe	Type de support	Mouvement	Epaisseur	Type d'application
	Cryostat	Frais Fixé	OCT	-15 à -30°C	Lames Plaques à puits	Du tissu vers la lame	4 à 300 µm	Multiples
	Microtome rotatoire	Fixé	Paraffine	T°Ab	Lames	Du tissu vers la lame	2 à 20 µm	Coupes paraffine
	Microtome à glissière	Fixé	OCT Paraffine	-15 à -30°C T°Ab	Lames Plaques à puits	De la lame vers le tissu ou du tissu vers la lame	2 à 50 µm	Coupes de tissus durs et/ou larges
	Vibratome	Frais Fixé	Ø	T°Ab	Plaques à puits	De la lame vers le tissu	20 à 600 µm	Coupes pré-ultra microtomie (MET) Tranches de tissu vivant
	Tissue Chopper	Frais	Ø	T°Ab	Plaques à puits	De la lame vers le tissu et du tissu vers la lame	100 µm à 1 mm	Coupes pré-cryo ultra microtomie (MET)
	Ultracut	Frais Fixé	Ø Résines	-15 à -120°C T°Ab	Lames Grilles ME	Du tissu vers la lame	50 nm à 2 µm	Coupes MET
	Microtome laser	Frais Fixé	Ø	T°Ab	Lames Plaques à puits	Du laser sur le tissu	10 à 100 µm	Coupes sans enrobage Tissu vivant possible
	Microtome à scie	-	Ø	T°Ab	Lames	Du tissu vers la scie	30 à 500 µm	Coupes tissus très durs
	Microtome corps entier	Frais Fixé	OCT	-15 à -30°C	Lames Plaques à puits	Du tissu vers la lame	10 à 50 µm	Autoradiographie sur larges spécimens

Tableau II : Tableau récapitulatif des différents outils de microtomie et des applications possibles pour chacun d'eux

4) Le microtome laser

Le microtome laser est un instrument utilisé pour la coupe des tissus biologiques ou matériaux, sans contact avec l'échantillon (Figure 5d). Le processus de coupe est effectué par un « Laser Femto Seconde » émettant des rayonnements dans l'infrarouge (1030 nm) (2). Dans cette gamme de longueur d'onde, le laser est capable de pénétrer dans le tissu jusqu'à une certaine profondeur (1.1mm maximum) sans causer de dommages thermiques. Contrairement aux microtomes mécaniques, le microtome laser ne nécessite pas de techniques de préparation des tissus biologiques comme la congélation, la déshydratation ou l'inclusion. Il a la capacité de couper le tissu dans son état natif. Selon l'échantillon traité, il est possible de réaliser des coupes de 10 à 100 µm d'épaisseur.

5) Le cryostat « corps entier »

Ce type de cryostat « géant » permet de réaliser des coupes de très grands spécimens pouvant aller jusqu'à 40 cm de longueur (Figure 5e). Il est le plus souvent utilisé en recherche pour tracer des composants radio marqués, par autoradiographie, sur des coupes de tissus biologiques de corps d'animaux entiers congelés. Les coupes sont collectées sur de larges rubans adhésifs et transférées ensuite sur des films sensibles aux rayons X. Après un temps d'exposition les films sont révélés, puis comparées à la coupe d'origine pour localiser les composants recherchés.

6) Le microtome à scie

Cet instrument permet de préparer des coupes de matériaux très durs (os, dent non décalcifiée, ou coupes de blocs de résine destinés à l'ultra microtomie), sans détruire la morphologie des spécimens, afin de permettre leur analyse en microscopie (Figure 5f). Dans les conditions optimales, des coupes d'environ 30 µm à 500µm peuvent être réalisées. Le principe de la coupe est basé sur un porte-échantillon qui est guidé lentement contre le bord d'une lame de scie diamant, en rotation. La vitesse de l'avancée du spécimen est commandée par un moteur hydraulique et est ajustée en fonction du type d'échantillon à couper. Un dispositif de refroidissement par l'eau évite l'échauffement de l'échantillon, et élimine les débris de la coupe.

CONCLUSION

Le tableau II résume l'ensemble des conditions d'utilisation pour chacun des différents microtomes précédemment décrits. Toutes les coupes sont finalement réalisables, si l'on utilise l'outil adapté à ce que l'on souhaite visualiser sur nos échantillons.

BIBLIOGRAPHIE

- LANGERON M. - Précis de microscopie. Edition Masson, 1949.
1. BRUNELLE A., TOUBOUL D. et LAPREVOTE O. : Nouvelles perspectives en biologie avec l'imagerie moléculaire par spectrométrie de masse. *Biophotonics – SPECTRA*, Juin - Juillet - Août 2006, **250**.
 2. LUBATSCHOWSKI H.: Laser Microtomy : Opening a New Feasibility for Tissue Preparation. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim*, 2007.

LA MICRODISSECTION PAR CAPTURE LASER : DE LA GRAINE DE COLZA A L'HOMME EN PASSANT PAR LE POISSON

*Alain FAUTREL, Pascale BELLAUD et Roselyne VIEL

*alain.fautrel@inserm.fr

*Plate-forme H²P² d'Histopathologie,
IFR140 – Biogenouest – Université de Rennes I
2, avenue du Professeur Léon Bernard – 35043 Rennes cedex
<http://histopathologie.univ-rennes1.fr>*

RESUME

La microdissection laser permet de sélectionner spécifiquement un groupe cellulaire sur une coupe de tissu pour des analyses de transcriptomique, de génomique ou de protéomique.

Quelques exemples de projets, menés sur la plateforme H²P², illustrent les différents champs d'application de cette technologie et les différentes réponses apportées en fonction de l'espèce étudiée et des types cellulaires d'intérêt.

INTRODUCTION

Les organes sont constitués de différents types cellulaires provenant de tissus épithéliaux, tissus conjonctifs, vaisseaux et nerfs auxquels peuvent s'ajouter lors d'agression : des cellules du système immunitaire, des fibroblastes, des macrophages. Cette complexité tissulaire rend souvent les

résultats de biologie moléculaire difficilement interprétables.

Les techniques de microdissection laser, sous contrôle morphologique, isolent des cellules ou groupes de cellules. Les études de biologie moléculaire deviennent alors spécifiques de types cellulaires purifiés à partir desquelles les différentes techniques de transcriptomique, génomique et protéomique pourront être utilisées.

La technique de microdissection laser a été utilisée en biologie pour la première fois dans les années 1970, principalement en Embryologie. Cette technique permet de capturer spécifiquement, après sélection au microscope, un ou plusieurs types cellulaires sur une coupe de tissu. Les acides nucléiques ou les protéines peuvent alors être extraits de ces cellules sans être contaminés par les cellules environnantes.

Actuellement trois technologies principales sont utilisées :

- **La technique de catapultage :** cette technique utilise un laser Ultra-Violet (UV) qui va découper le tissu d'intérêt. L'échantillon est ensuite catapulté dans un microtube grâce à l'énergie obtenue par défocalisation du laser (PALM-ZEISS®).
- **La technique de découpe par laser UV et récupération par gravimétrie :** cette technique, comme la précédente découpe à l'aide d'un laser UV le prélèvement. Une fois coupé le fragment tombe dans un microtube (Leica®)
- **La technique de capture :** Cette technique utilise un laser Infra Rouge (IR) qui colle les cellules d'intérêt sur un film plastique (Arcturus®). Les nouvelles générations de microdissecteurs Arcturus utilisent en complément du laser IR un laser UV. De plus, dans cette technique, l'utilisation d'un capuchon (ou Cap) pour coller les cellules sélectionnées, permet de visualiser facilement le résultat de la capture.

Depuis 2007, la plateforme H²P² d'Histopathologie utilise un microdissecteur par capture laser. Nous avons choisi le Veritas (Arcturus), cet appareil est équipé d'une enceinte qui assure une meilleure protection des contaminations extérieures.

Les différentes collaborations, que nous avons établies avec des équipes de recherche provenant de différents organismes tels que les Universités, l'INRA, l'Inserm et le CNRS, nous ont permis d'acquérir une expérience sur de nombreux tissus provenant d'espèces aussi différentes que le colza, la souris, la truite, le zebrafish et l'Homme.

MATERIEL ET METHODE

La majorité des projets nécessitant l'utilisation de la microdissection a pour objectif l'analyse transcriptomique d'un type cellulaire dans une population tissulaire hétérogène. Il est donc nécessaire de maîtriser toutes les étapes, allant du prélèvement de l'échantillon à l'extraction de l'ARN y compris l'amplification des transcrits. Pour la microdissection par capture laser, la déshydratation de la coupe et son caractère plan sont par ailleurs essentiels au succès de la microdissection.

L'échantillon doit rapidement être fixé pour bloquer l'action des Ribonucléases (RNases) qui dégradent les Acides Ribonucléiques (ARN). L'idéal étant une congélation rapide dans un bain d'isopentane refroidi à environ -80°C dans de l'azote liquide. Des coupes de 10 µm sont réalisées à l'aide d'un cryostat (préalablement nettoyé, puis décontaminé avec de l'alcool 70°, car les détergents RNaseZap (Ambion) gèlent à -20°C) et aussitôt plongées dans un bain d'alcool 70° entre -20°C et -25°C. Ces dernières sont déshydratées dans des bains d'alcool à concentrations croissantes 70°, 90°, 100°, puis dans 2 bains de Xylène. La déshydratation bloque l'activité des RNases et est indispensable pour le système de capture laser. Dans la mesure du possible, il faut éviter l'utilisation de colorants, les solutions aqueuses pouvant être contaminées par des RNases. Cependant, l'identification des cellules à prélever nécessite souvent une coloration rapide. Il faudra alors utiliser des colorants spécifiques (Arcturus ou Ambion) pour préserver la qualité des ARN. Parfois, un immuno-marquage rapide à 4°C pendant 4 à 5 minutes, avec un anticorps (Ac) primaire couplé à un fluorochrome sera néces-

saire pour reconnaître les cellules ciblées. Une analyse de la qualité des constituants cellulaires et plus particulièrement les ARN par la mesure du RNA Integrity Number (RIN) Agilent®, (une micro électrophorèse est effectuée grâce au bioanalyzer 2100, cette migration permet de séparer les ARN en fonction de leur taille et de visualiser les ARN majoritaires 18S et 28S. Un algorithme calcule le RIN dont les valeurs se situent entre 10 (correspondant à une qualité excellente) et 1 (mettant en évidence des ARN dégradés). Cette mesure est faite sur les ARN provenant de l'ensemble de l'échantillon à microdissequer afin de valider la qualité de la congélation du tissu avant toute microdissection. La capture s'effectue en moins d'une heure pour limiter la réhydratation des tissus. Et bien entendu, l'extraction des ARN est réalisée selon le protocole de propreté et de stérilité lié aux manipulations de biologie moléculaire.

Pour certains tissus, cette technique de congélation n'est malheureusement pas utilisable car elle provoque une destruction de l'architecture tissulaire. Il faut alors les fixer chimiquement avec du formol ou des substituts, telle une solution d'alcool/acide acétique (3/1), les inclure en paraffine. Le formaldéhyde entraîne des liaisons covalentes entre les acides nucléiques et les protéines. Les ADN et ARN extraits, sont alors fragmentés, leur utilisation pour des techniques sur microarrays est alors délicate. L'amplification et l'hybridation des acides nucléiques deviennent alors dépendantes du niveau de fragmentation, compromettant la fiabilité de l'interprétation. Cependant, des études de niveau d'expression peuvent être envisagées par Reverse Transcription et Polymerase Chain Reaction quantitative (RTqPCR). La préparation des tissus pour la

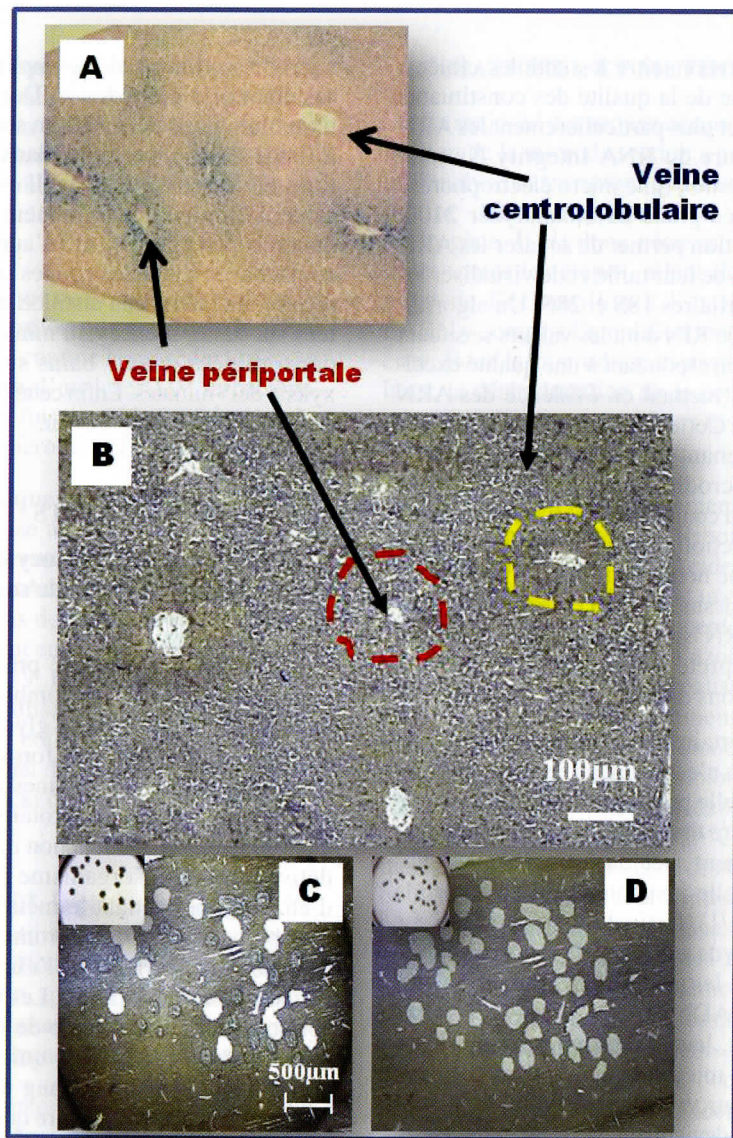
microdissection est alors simplifiée, les tissus étant déjà déshydratés. Des coupes du tissu biologique de 7 à 10µm sont réalisées à l'aide d'un microtome, dans les conditions ci-dessus énumérées. Il est indispensable d'éliminer suffisamment de coupes pour récupérer du tissu qui n'aura pas été en contact avec l'air. Ces coupes sont récupérées sur un bain d'eau distillée stérile, montées sur lame, séchées 30 minutes à 58°C, déparaffinées dans 3 bains successifs de xylène de 5 minutes. Enfin cette lame est placée dans le microdissecteur.

RESULTATS

A – Capture d'hépatocytes périportaux et centrolobulaires de souris avec le laser IR

Le foie est constitué principalement d'hépatocytes ayant de nombreuses fonctions : la régulation de la glycémie par le stockage de glucose sous forme de glycogène, la synthèse de protéines (facteurs de coagulation, albumine, protéines de stockage du fer...) et une fonction importante de détoxification de l'organisme par l'action d'enzymes permettant le métabolisme des xénobiotiques (les cytochromes P450,...). Ces enzymes permettent l'élimination de ces composés dans la bile. Les hépatocytes sont organisés sous forme de lobules permettant de filtrer le sang qui passe de la veine porte amenant le sang des intestins vers la veine centrolobulaire qui emporte le sang vers la veine cave inférieure, puis le cœur.

Les hépatocytes périportaux et centrolobulaires ont des fonctions distinctes : certains cytochromes sont exprimés préférentiellement dans l'une des deux populations,



Figures 1 : Capture d'hépatocytes tumoraux et péri-tumoraux

A : La coloration de Perls permet de visualiser la localisation périportale du fer lors d'une surcharge alimentaire

B : Reconnaissance des espaces périportaux et centrolobulaires sur une coupe de foie congelé de souris avant capture

C : Capture des hépatocytes périportaux; visualisation de la coupe après capture (en haut à gauche) visualisation des hépatocytes capturés sur le cap ?

D : Capture des hépatocytes centrolobulaires sur la même coupe

la glycogénèse est réalisée par les hépatocytes périportaux, alors que les hépatocytes centrolobulaires montrent une glycolyse plus active et sont également responsables de la synthèse de du métabolisme de l'urée.

Nos premiers travaux ont été réalisés en collaboration avec l'équipe d'Olivier Loréal de l'unité U522 de l'Inserm (Rennes) et avaient pour objectif de capturer deux populations distinctes d'hépatocytes dans le foie de souris. Cette équipe étudie l'hémochromatose, maladie qui se caractérise entre autre, par une surcharge en fer au niveau hépatique. Lors de surcharge provoquée, le fer est stocké préférentiellement dans les hépatocytes périportaux comme le montre la coloration de Perls (Figure 1A). Cette localisation pourrait s'expliquer par une expression localisée des enzymes du métabolisme du fer dans le foie.

Une même coupe de 10µm de foie congelée est réalisée au cryostat, puis colorée avec l'Histogen (Arcturus), déshydratée, nous a permis de capturer, avec le laser IR, d'une part, les hépatocytes périportaux et d'autre part, les hépatocytes centrolobulaires (Figures 1A, D). La spécificité des captures a été confirmée par la mesure par RTqPCR de l'expression des gènes spécifiquement exprimés au niveau périportal ou centrolobulaire (Pepck au niveau périportal ; Glutamine Synthase et Cyp2E1 au niveau centrolobulaire) et nous avons pu montrer une plus forte expression du récepteur à la transferrine I et de la céruloplasmine au niveau périportal. Cette technique de sélection cellulaire s'est avérée plus spécifique que la sélection cellulaire par lyse avec la digitonine, ou à la Cytométrie de flux.

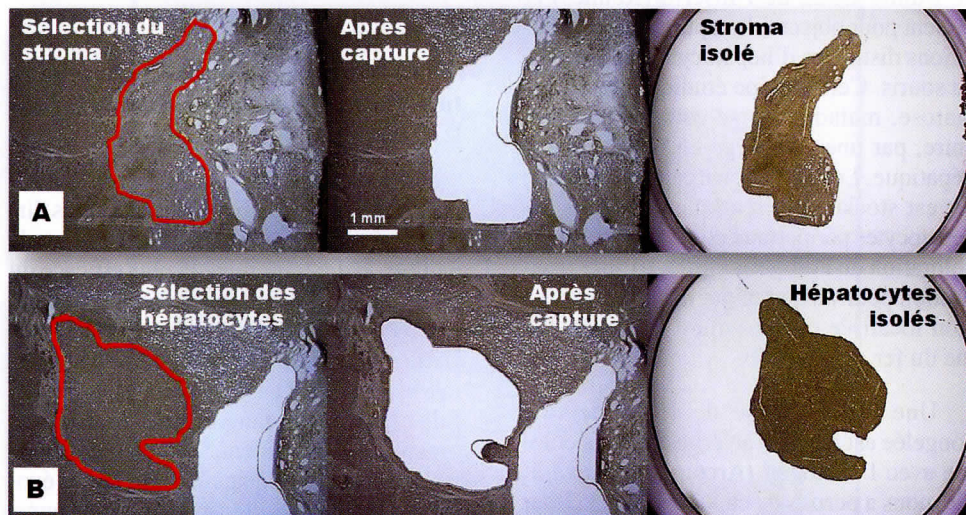
Il y a un double intérêt de la microdissection laser : i) on peut analyser les deux sous populations hépatocytaires sur une

même coupe de foie, ce qui n'est pas le cas dans la méthode utilisant la digitonine. ii). Il n'y a pas de traitement enzymatique avant la récupération des deux sous populations, ni individualisation de chaque cellule pour la cytométrie de flux. Avec la microdissection il n'y a pas de contamination d'une population à l'autre (2).

B – Capture au laser UV de cellules tumorales et de stroma péri tumoral dans le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) survient le plus souvent dans des foies cirrhotiques, correspondant au dernier stade de fibrose. Le traitement le plus efficace du CHC est la résection tumorale. Cependant, une récurrence est constatée dans certains cas. Cette récurrence est liée à l'agressivité tumorale qui se traduit par la dissémination de cellules tumorales dans le foie ou d'autres organes. Actuellement, nous disposons de peu de pistes expliquant les différentes évolutions tumorales, elles-mêmes faisant appel aux processus d'angiogénèse, aux modifications des tissus de soutien qui, de toute évidence, relèvent d'approches thérapeutiques totalement différentes.

En collaboration avec Cédric Coulouarn (Inserm U991 Rennes), nous proposons de capturer spécifiquement les cellules hépatocytaires et le stroma adjacent sur des CHC ayant des diagnostics anatomopathologiques différents, eux-mêmes établis sur l'activité tumorale et sur l'activité des métalloprotéinases (MMP2 et 9). L'objectif est de mettre en évidence des différences d'expression de gènes dans le tissu tumoral comparé au tissu non tumoral (ou péri tumoral) d'un même patient. Pour ce faire, une comparaison du transcriptome du stroma en contact avec les cellules tumorales et les



Figures 2 : Capture de la matrice extracellulaire et des hépatocytes normaux ou tumoraux
 Découpage de la région d'intérêt avec le laser UV et collage sur le cap avec le laser IR
A : Capture de la matrice en bordure des hépatocytes tumoraux après déshydratation sans coloration, visualisation avant, après capture et résultat de la capture sur le cap
B : Capture des hépatocytes tumoraux sur la même lame que A

cellules non tumorales sera effectuée ainsi qu'une comparaison du transcriptome des hépatocytes tumoraux ou non.

La technique de microdissection choisie est la capture par découpe UV puis capture par quelques points infra rouge. Nous avons fait le choix du laser UV. En effet, les zones à capturer sont étendues, ce qui impliquerait une capture trop longue en utilisant uniquement le laser IR. Les surfaces totales capturées sont de 5 à 6 mm² (Figure 2). Une première étude de transcriptomique nous a permis de valider l'utilisation directe de nos ARN purifiés sur les puces Agilent 8X60K en déposant seulement 10 ng d'ARN microdis-séqués. Ces nouvelles puces ouvrent de nouvelles perspectives pour la microdissection laser en évitant les étapes d'amplification en amont du protocole d'amplification/hybridation de l'étude transcriptomique.

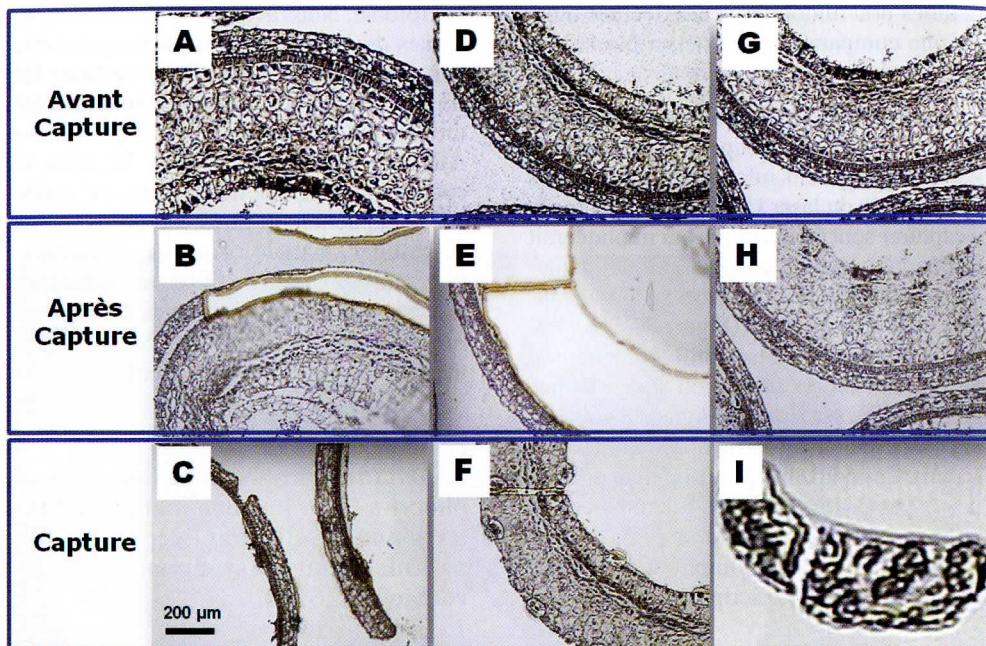
C – Capture du tégument interne et externe de graine de colza inclus en paraffine

L'équipe de Nathalie Nesi, de l'INRA UMR 118 (Rennes - Le Rheu), cherche à diminuer la teneur en tannin à l'origine d'une diminution de la digestibilité du colza. Nous avons été sollicités pour capturer spécifiquement les téguments interne et externe des graines de colza de 5 à 15 jours après pollinisation et ainsi de déterminer spécifiquement la localisation du tannin dans la graine. Nous n'avons pas pu utiliser la technique de congélation. En effet, l'architecture des graines de colza n'était pas préservée lors de la congélation. Nous les avons donc fixés dans une solution alcoolique, RCL2-CS100®, Excilone, pour une meilleure préservation des ARN. Les graines ont été ensuite incluses en paraffine et coupées au

microtome. Nous avons testé les deux techniques de capture avec découpe préalable aux UV ou directement avec le laser IR (Figure 3). Aucune différence notable a été mise en évidence concernant la qualité des ARN. Cependant avec le laser IR, seule la couche superficielle des cellules est collée sur le capuchon, et nous capturons moins de cellules, mais le risque de contamination, par des cellules différentes non apparentes est de moindre importance. La mesure d'expression de gènes (BAN genes), des tannins a été effectuée par RTqPCR (4).

D – Identification et capture de lymphocytes B par immuno-marquage dans les glandes salivaires secondaires de patients atteints du syndrome de Gougerot Sjogren (SGS).

L'équipe de Jacques-Olivier Pers de l'équipe EA 2216 (Brest) s'intéresse aux facteurs de transcription pouvant être impliqués dans le SGS, une maladie auto-immune systémique caractérisée par une atteinte des glandes exocrines. Notre objectif était de capturer spécifiquement les lymphocytes B (LB) présents dans les glandes salivaires secondaires des malades. Afin d'identifier les lymphocytes B, tout en préservant les ARN de ces cellules nous avons choisi de faire un marquage par immunofluorescence avec un anticorps spécifique (CD20) directement couplé avec un fluorochrome la Fluorescein Isothiocyanate (FITC). Le Veritas est équipé d'épifluorescence, ce qui nous a permis de différencier les LB des lymphocytes T (LT). Les LB ont ainsi pu être capturés spécifiquement (Figure 4). L'ensemble des transcrits obtenu a été amplifié avant une étude par RTqPCR. L'équipe de J-O. Pers a ainsi pu mettre en évidence un phénotype



Figures 3 : Capture des téguments externe (A à D) et interne (E à H) sur des graines de colza préalablement fixées au RCI2, puis incluses en paraffine. Coupes de 10 μ m d'épaisseur

A, E : Graines avant capture visualisation des téguments

B, F : Graines après capture du tégument externe avec le laser IR

C, G : Résultat de la capture sur le cap observation global (X2)

D, H : Observation de la capture (X20)

particulier montrant que les LB contribuent probablement à la production locale d'auto-anticorps ainsi qu'à la destruction des cellules épithéliales des glandes salivaires dans le SGS (3).

E – Capture de cellules exprimant la GFP dans le cerveau de zebrafish

L'équipe d'Olivier Kah de l'UMR CNRS 6026 (Rennes) s'intéresse à la régénération des cellules gliales dans le cerveau de poissons. Les cellules à l'origine de cette régénération expriment l'aromatase, une enzyme impliquée dans le métabolisme des stéroïdes. Le laboratoire dispose d'une lignée de poisson transgénique dans lequel le gène GFP a été inséré en aval du promoteur du gène codant l'aromatase. Les cellules exprimant l'aromatase expriment alors également la GFP, molécule fluorescente permettant de repérer les cellules d'intérêt. Nous avons ainsi pu capturer spécifiquement avec le laser IR les cellules fluorescentes et en extraire les ARN (Figure 5). Des amplifications par transcription *in vitro* sont en cours pour permettre une étude par RTqPCR des gènes d'intérêt.

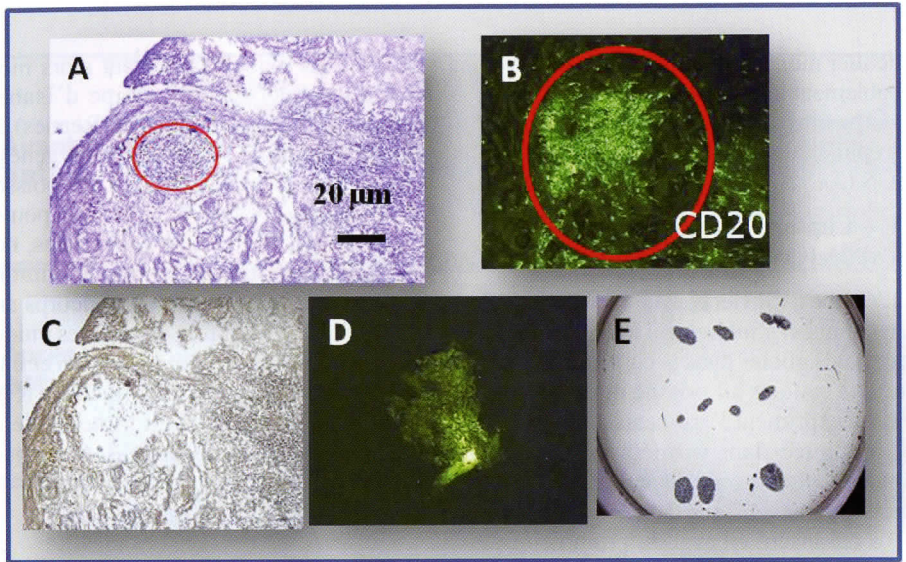
F – Capture de cellules uniques les ionocytes dans la branchie de truites

Les ionocytes sont les principales cellules impliquées dans l'équilibre osmotique du poisson. La truite, au cours de sa vie est amenée à transiter de l'eau douce à l'eau

de mer, les ionocytes doivent alors modifier leur phénotype. L'équipe d'Isabelle Leguen de l'INRA - SCRIBE (Rennes) étudie l'évolution de l'expression des gènes de ces cellules lors des passages des poissons d'eau douce à l'eau de mer. Pour pouvoir capturer spécifiquement ces cellules, nous avons adapté une technique d'immunofluorescence direct avec un anticorps anti-NaKTPase. La capture de cellules uniques dans la branchie nécessite précision et finesse obtenues grâce au laser Infra rouge (Figure 6). Une étude du transcriptome de ces cellules est envisagée en utilisant les puces Agilent 8X60K.

G – Etude protéomique d'une capture de cellules tumorales humaines implantées dans une souris immunodéficiente.

L'équipe de Gorges Baffet de l'unité U522 de l'Inserm (Rennes) a étudié le rôle d'ERK1 (une MAPKinase) dans la progression tumorale. A partir de lignées tumorales transfectées ou non avec des siRNA contre ERK1, la progression tumorale de ces cellules implantées dans une patte de souris immunodéficiente a été étudiée. Grâce à la microdissection par capture laser, nous avons mesuré spécifiquement le niveau d'expression d'ERK1 dans les cellules tumorales humaines, (identifiable par la GFP). La zone de capture étant très importante, la mesure de l'expression protéique par Western-Blot a pu être réalisée (1).



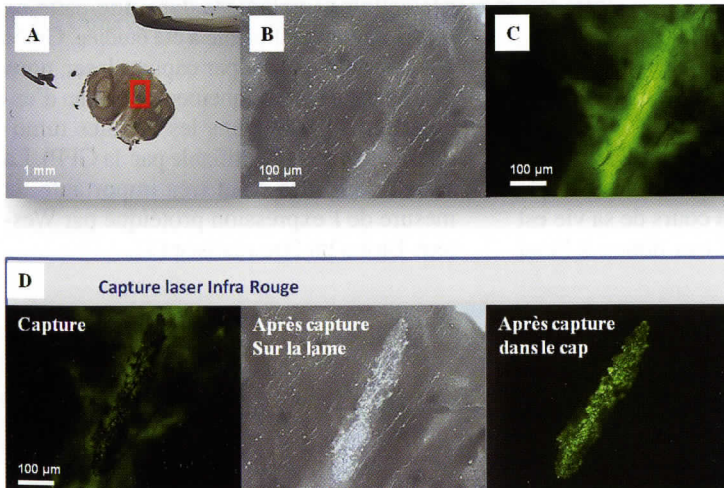
Figures 4 : Capture de lymphocytes B dans les glandes salivaires de patients atteints du syndrome de Gougerot-Sjogren

A : Visualisation de l'infiltrat lymphocytaire avec la coloration Histogen

B : Identification des lymphocytes B par immunofluorescence avec l'anticorps CD20C : Coupe de tissu après capture des lymphocytes B, observation en fond clair

D : Visualisation en fluorescence des cellules capturées sur le cap (X20)

E : Ensemble des captures sur le cap X2

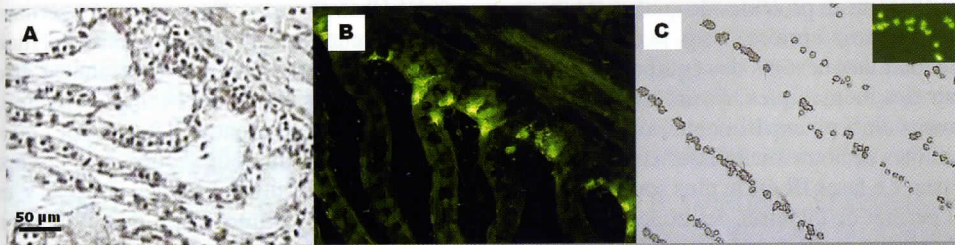


Figures 5 : Capture de cellules gliales GFP+ exprimant l'aromatase
A : Zone du cerveau de zebrafish où sont localisées les cellules exprimant la GFP

B : Sans la fluorescence, aucune distinction n'est possible

C : Visualisation des cellules GFP+

D : Capture avec le laser IR des cellules GFP+

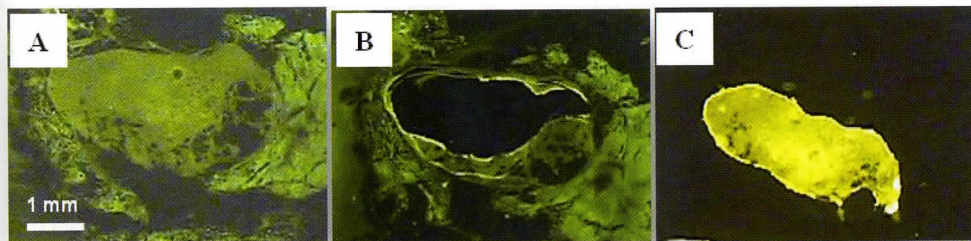


Figures 6 : Capture de cellules de branchies de truite exprimant la NaKTPase impliquée dans la régulation osmotique du poisson

A : Branchie de truite congelée, coupe déshydratée de 10 µm

B : Identification des cellules exprimant la NaKTPase par immunofluorescence

C : Cellules capturées spécifiquement sur le cap avec le laser IR



Figures 7 : Capture d'une tumeur de souris après implantation de cellules tumorales humaines

A : Visualisation de la tumeur (les cellules expriment le gène GFP)

B : Coupe du tissu après capture

C : Echantillon tumoral après capture

CONCLUSION

Chaque nouveau projet nécessite une mise au point liée à la diversité tissulaire. Au travers de quelques exemples caractéristiques, nous allons illustrer les différents moyens de répondre à des problématiques spécifiques, liées aux tissus biologiques étudiés, avec pour objectif l'extraction d'ARN, d'ADN ou de protéines de qualité. Au cours de ces trois années, nous avons dû nous adapter aux besoins des équipes travaillant sur des thématiques très différentes. Nous avons ainsi pu expérimenter toutes les possibilités de notre microdissecteur par capture laser. Le laser IR est le plus souvent utilisé, il permet de capturer des zones étroites ou de petites tailles, sans risquer de « griller les cellules ». Le laser UV est utilisé pour les grandes zones cellulaires homogènes, telles que les tumeurs hépatiques. Pour identifier les cellules d'intérêt, nous avons parfois dû utiliser soit les colorants spécifiques pour préserver les acides nucléiques, Histogen, Arcturus (en solution aqueuse) soit le crésyl violet, Ambion (en solution alcoolique).

Pour l'extraction des protéines, il est préférable d'utiliser le Bleu de Toluidine. Nous avons également été amenés à marquer les cellules d'intérêt avec un anticorps primaire couplé à un fluorochrome.

Il est difficile de répondre aux demandes en protéomique en raison de la faible quantité de matériel biologique récolté. Cependant, dans le cadre d'un projet concernant une tumeur implantée dans une souris Nude des résultats par Western-Blot ont pu être obtenus. Ces quelques exemples avaient pour but de vous montrer l'étendue des possibilités de la microdissection par capture laser, grâce à l'utilisation des lasers UV et IR ainsi que l'importance des étapes en amont et en aval de la microdissection pour l'obtention d'ARN ou d'ADN de qualité. Cette technique permet d'étudier, dans un tissu donné, la réponse, de chaque type cellulaire, à un stress ou à une modification de son environnement et permet de faire le lien entre l'étude histologique et l'analyse cellulaire par transcriptomique et protéomique.

BIBLIOGRAPHIE

1. BESSARD A., FREMIN C., EZAN F., FAUTREL A., GAILHOUSTE L. AND BAFFET G. : RNAi-mediated ERK2 knockdown inhibits growth of tumor cells *in vitro and in vivo*, *Oncogene* : 2008, **27**, 5315-5325.
2. TROADEC M-B., FAUTREL A., DRÉ-NOU B., LEROYER P., CAMBERLEIN E., TURLIN B., GUILLOUZO A., BRISSOT P., LORÉAL O. : Transcripts of ceruloplasmin but not hepcidin, both major iron metabolism genes, exhibit a decreasing pattern along the portocentral axis of mouse liver, *Biochimica et Biophysica Acta* : 2008, **1782**, 239-249.
3. LE POTTIER L., DEVAUCHELLE V., FAUTREL A., DARIDON C., SARAUX A., YOUINOU P. AND PERS J-O. : Ectopic Germinal Centers Are Rare in Sjogren's Syndrome Salivary Glands and Do Not Exclude Autoreactive B Cells1 : *The Journal of Immunology*, 2009, **182**, 3540-3547.
4. AUGER B., BARON C., LUCAS M-O., VAUTRIN S., BERGÈS H., CHALHOUB B., FAUTREL A., RENARD M., NESI N. Brassica orthologs from BANYULS belong to a small multigene family, which is involved in procyanidin accumulation in the seed. *Planta*: 2009, **230**, 1167-1183.

REMERCIEMENTS

Je remercie Mireille Desille-Dugast pour la relecture de cet article et pour ses remarques avisées.

SENSIBILITE ET AMPLIFICATION EN IMMUNOHISTOCHIMIE : DEVELOPPEMENT D'UNE TECHNIQUE D'IMMUNOFLUORESCENCE A PARTIR D'UN PROTOCOLE DE REVELATION CHROMOGENIQUE

*Nathalie ACCART, Sandrine COCHIN, Ronald ROOKE

*accart@transgene.fr

*TRANSGENE S.A., Laboratoire d'Histologie
Boulevard Gonthier d'Andernach, Parc d'Innovation
67405 ILLKIRCH-GRAFFENSTADEN CEDEX*

RESUME

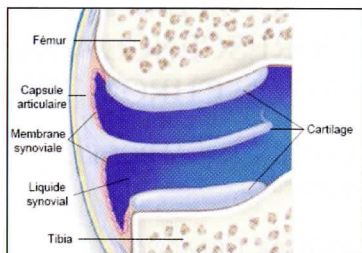
Les techniques d'immunohistochimie (IHC) permettent aux pathologistes de compléter leurs diagnostics en identifiant spécifiquement certains types cellulaires ou leurs produits. La HorseRadish Peroxidase (HRP) est l'enzyme la plus largement utilisée dans les techniques de révélation en IHC. La mise en évidence des immunomarquages par des traceurs fluorescents a permis d'élargir ces méthodologies, notamment en réalisant des marquages multiples sur une même cellule. Cependant, certains anticorps secondaires couplés à des fluorochromes n'existent pas, aussi il est nécessaire d'adapter les protocoles d'IHC. Ces modifications peuvent engendrer une diminution de la sensibilité et aboutir à une absence de signal. Le présent article décrit l'utilisation du Signal d'Amplification à la Tyramide (SAT), permettant de passer d'un protocole d'IHC révélé avec l'HRP, à un protocole d'immunofluorescence (IF), tout en conser-

vant la sensibilité de la technique originale. Nous décrirons son utilisation pour la détection de molécules telles que les CD1a, CD3, CD20, CD21, vimentine, CD68 et CD115 sur des coupes paraffine de membranes synoviales humaines. Ce système s'avère aussi avantageux, car il permet d'obtenir un signal à des concentrations réduites d'anticorps ou d'améliorer le rapport signal sur bruit.

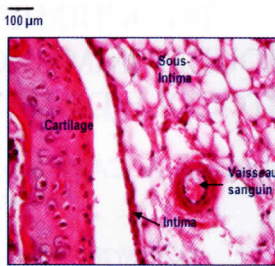
INTRODUCTION

L'ARTICULATION SYNOVIALE DANS LA POLYARTHRITE RHUMATOIDE

L'articulation synoviale, ou diarthrose est constituée des extrémités des pièces osseuses recouvertes de cartilage et séparées par une cavité remplie de liquide synovial (ou synovie) (Figure 1 A). Du point de vue histologique, la membrane synoviale est formée par l'intima, et constituée de

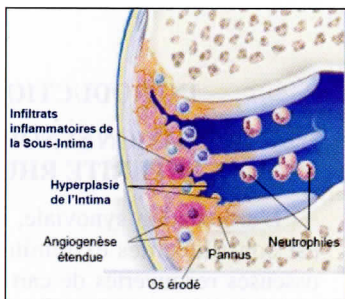


A

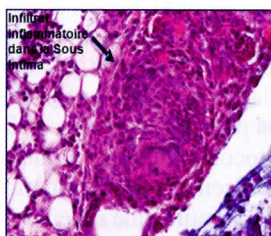
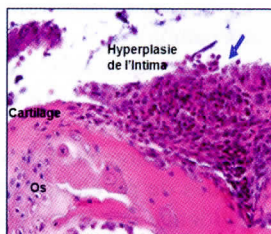


B

Figures 1A et 1B : Articulation synoviale et Membrane synoviale observée après coloration Hématoxyline-Eosine



A



B

Figures 2A et 2B : Articulation synoviale d'un patient atteint de polyarthrite rhumatoïde et Membrane synoviale observée après coloration Hématoxyline-Eosine

deux à trois couches cellulaires composées de synoviocytes, qui reposent sur un tissu fibro-adipeux vascularisé appelé sous-intima (Figure 1 B).

L'intima présente deux types de synoviocytes :

- les synoviocytes de type A ou « macrophage-like » représentent 20 à 30% des cellules synoviales et sont d'origine hématopoïétique. On les considère comme des macrophages résidents [1]. Ces cellules expriment des marqueurs macrophagiques, notamment CD14 et CD68 [2].

- les synoviocytes de type B ou « fibroblastiques » ont des prolongements dendritiques qui forment un réseau à la surface luminale de la membrane synoviale. Ils sont mis en évidence par la détection de la vimentine [1].

La sous-intima est constituée par un tissu conjonctif lâche contenant des fibroblastes, des macrophages, des adipocytes, des mastocytes, des fibres nerveuses, des cellules endothéliales et quelques polynucléaires et lymphocytes.

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune. Elle se définit comme un rhumatisme inflammatoire polyarticulaire, se caractérisant par une atteinte inflammatoire des membranes synoviales.

L'atteinte rhumatoïde ou synovite est caractérisée par :

- une hyperplasie de la membrane synoviale avec un épaississement de l'intima jusqu'à dix couches de cellules voire plus, aboutissant au pannus synovial responsable de la destruction cartilagineuse et osseuse (Figures 2 A, B) ;

- un infiltrat de cellules inflammatoires périvasculaires, un œdème interstitiel et une

néo-angiogenèse dans la sous-intima [3].

Afin de déterminer si certaines populations infiltrantes peuvent être utilisées comme biomarqueurs, il a été nécessaire de caractériser précisément les cellules constituant ces infiltrats.

TECHNIQUES MISES EN ŒUVRE

Dans le but d'identifier les types cellulaires présents dans les différents feuillets composant les membranes synoviales issues de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR), des techniques immunohisto-chimiques de simple marquage permettant la détection d'antigènes (Ag) comme CD1a, CD3, CD20, CD21, vimentine, CD68 et CD115 ont été établies. L'immunohisto-chimie (IHC) a permis la détection de ces antigènes par l'utilisation d'un anticorps secondaire lié à un polymère de dextran et à la peroxydase. L'étude de la co-expression de ces différents antigènes, par certains types cellulaires a imposé le développement de techniques d'immunofluorescence (IF), qui, en substituant à l'enzyme rapporteur un marqueur fluorescent, donne un grand avantage dans le cadre des marquages multiples. Les méthodes d'IF disponibles sont soit directes soit indirectes. Les méthodes directes par couplage de l'anticorps primaire au fluorochrome ont l'avantage de diminuer le temps de manipulation mais sont moins sensibles que les méthodes indirectes. Ces dernières consistent dans le couplage de l'anticorps primaire à la biotine, suivi d'une streptavidine couplée à un fluorochrome ou à un anticorps primaire non couplé, suivi d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. L'équivalent du système d'amplification basé sur le polymère de dextran directement couplé à un fluorochrome, n'existe pas. Les protocoles d'IHC ont donc

Antigène	Type Cellulaire	Référence de l'anticorps	Concentration Initiale	Concentration Finale ou Dilution	Contrôle Isotypique [Concentration Initiale]
CD1a	DC Interdigitées	M3571, Dako	1,216 mg/mL	25 µg/mL	Souris IgG1 [1 mg/mL]
CD3	Lymphocytes T	MS-401-S1, Thermo Scientific	Surnageant	d1/50	Souris IgG2a [250 µg/mL]
CD20	Lymphocytes B	MS-340-S1, Thermo Scientific	Surnageant	d1/500	Souris IgG2a [250 µg/mL]
CD21	DC Folliculaires et Lymphocytes B Matures	M0784, Dako	325 µg/mL	3,25 µg/mL	Souris IgG1 [1mg/mL]
vimentine	Cellules d'origine mésenchymale (fibroblastes)	M0725, Dako	205 µg/mL	0,2 µg/mL	Souris IgG1 [1mg/mL]
CD68	Macrophages et monocytes	MCA1815T, AbDSerotec	Surnageant	d1/200	Souris IgG2a [250 µg/mL]
CD115	Macrophages	Sc-692, Santa Cruz	200 µg/mL	2 µg/mL	Lapin IgG [1 mg/mL]

Tableau I : Anticorps primaires et contrôles isotypiques

Antigène	Anticorps secondaire	Tissu contrôle positif Rate	Membrane synoviale saine	Membrane synoviale PR
	Chèvre anti-Souris -dextran polymère-HRP (K4004, Dako) non dilué	Non déterminé	--	+
CD3		++/+++	--	+
CD20		++/+++	--	++/+++
CD21		++	--	+/++
vimentine		+++	+++	+++
CD68	Chèvre anti-Lapin -dextran polymère-HRP (K4003, Dako) non dilué	+++	-- à -/+	+
CD115		++	-/+ à +	++

Tableau II : Marquages obtenus par le protocole d'immunohistochimie

été adaptés en IF. Trois systèmes d'amplification ont été comparés, en terme de sensibilité par rapport à la méthode originale en IHC : anticorps secondaire directement couplé à un fluorochrome, anticorps secondaire couplé à la biotine et anticorps secondaire initialement utilisé en IHC et associé au système d'amplification à la tyramide (SAT).

Ce système a été introduit par Bobrow *et al.* [4-5] pour l'immunoblotting et l'ELISA, puis adapté à l'IHC, l'IF et l'hybridation *in situ* [6 à 9]. La technique est basée sur le dépôt d'un grand nombre de molécules de tyramide couplées à un haptène sur le site antigénique recherché. Ce dépôt est catalysé par l'activité de la peroxydase qui provoque la dimérisation de la tyramide [10]. Si la tyramide est appliquée à de faibles concentrations comme celles utilisées dans la réaction d'amplification d'IHC, la liaison des intermédiaires très réactifs à des résidus d'acides aminés riches en électrons, tels que la tyrosine, dans l'environnement proche de la peroxydase, est favorisée. Cette réaction aboutit au dépôt des radicaux de tyramide aux environs proches du site de réaction. Les résultats présentés ici démontrent l'intérêt de l'utilisation du système d'amplification à la tyramide dans les techniques de simple ou de double marquage.

MATERIEL ET METHODES

TISSUS SPLENIQUES ET SYNOVIAUX

La mise au point des protocoles a été réalisée sur un tissu humain splénique puis les protocoles établis ont été appliqués à des tissus synoviaux sains ou issus de patients atteints de PR. Les tissus ont été fixés dans une solution tamponnée de formaldéhyde 4%, puis déshydratés et inclus en

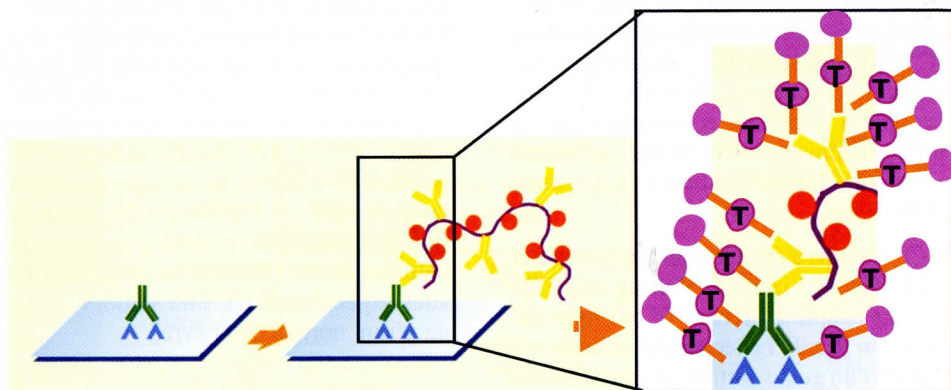
paraffine selon les procédures standard [11]. Des coupes de 5 à 8 μ m ont été réalisées à l'aide d'un microtome. Les doubles marquages envisagés ont nécessité des protocoles communs à tous les marqueurs, comme le démasquage antigénique établi en Tampon Citrate 10mM pH6 chauffé en étuve à 95° pendant 45 minutes, les lavages réalisés en tampon PBS - 0.1% Tween 20, la saturation des peroxydases endogènes par une solution à 5% H₂O₂ et la saturation des sites aspécifiques par une solution à 10% de sérum normal de chèvre.

MARQUAGES SIMPLES EN IMMUNOHISTOCHEMIE

Les anticorps primaires, les contrôles isotypiques correspondants et leurs conditions d'utilisation sont listés dans le Tableau I. Le Tableau II décrit les anticorps secondaires utilisés. Brièvement, après les étapes de déparaffinage et de réhydratation, de démasquage antigénique, de saturation des peroxydases endogènes et de saturation des sites aspécifiques, les anticorps primaires sont incubés pendant 1 heure 30 à température ambiante. Après lavages, les anticorps secondaires, couplés à un système d'amplification basé sur l'utilisation d'un polymère de dextran lié à l'HRP, sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante. L'HRP est mise en évidence par l'utilisation de la DiAminoBenzidine (DAB, K3468, Dako). Les coupes sont contre-colorées à l'Hémaroxylène pendant 30 secondes, déshydratées et montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt® (Labonord).

MARQUAGES SIMPLES EN IMMUNOFLOUORESCENCE

Les marquages sont réalisés selon la



Antigène (Ag)

Anticorps primaire

Anticorps secondaire couplé au polymère de dextran couplé à l'HRP

Complexe formé de la Tyramide (T) couplée à une molécule fluorescente

Figure 3 : Schéma du principe de l'utilisation du système d'amplification à la tyramide

Anticorps	Protocole IF 1 (Anticorps Secondaire directement couplé à un fluorochrome)	Protocole IF 2 (Anticorps secondaire biotinylé + streptavidine-fluorochrome)	Protocole IF 3 (Anticorps Secondaire -dextran polymère-HRP + SAT)
CD1a	Chèvre anti souris IgG - Alexa 488 (A-11029, Invitrogen) dilution 1/500	Chèvre anti-souris IgG - biotine (PN IM0816, Beckman Coulter) dilution 1/100 Streptavidine - Alexa 488 (S11223, Molecular Probes) dilution 1/400	Chèvre anti-souris - dextran polymère - HRP (K4001, Dako) non dilué SAT-FITC (K1497, Dako) dilution 1/100
CD3			
CD20			
CD21			
Vimentine			
CD68	Chèvre anti lapin IgG – Cy3 (111-165-003, Jackson Immunoresearch) dilution 1/500	Chèvre anti-lapin IgG – biotine (PN IM0830, Beckman Coulter) dilution 1/100 Streptavidine - Alexa 555 (S21381, Molecular Probes) dilution 1/400	Chèvre anti-lapin - dextran polymère - HRP (K4003, Dako) non dilué SAT-Cy3 (SAT704A, Perkin Elmer) dilution 1/50
CD115			

Tableau III : Anticorps secondaires et systèmes de révélation utilisés dans les trois protocoles d'immunofluorescence

méthode décrite précédemment jusqu'à l'incubation dans les anticorps primaires. Après lavages, les anticorps secondaires sont incubés pendant 30 minutes à température ambiante (Tableau III, protocoles IF 1 et IF 2). L'utilisation d'anticorps secondaires biotinylés nécessite une étape d'incubation avec de la streptavidine couplée soit à l'Alexa 488 soit à l'Alexa 555 pendant 30 minutes à température ambiante (Tableau III, protocole IF 2). Le protocole d'immunofluorescence 3 (Tableau III, protocole IF 3) reprend la méthode décrite pour l'IHC jusqu'à l'incubation des mêmes anticorps secondaires couplés au polymère de dextran et à l'HRP. Après lavages, s'ajoute une incubation de 10 minutes, à température ambiante dans le SAT couplé à la Fluorescéine IsoThioCyanate (FITC) ou à la Cyanine 3 (Cy3) (Figure 3). Les coupes une fois rinçées sont contre-colorées dans une solution à 0,5 µg/mL de Hoechst 33258 bis Benzimide, B-2883, Sigma, (coloration de tous les noyaux) pendant 15 minutes et montées entre lame et lamelle avec du Mowiol® (Calbiochem).

MARQUAGES MULTIPLES EN IMMUNOFLUORESCENCE

Les combinaisons d'anticorps permettant des marquages multiples sont décrites dans le Tableau IV. Les protocoles d'immunofluorescence permettant de révéler chaque Ag sont réalisés successivement. Lors de l'utilisation de deux anticorps primaires développés chez la souris, il est nécessaire de saturer les immunoglobulines de souris endogènes avec le kit Mouse-On-Mouse (M.O.M., PK2200, Vector Laboratories). Il est possible de combiner le protocole 1 avec les protocoles 2 ou 3 sans saturation supplémentaire. Il en est de même

lorsque l'on enchaîne les protocoles 2 et 3. Toutefois la succession de deux protocoles 3 basés sur l'utilisation du SAT impose une étape de saturation des peroxydases par une solution à 3% H₂O₂ pendant 15 minutes à température ambiante.

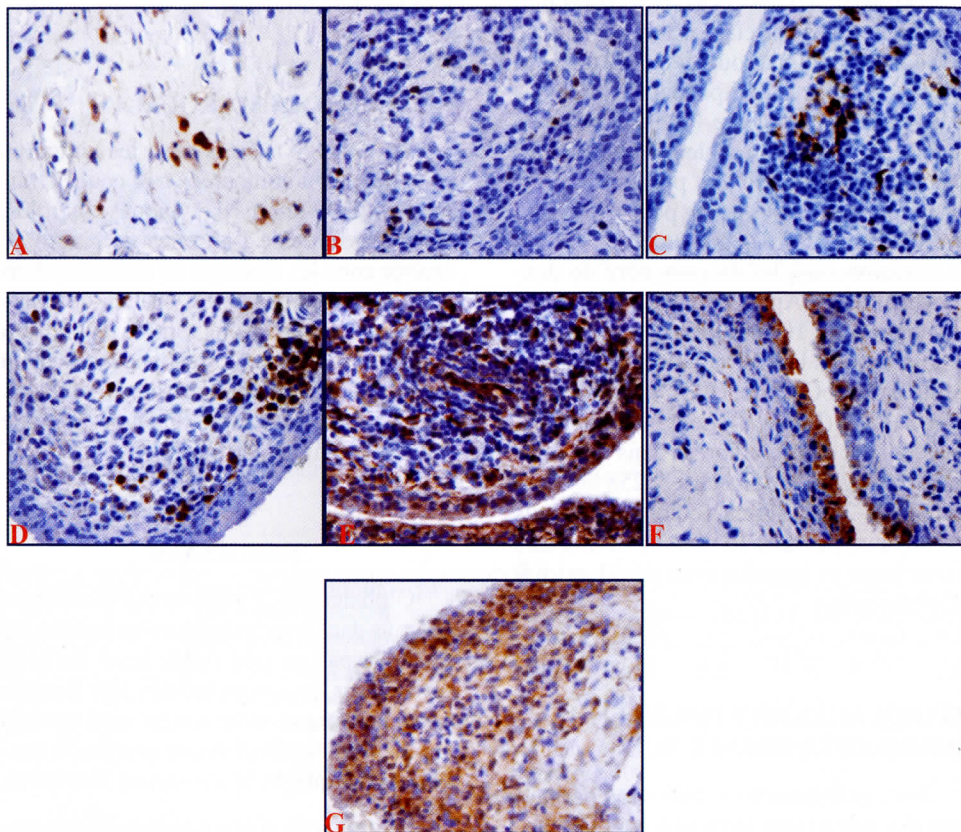
ANALYSE DES MARQUAGES

Les coupes traitées avec les anticorps primaires sont comparées aux coupes traitées par les anticorps isotypiques contrôles. Pour s'assurer de l'absence de réactivité croisée entre les systèmes de révélation dans les marquages multiples, chacun des anticorps primaires a été remplacé par son contrôle isotypique correspondant dans un protocole complet (données non montrées). La qualité du marquage obtenu est définie par le ratio signal / bruit.

RESULTATS

Globalement, l'analyse des marquages obtenus dans tous les protocoles testés a été facilitée par un très faible bruit de fond observé sur les coupes traitées avec les anticorps isotypiques déterminant ainsi un ratio signal / bruit optimal et une excellente qualité des marquages (données non montrées).

Le protocole d'immunohistochimie établi pour la détection des différents types cellulaires est basé sur un anticorps secondaire lié à un polymère de dextran, lui-même couplé à l'HRP. L'utilisation de ce système d'amplification a permis de mettre en évidence les différents types cellulaires étudiés par les antigènes sélectionnés. Les résultats sont décrits dans le Tableau II, et les Figures 4 A à G illustrent les différents marquages obtenus. Les cellules dendritiques interdigitées ont été mises en évidence par



Figures 4 : Détection des différents marqueurs étudiés sur une membrane synoviale de patient atteint de PR

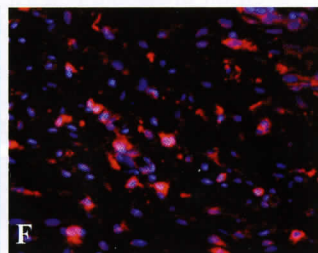
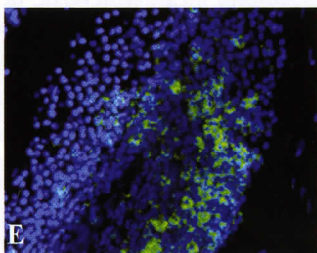
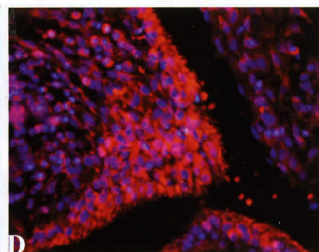
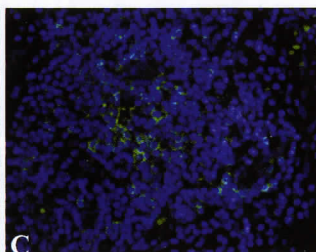
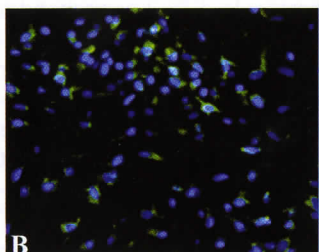
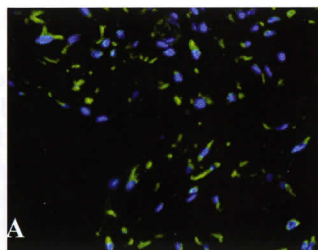
l'anticorps anti-CD1a à 25 µg/mL (Figure 4 A), des lymphocytes T par l'anticorps anti-CD3 dilué au 1/50 (Figure 4 B), des lymphocytes B par l'anticorps anti-CD20 dilué au 1/500 (Figure 4 C), des lymphocytes B matures et des cellules dendritiques folliculaires par l'anticorps anti-CD21 à 3,25 µg/mL (Figure 4 D), des fibroblastes par l'anticorps anti-vimentine à 0,2 µg/mL (Figure 4 E). Les macrophages et monocytes ont été mis en évidence par l'anticorps anti-CD68 dilué au 1/200 (Figure 4 F), ou par l'anticorps anti-CD115 à 2 µg/mL (Figure 4 G).

L'absence du même système d'amplification directement couplé à un fluorochrome n'a pas permis la translation directe de ce protocole d'IHC en un protocole d'IF. Nous avons donc modifié la technique afin d'obtenir un marquage identique en terme de

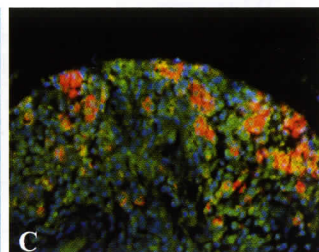
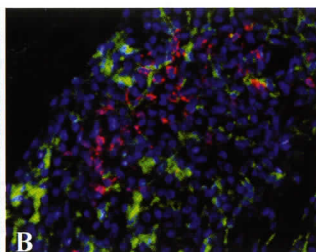
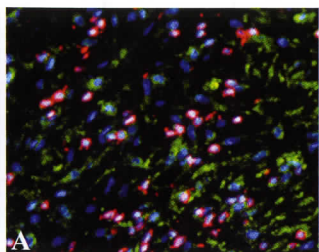
proportion de cellules marquées, de localisation et de ratio signal/bruit. Le Tableau IV résume les résultats obtenus avec les 3 protocoles d'IF testés sur des membranes synoviales de patients atteints de PR. Le protocole d'IF 1 correspond à l'utilisation d'anticorps secondaire directement couplé à un fluorochrome. Dans ce cas, seule la vimentine a pu être mise en évidence (Figure 5 A). Le protocole d'IF 2 correspond à l'utilisation d'anticorps secondaires directement couplés à une biotine et révélé par une streptavidine couplée à un fluorochrome. Dans cette condition, il est possible de mettre en évidence le CD20, la vimentine et le CD115 (Figures 5, B, C et D). Le protocole d'IF 3 est identique au protocole d'IHC par l'utilisation de l'anticorps secondaire couplé au polymère de dextran couplé à l'HRP. De ce fait nous sommes assurés de retrouver au minimum les marquages obtenus

	Immunofluorescence		
	Protocole IF 1 (Anticorps Secondaire directement couplé à un fluorochrome)	Protocole IF 2 (Anticorps secondaire biotinylé + streptavidine- fluorochrome)	Protocole IF 3 (Anticorps Secondaire dextran polymère – HRP + SAT)
CD1a (souris)	-	-/+ (marquage de faible intensité sur peu de cellules)	+ ³
CD3 (souris)	-	-	+ ⁴
CD20 (souris)	-	+ 2	+
Vimentin (souris)	+	+ 1	+ (1/1000)
CD68 (souris)	-	-	+ ¹
CD115 (lapin)	-	-	+ 1, 2, 3, 4

Tableau IV : Marquages obtenus par les trois protocoles d'immunofluorescence et combinaisons d'anticorps envisagées dans les protocoles de marquages multiples en immunofluorescence



Figures 5 : Détection des différents marqueurs étudiés sur une membrane synoviale de patient atteint de PR par les trois protocoles d'immunofluorescence



Figures 6 : Exemples de marquages multiples obtenus sur une membrane synoviale de patient atteint de PR

nus avec le protocole d'IHC. Le SAT est ensuite ajouté et la tyramide forme alors des précipités fluorescents sous l'effet de l'HRP (Figures 5, E et F). Tous les marqueurs ont pu être mis en évidence par ce protocole. Nous avons observé l'impact du SAT sur la qualité du marquage du CD20 dont l'intensité a été augmentée (Figure 5E par rapport à 5C), ou sur la sensibilité du marquage de la vimentine dont l'anticorps primaire a été utilisé à une concentration plus faible.

L'étape suivante a combiné les anticorps primaires dans des marquages multiples décrits dans le Tableau IV. Etant donné que l'antigène CD115 est détecté sur les macrophages par un anticorps développé chez le lapin, il peut facilement être combiné avec les autres Ag détectés par des anticorps développés chez la souris, sans risque de réactivité croisée des anticorps secondaires. Ainsi des marquages doubles CD115 (rouge) / CD3 (vert) (Figure 6 A) ainsi que CD115 (rouge) / CD20 (vert) (Figure 6 B) ont été obtenus sans problème de cross-réactivité et ont permis de mettre en évidence deux populations cellulaires bien distinctes. Dans le cas du triple marquage vimentine/CD68/CD115, la combinaison de deux anticorps primaires de souris a pu être réalisée en ajoutant une étape de saturation des immunoglobulines de souris endogènes. La figure 6 C illustre le double marquage (orange) observé sur une proportion de la population macrophagique par le marquage des antigènes CD115 (rouge) et CD68 (vert).

CONCLUSIONS

Différentes populations de cellules infiltrantes ont été caractérisées dans la membrane synoviale de patients atteints de PR en combinant des anticorps, dont certains de même espèce. De plus, nous avons conservé, voire augmenté, la sensibilité du protocole d'immunofluorescence en incluant le système d'amplification à la tyramide par rapport au protocole initial. Une étude exhaustive sur les principaux antigènes détectés en pathologie de routine a montré que la plupart des anticorps ont pu être dilués de 5 à 50 fois plus avec l'utilisation du SAT [12]. D'autres études ont montré l'avantage de ce système sur des anticorps primaires ne pouvant pas être détectés par des méthodes conventionnelles [13] [14] [15]. La translation du protocole d'immunohistochimie en un protocole d'immunofluorescence par le SAT est très simple puisqu'elle n'entraîne qu'une étape supplémentaire. Il a été possible d'appliquer ce système d'amplification sur des marquages doubles, des couples d'anticorps primaires issus de la même espèce animale, par l'application d'une simple étape de saturation et par la disponibilité de différents fluorochromes (FITC, Tetramethylrhodamine, Coumarine, Cy3, Cy5, Texas Red).

En conclusion, ce système d'amplification par l'utilisation de tyramide marquée s'ajoute aux systèmes déjà existants. Il peut significativement influencer les méthodes d'immunohistochimie car c'est une technique simple, rapide, très sensible et efficace. Cette technique peut aussi devenir la méthode de choix en immunofluorescence.

BIBLIOGRAPHIE

1. IWANAGA T., SHIKICHI M., KITAMURA H., et al : Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.*, 2000, **63** (1), 17-31.
2. FITZGERALD O., BRESNIHAN B. : Synovial membrane cellularity and vascularity. *Ann. Rheum. Dis.*, 1995, **54** (6), 511-515.
3. PALMER D.G. : The anatomy of the rheumatoid lesion. *Br. Med. Bull.*, 1995, **51** (2), 286-295.
4. BOBROW M.N., HARRIS T.D., SHAUGHNESSY K.J., et al. : Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 1989, **125** (1-2), 279-285.
5. BOBROW M.N., SHAUGHNESSY K.J., LITT G.J. : Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. II. Application to membrane immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 1991, **137** (1), 103-112.
6. DE HAAS R.R., VERWOERD N.P., VAN DER CORPUT M.P., et al : The use of peroxidase-mediated deposition of biotin-tyramide in combination with time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Histochem. and Cytochem. : official J. of Histochem. Society*, 1996, **44** (10), 1091-1099.
7. KERSTENS H.M., PODDIGHE P.J., HANSELAAR A.G. : A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. *J. Histochem. Cytochem. : official J. Histochem. Society*, 1995, **43** (4), 347-352.
8. ADAMS J.C. : Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J. Histochem. and Cytochem. : official J. Histochem. Society*, 1992, **40** (10), 1457-1463.
9. BOBROW M.N., LITT G.J., SHAUGHNESSY K.J., et al. : The use of catalyzed reporter deposition as a means of signal amplification in a variety of formats. *J. of immuno. methods*, 1992, **150** (1-2), 145-149.
10. ZAITSU K., OHKURA Y.: New fluorogenic substrates for horseradish peroxidase : rapid and sensitive assays for hydrogen peroxide and the peroxidase. *Anal. Biochem.*, 1980, **109** (1), 109-113.
11. MARTOJA R. Initiation aux techniques de l'histologie animale. 1967.
12. VON WASIELEWSKI R., MENGEL M., GIGNAC S., et al. : Tyramine amplification technique in routine immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1997, **45** (11), 1455-1459.

13. HUNYADY B., KREMPELS K., HARTA G., et al. : Immunohistochemical signal amplification by catalyzed reporter deposition and its application in double immunostaining. *J. Histochem. Cytochem.*, 1996, **44** (12), 1353-1362.
14. TOTH Z.E., MEZEY E. : Simultaneous visualization of multiple antigens with tyramide signal amplification using antibodies from the same species. *J. Histochem Cytochem*, 2007, **55** (6), 545-554.
15. SHINDLER K.S., ROTH K.A. : Double immunofluorescent staining using two unconjugated primary antisera raised in the same species. *J. Histochem. Cytochem.*, 1996, **44** (11), 1331-1335.

PEUT-ON PROUVER LA SPECIFICITE D'UN MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE ?

André CALAS

*Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, IINS, Unité CNRS 5297
Université Victor Segalen
146 rue Léo Saignat
33076 BORDEAUX cedex*

RESUME

La spécificité est la caractéristique le plus fréquemment associée à l'immunohistochimie. Elle n'est cependant pas à l'abri des faux positifs qui conduisent à tenter de définir les critères d'un marquage spécifique. On distingue classiquement la spécificité de l'anticorps (reconnaît-il l'épitope contre lequel il a été, en principe, obtenu ?) et celle de la réaction : le marquage observé correspond-il à la liaison de l'anticorps avec l'antigène recherché ?

La première spécificité est généralement testée par le fournisseur mais elle doit l'être par l'expérimentateur pour tout nouvel anticorps par les moyens habituels : RIA, ELISA, immunohistochimie sur tissus où la localisation de l'antigène est connue et, si l'on en dispose, examen d'un témoin négatif sur souris KO pour l'antigène.

La spécificité de la réaction doit être vérifiée chaque fois et pour chaque tissu. Elle dépend notamment en effet du protocole

de préparation de l'échantillon biologique et singulièrement de la fixation. Celle-ci peut modifier la structure chimique de l'antigène qui n'est plus dans le tissu fixé l'antigène natif. Après avoir éliminé les réactions liées au seul marqueur (endogène comme exogène) et les liaisons électrostatiques des protéines-anticorps au tissu, il faut tenter de vérifier la spécificité de la réaction en retirant l'anticorps primaire, en utilisant un sérum pré-immun, en tentant de déplacer la liaison par des protéines plasmatiques banales voire par la protéine porteuse dans le cas d'haptènes. On doit enfin tenter de supprimer le marquage par épuisement de l'anticorps avec des concentrations croissantes d'antigène (ou mieux d'immunogène). Cependant, nous le verrons, tous ces contrôles n'éliminent pas la possibilité de réactions croisées des anticorps avec d'autres constituants tissulaires que celui recherché. Finalement les arguments les plus convaincants en faveur de la spécificité d'un marquage immunohistochimique sont sa cohérence avec, quand c'est possible, d'autres

types de marquages, comme les *Western-blots* ou l'hybridation *in situ* pour les peptides et les protéines et, bien sûr, avec les implications fonctionnelles des localisations décrites.

INTRODUCTION

Parmi les caractéristiques des réactions histo-chimiques (sensibilité, résolution, quantification...), la spécificité est celle que l'on affecte le plus volontiers aux marquages utilisant les anticorps. C'est également une des plus difficiles à démontrer et de nombreux contrôles et témoins sont nécessaires avant de pouvoir écrire que le marquage observé à l'aide d'un anticorps anti-X correspond probablement à X (1). Le but de cette mise au point est, après un rappel sur les partenaires de la réaction antigène-anticorps, de définir les différents types de spécificité puis les tests à réaliser afin de se convaincre soi-même de la validité des marquages observés puis d'en convaincre également les lecteurs de la publication et en premier lieu les referees..

La réaction antigène-anticorps

Elle met en jeu deux partenaires si étroitement dépendants que leur définition est presque tautologique :

- l'antigène (Ag) est une molécule dont un motif (séquentiel ou conformationnel dans le cas des peptides et des protéines), l'épitope, provoque la synthèse d'anticorps par l'organisme auquel il est administré, sous forme native ou lié comme haptène à une macromolécule vectrice (on parle alors d'immunogène).

- l'anticorps (Ac) est une immunoglobuline (Ig) plasmatique produite en répon-

se à l'administration de l'antigène (ou plus exactement de l'immunogène) et qui lie spécifiquement l'antigène en reconnaissant cet épitope.

Ainsi l'Ac, macromolécule dont la structure est inconnue, est identifié par sa reconnaissance de l'antigène. Réciproquement, l'antigène présent dans les préparations tissulaires ou cellulaires, généralement sur coupes fixées, n'est pas le plus souvent la molécule native ni même celle couplée au sein de l'immunogène (2, 3) et c'est la reconnaissance d'un de ses épitopes par l'anticorps qui permet de l'identifier tout en le localisant. Je dis souvent à mes étudiants que l'immunohisto-chimie (à la différence de l'hybridation *in situ*) est la recherche d'une molécule qu'on ne connaît guère à l'aide d'un réactif qu'on connaît moins encore, seul leur mariage permettant de les identifier tous les deux. On voit donc l'importance que revêtent la spécificité de la réaction Ag-Ac sur la préparation histologique et les contrôles qui permettent de l'approcher, sinon de l'assurer. Nous parlerons essentiellement ici des réactions les plus utilisées, celles d'immunohisto-chimie indirecte où le signal repérable est porté par un deuxième anticorps, dit secondaire, dirigé contre l'espèce qui a permis d'obtenir l'anticorps primaire (en fait contre le fragment Fc de ses immunoglobulines).

Les différents types de spécificité

On distingue classiquement deux types de spécificité (4) mais en fait ces deux catégories se chevauchent :

I- Spécificité de l'anticorps : Est-ce que l'anticorps anti-X reconnaît X ? (5)

Ces tests sont en principe réalisés par le fournisseur ou par celui qui a obtenu l'an-

ticorps. Mais certains seront utilement effectués par vous en cas de nouvel anticorps. Il s'agit de tests de compétition par RIA mais surtout ELISA, *dot-blot* ou encore le Biacore. Grâce aux tests ELISA ou, plus simplement, à des gels de gélatine (3), vous pouvez même évaluer la susceptibilité de la réaction aux fixateurs ou déterminer de possibles réactions croisées avec des antigènes hétérologues connus de structure voisine. Vous pouvez aussi, comme avec le Biacore, évaluer l'affinité de vos anticorps. Entrent également ici les tests de spécificité sur des tissus connus et constituant des témoins positifs ou négatifs. Parmi ces derniers, il faut mentionner les souris KO et les autres modèles d'inactivation génique pour une protéine donnée où celle-ci (et éventuellement les métabolites qui en dépendent) ne doit plus être décelable. Il faut aussi noter, pour les neuromédiateurs, les témoins négatifs issus de leur déplétion pharmacologique.

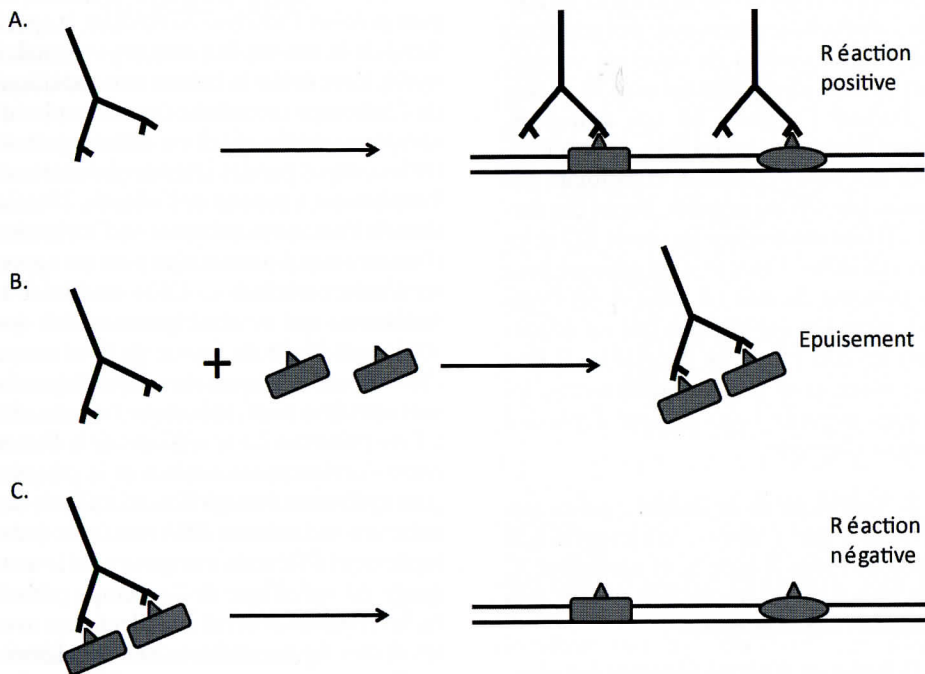
2- Spécificité de la liaison : est-ce que la réaction que j'observe correspond à la liaison de l'anti-X avec X, et seulement X, dans mon tissu ou ma cellule et dans mes conditions expérimentales ?

Il faut tout d'abord éliminer les réactions parasites dues à la présence de marqueurs déjà présents dans le tissu, fluorophores, peroxydase voire biotine endogènes notamment. La comparaison avec des préparations sans anticorps secondaire permet de les identifier et un traitement préalable des coupes par l'eau oxygénée (avec éventuellement 50% de méthanol) d'inactiver les peroxydases tissulaires (hématies...). De même dans le cas d'identification de molécules exogènes (*Green Fluorescent Protein, GFP ; Bromo deoxy-Uridine, BrdU.*) les réactions doivent bien sûr disparaître en leur absence.

Un autre paramètre à éliminer est la liaison non-spécifique de protéines au tissu. On peut la supprimer par des protéines sériques (*Bovine Serum Albumin, BSA.*) et/ou par neutralisation des charges avec un excès de lysine.

Pour les réactions d'IHC indirecte, on peut préciser l'analyse en étudiant la spécificité de la liaison de l'anticorps secondaire (6). Pour éviter la liaison non-spécifique de l'anticorps secondaire (par exemple aux récepteurs de Fc, (6), il est utile de prétraiter les coupes par des immunoglobulines de l'espèce qui a permis de l'obtenir. L'omission de l'anticorps primaire ou l'utilisation d'un sérum pré-immun (qui peuvent apporter d'autres artefacts ..., Cf 7) sont des tests minimums qui ne renseignent en fait que sur la spécificité de liaison de l'Ac secondaire. En effet les marquages qui disparaissent sont tous ceux, spécifiques ou non, dus à l'Ac primaire. La spécificité de la liaison entre l'anticorps secondaire et le primaire peut également être vérifiée en utilisant des anticorps secondaires différents (avec éventuellement différents marqueurs : si le marquage est spécifique de l'anticorps primaire, les résultats doivent être identiques avec les divers Ac secondaires mais également en fluorescence, peroxydase, PAP ..). Les contrôles de la spécificité de la liaison de l'anticorps secondaire sont particulièrement importants dans le cas des marquages multiples (6).

La réalisation de *Western-blot* sur votre tissu qui doit, dans l'idéal, ne donner qu'une seule bande est aussi très utile. La présence de plusieurs bandes (qui peuvent être dues aussi à la dégradation de la protéine) doit vous alerter sur de possibles réactions croisées. Attention aux anticorps qui vont reconnaître une protéine native ou dénaturée (selon l'immunogène utilisé) : souvent les



Figures 1 : En cas de croisement (A), l'épuisement par l'antigène (B) abolit toute réaction, spécifique ou croisée (C). Ce résultat n'est donc pas une preuve de la spécificité de la réaction immunohistochimique

Western-blots sont faits en conditions dénaturantes alors que les anticorps ont été obtenus contre une protéine native (7).

Les tests de compétition sont les plus satisfaisants : tenter de déplacer la liaison par des concentrations croissantes de protéines banales ou, en cas d'haptène, de celle ayant servi à fabriquer l'immunogène. Ces tests doivent être négatifs. Par contre la pré-incubation de l'Ac avec des concentrations croissantes d'antigène ou, pour les haptènes, d'immunogène, doivent éteindre la réaction ou la diminuer de façon proportionnelle à la concentration de la molécule en compétition (pour les haptènes, l'adsorption sera moins efficace et nécessitera une concentration dix fois supérieure à celle de l'immunogène). Ce test prouve que la molécule ajoutée s'est fixée sur les sites de liaison de l'anticorps. Il impose bien sûr de disposer de l'antigène. Si ce n'est pas le cas, il faut s'en tenir aux autres tests et notamment à ceux mentionnés ci-après. MAIS, S'IL EST REALISABLE, CE TEST, NECESSAIRE, N'EST PAS SUFFISANT ET, MEME EN CAS D'EXTINCTION, IL NE PERMET PAS D'AFFIRMER QUE VOTRE Ac NE RECONNAIT PAS, DANS VOTRE TISSU ET VOS CONDITIONS EXPERIMENTALES, UN EPITOPE PRESENT DANS D'AUTRES MOLECULES QUE CELLES QUE VOUS RECHERCHEZ (cf.8) (Figures 1).

Finalement, les meilleurs contrôles sont ceux qui recourent vos résultats par d'autres approches : utilisation d'anticorps contre d'autres parties de la molécule ou contre un précurseur, couplage de l'immunocytochimie avec l'hybridation *in situ* ou la RT-PCR sur cellule unique, analyses biochimiques (*immunoblotting*, purification et séquença-

ge des protéines). Quand il ne s'agit pas de peptide ou de protéine, comparaison avec d'autres méthodes de marquage comme, pour l'identification du phénotype chimique des neurones, l'uptake des neuromédiateurs (radioautographie). La comparaison de la distribution des marquages avec des résultats antérieurs et/ou utilisant d'autres anticorps contre la même molécule est également très utile mais pas forcément décisive...

Ainsi, à la question posée : « Peut-on prouver la spécificité d'un marquage immunohistochimique ? », la réponse est négative. On ne peut qu'approcher cette spécificité. La mise en évidence (ou la vérification) de la fonction d'une molécule identifiée à un emplacement donné (si X est là, est ce que son rôle correspond à sa localisation ?) est, *in fine*, la meilleure assurance de la validité de l'immunolocalisation.

Recommandations pour la présentation de résultats d'immunohistochimie (9)

1 - Donner l'information la plus complète possible sur l'anticorps (ou, le plus souvent, l'immun-sérum) :

- Indiquer la source de l'anticorps (Ac) :

- si commercial, nom du fournisseur, ville, n° du catalogue et, si possible, du lot (en conserver une petite fraction pour d'éventuels compléments ou contestations, aucun lot, mélange souvent de plusieurs saignées, n'étant identique à un autre).

- si donné par un collègue, numéro de code et si possible de la saignée

- Décrire l'obtention de l'Ac :

• dire mono - ou polyclonal, l'espèce immunisée et donner la structure de l'immunogène, par exemple « *peptide de synthèse comprenant les amino-acides 121-142 de la tyrosine-hydroxylase* » ou bien : « *cet Ac monoclonal de souris, donné par X, université Y, a été préparé contre la choline acétyl-transférase de placenta humain* »

- Dire comment l'Ac a été caractérisé :

S'il est dirigé contre une grosse protéine : que colore-t-il sur un gel à partir du tissu de l'espèce étudiée? Cette information est généralement donnée par le fournisseur ou par des études antérieures. On pourra écrire par exemple, « *l'Immun Serum (IS) colore une seule bande de 55 kD sur Western blot (fournisseur)* » ou bien : « *l'IS marque la forme de 150 kD mais non celles de 130 et 110 kD de la molécule sur Western-blot ; cf., Figures 1* »

- Dire « *Cet Ac a déjà été caractérisé par X et Y* » n'est pas suffisant

2 - Indiquer les contrôles réalisés pour assurer (ou pour approcher) la spécificité du marquage, sachant qu'aucun contrôle ne permet d'éliminer la possibilité d'une réaction croisée avec un épitope commun à la molécule que vous recherchez et à une autre. Celle-ci peut être voisine (même famille) ou éloignée et l'épitope commun aura pu être créé par les traitements histologiques et notamment la fixation.

L'Editeur de JCN (9) donne une série de phrases-types de valeur variable, les deux dernières étant les plus faibles, concernant les contrôles de spécificité effectués :

- *On n'observe pas de marquage si l'Ac est utilisé sur un tissu de souris KO pour la*

protéine (peut concerner la protéine étudiée ou des molécules métaboliquement en aval). Ce test est généralement réalisé, s'il est possible, par le fabricant de l'anticorps, cf. plus haut, spécificité de l'anticorps

- *Pas de marquage quand 1ml de l'Ac primaire dilué a été préincubé avec X micro ou nanogrammes du peptide d'immunisation* (cf plus bas, protocoles pour l'épuisement)

- *La réaction Immunocytochimique pour ce peptide ou cette protéine est colocalisée avec l'hybridation in situ de son ARNm*

- *Cet Ac, dirigé contre les 13 amino-acides N-terminaux de la protéine, donne la même distribution du marquage qu'un autre Ac contre le fragment C-terminal de la protéine* (cf. X et Y, 2003)

- *La distribution du marquage de la Tyrosine Hydroxylase (TH) dans le Tronc Cérébral est identique à celle déjà décrite à ce niveau* (X et Y, 1998)

- *L'Ac anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) marque seulement des cellules qui présentent la morphologie classique des astrocytes fibreux* (Figure 2 ; X et Y, 1993)

Deux ou trois de ces assertions peuvent suffire et figurer dans un tableau. L'essentiel est, comme d'habitude, que votre manip et vos résultats puissent être reproduits par d'autres chercheurs. Il faut rappeler à nouveau que l'omission de l'Ac primaire ne renseigne que sur la spécificité du secondaire.

Epuisement d'un immun-sérum : qu'est ce qu'un « excès » d'antigène ?

Cf (10) (1) et Y. Tillet, com. Pers. (2)

Deux façons simples de définir ce qu'est un antigène en excès pour préadsorber un anticorps :

1 - Diluer l'anticorps de 10 en 10 jusqu'au point où la réaction sur les sites d'intérêt est à peine perceptible. Doubler cette concentration. On a alors une dilution pour laquelle une réduction de 50% ou davantage de la disponibilité en anticorps éliminera presque totalement le marquage. L'addition d'une plus grande quantité d'Antigène (cf plus bas) doit bloquer la réaction sur le tissu et dans les conditions observées.

2 - Considérant que les immunoglobulines G (IgG) ont une masse moléculaire approximative de 150.000 et que leur concentration dans le sérum d'un animal immunisé est de l'ordre de 10 mg/ml soit $[IgG] = 10^{-2} / 1,5 \cdot 10^5 = 0,66 \cdot 10^{-7}$ mole/ml

- comme les Ac sont bivalents, il faudra deux fois plus d'Ag pour les neutraliser soit : $1,32 \cdot 10^{-7}$ mole

- pour un peptide de 10 résidus acides aminés, la masse moléculaire est de l'ordre de 1000 (10 fois 100), la quantité d'antigène nécessaire pour saturer 1 ml d'immun sérum pur est donc de :

$1000 \times 1,32 \cdot 10^{-7} = 1,32 \cdot 10^{-4}$ g soit 132 µg/ml d'immun sérum pur.

- pour 1ml de sérum dilué au 1/1000, cela fait rajouter 132 ng

A partir de cette valeur toute théorique (et déjà en excès puisque dans les 10 mg d'IgG sériques il y a seulement 1% de celles d'intérêt) il faut faire quelques points de dilution, 10 à 1000 fois plus et 10 à 100 fois moins par exemple, qui doivent encadrer la quantité réellement inhibitrice. Etant donné que la saturation des anticorps se fait surtout par déplacement (on sature le sérum avant

de le mettre sur la coupe) le succès de l'inhibition dépend de l'affinité des anticorps pour l'antigène.

Avec cette méthode de calcul, qui n'est en toute rigueur valable que pour des anticorps monoclonaux mais qui donne d'utiles ordres de grandeur, la quantité d'antigène à rajouter est bien sûr très liée à sa masse moléculaire.

NB : 1) Il n'est pas indispensable d'éteindre totalement la réaction. Une diminution proportionnelle à la quantité d'antigène ajouté est le plus souvent suffisante.

2) Il est fréquent de traiter l'antisérum ou l'anticorps primaire par un trop grand excès d'antigène (de l'ordre du mg /ml) et d'inhiber ainsi par les impuretés présentes dans la préparation antigénique les anticorps développés contre ces impuretés. Il est donc important de faire des gammes de concentrations d'antigène (7).

3) Les tests d'épuisement par tous les antigènes détectés sont particulièrement importants en cas de leur colocalisation dans la même structure.

4) Dans l'idéal il faudrait au préalable épuiser l'anticorps avec tous les antigènes parasites susceptibles d'être présents dans la coupe (11) (c'est parfois possible pour des antigènes hétérologues de structure voisine comme l'ocytocine et la vasopressine, cf 12) mais cela suppose le problème résolu et l'on retrouve ici l'obstacle fondamental de la définition tautologique des antigènes et des anticorps.

BIBLIOGRAPHIE

1. PRADIDARCHEEP W., LABRUYERE W.T., DABHOIWALA N.F. & LAMERS W.H. Lack of specificity of commercially available antisera: better specifications needed. *J. Histochem. Cytochem.*, 2008, **56** (12), 1099-1111
2. BURRY R. W. Specificity controls for immunocytochemical methods, *J. Histochem. Cytochem.*, 2000, **48**, 163-166
3. SCHIPPER J. & TILDERS F.J.H. A new technique for studying specificity of immunocytochemical procedures: specificity of serotonin immunostaining. *J. Histochem. Cytochem.*, 1983, **31** (1), 12-18
4. PETRUSZ P., SAR M., ORDONNEAU P. & DIMEO P. Specificity in immunocytochemical staining. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976, **24**, 1110-1112
5. ADLE-BIASSETTE H., GRASSI J., VERNEY C., WALKER F., CHOU-DAT L. & HENIN D. Les contrôles nécessaires en immunohistochimie: de la recherche au diagnostic. Comment valider un anticorps ? *Ann. Path.*, 2007, **27** (1), 16-26
6. BURRY R. W. Controls for immunocytochemistry. An update, *J. Histochem. Cytochem.*, 2011, **59**, 6-12
7. GARAUD J. C. et ROUSSEL Y. Immunohistochimie en microscopie photonique et électronique. Théorie et pratique. 2007,
http://myrte.u-strasbg.fr/IHC/IHC_manuel/IHC.pdf
8. HOLMSETH S., LEHRE K.P. & DAN-BOLT N.C. Specificity controls for immunocytochemistry. *Anat. Embryol.*, 2006, **211** (4), 257-266
9. SAPER C.B. An open letter to our readers on the use of antibodies. *J. Comp. Neurol.*, 2005, **493**, 477-478
10. SAPER C.B. & SAWCHENKO P.E. Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol.*, 2003, **465**, 161-163
11. SWAAB D.F., POOL C.W. & VAN LEEUWEN F.W. Can specificity ever be proved in immunocytochemical staining? *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, **25** (5), 388-391
12. VAN LEEUWEN F. Pitfalls in immunocytochemistry with special reference to the specificity problem in the localization of neuropeptides *Am. J. Anat.*, 1986, **175**, 363-377

REMERCIEMENTS :

Je remercie vivement Yves Tillet et Philippe Ciofi pour leur relecture du manuscrit ainsi que Cedric Peirs pour son illustration.

LA TOMOGRAPHIE ELECTRONIQUE

*Thomas BOUDIER

*thomas.boudier@sny.jussieu.fr

Université Pierre et Marie Curie, IFR 83 Biologie Intégrative,
Bat B 7^e étage, 9 quai St Bernard, 75 252 Paris Cedex 05

RESUME

La tomographie électronique permet l'obtention de volumes tri-dimensionnels (3D) à l'échelle ultra-structurale. Cette technique se base sur l'obtention d'une série d'images tiltées en microscopie électronique à transmission. Nous présentons dans cet article le principe général de la tomographie, ainsi que les étapes de préparation, d'acquisition et de reconstruction du volume. Des exemples d'applications seront ensuite présentés.

INTRODUCTION

La microscopie électronique à transmission (MET) est la technique de choix pour visualiser l'ultra-structure cellulaire. Cependant de nombreuses structures cellulaires, comme l'appareil de Golgi ou les mitochondries présentent une forme complexe qui ne peut être appréhendée en une fois, sur une seule image. Seule la combinaison de plusieurs vues, dans différentes directions ou en profondeur, peut reconstruire la véritable géométrie de ces struc-

tures. Il faut donc soit passer par l'observation de multiples structures et intégrer les informations, ou obtenir en une seule fois la géométrie 3D. Pour obtenir un volume tri-dimensionnel à l'échelle ultra-structurale, on peut recourir à la technique des coupes sériées, mais la mise en pratique de cette technique peut s'avérer très délicate. Une autre technique appelée tomographie électronique, appelée aussi tomographie cellulaire, permet d'obtenir un volume tridimensionnel d'un échantillon en microscopie électronique (1-2). Nous allons donc détailler cette technique, en expliquant son principe général, la préparation des échantillons, l'acquisition des images ainsi que la reconstruction du volume.

PRINCIPE GENERAL

Le principe de la tomographie se base sur la collection d'images de projection d'un échantillon selon différentes orientations. Une image de projection contient en effet l'information 3D du volume projetée, c'est à dire sommée, sur l'image 2D. En faisant

varier l'angle sous lequel on projette cette information 3D on obtient différentes vues de cette information 3D, et si le nombre de vues est suffisant on peut retrouver l'information 3D du volume initial grâce à l'ensemble des projections.

Dans le cas de la tomographie à rayons X (CT-SCAN) ou de la micro-tomographie (μ CT), les images de projection sont obtenues grâce à l'utilisation de rayons X, et les différentes orientations sont obtenues en faisant tourner l'émetteur et le détecteur autour du patient. Dans le cas de la tomographie électronique, c'est l'échantillon qui tourne sous le faisceau d'électrons grâce à une platine goniométrique qui va faire « tilter » la grille sur laquelle repose l'échantillon.

PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons destinés à être observés en tomographie électronique, subissent les mêmes étapes de préparation que pour la microscopie électronique à transmission classique, à savoir fixation, déshydratation et inclusion dans une résine (3). La fixation peut-être chimique ou physique (fixation haute-pression suivie de cryo-substitution). En vue d'une visualisation 3D, des coupes épaisses sont à préférer, de l'ordre de 200 à 500 nm, bien sûr, cela nécessite alors l'utilisation de microscope à des voltages de 120 keV à 200 keV, voire 300 keV. Dans le cas de cryo-fixation suivie de cryo-coupes on parle alors de cryotomographie (4-5). La grille va être inclinée sous le faisceau et donc la probabilité d'observer un barreau augmentera. Afin de minimiser les problèmes d'occlusion, des grilles sans barreaux ou avec de larges trous sont à favoriser (100-200 mesh). En ce qui concerne la

coloration elle est en général plus légère qu'en transmission classique, le contraste étant augmenté par le nombre important d'images acquises (6).

ACQUISITION

Avant de procéder à l'acquisition des images de projections, il faut s'assurer que l'eucentricité du microscope est bien réglé afin d'éviter des problèmes de déplacement trop important lors du tilt de la grille. L'axe de rotation de la platine goniométrique doit donc se trouver au niveau de l'échantillon à observer. La qualité finale du volume reconstruit dépend de 2 paramètres importants, le nombre de projections et l'intervalle des angles d'acquisitions. Pour une acquisition CT-SCAN l'intervalle d'acquisition est de 180° et donc la reconstruction est quasiment parfaite. Dans le cas de la tomographie électronique, il n'est pas possible d'obtenir un tel intervalle d'acquisition, car non seulement le porte objet ne peut s'incliner à 90° , mais aussi parce que l'épaisseur d'observation augmente en rapport inverse du cosinus de l'angle, ainsi il y a une épaisseur d'échantillon deux fois plus importante à traverser à 60° qu'à 0° . De façon classique l'intervalle d'acquisition parcourt l'intervalle $[-60^\circ, +60^\circ]$, éventuellement $\pm 70^\circ$. L'acquisition des images de projection s'effectue ordinairement tous les 1° à 2° , mais peuvent s'effectuer de manière non uniforme de sorte à favoriser un nombre plus important d'images à forts angles où l'information varie plus, c'est le schéma dit de Saxton.

Lorsque la platine tilte la grille, s'ensuit un déplacement et un changement de focus de la zone observée. Il faut donc se déplacer légèrement afin de se repositionner sur la région d'intérêt. Le changement de focus est en général moins important et ne

nécessite pas un réglage systématique. Ces ajustements de position et de focus peuvent se faire manuellement, mais cela rend la tâche fastidieuse et augmente considérablement l'irradiation subie par l'échantillon. Ces procédures peuvent s'automatiser en faisant appel à différentes techniques de traitement du signal comme la fonction de corrélation. Cette fonction permet de calculer le meilleur déplacement afin de maximiser la ressemblance entre deux images. Pour chaque déplacement possible de l'image à l'angle $n+1$, on calcule son degré de ressemblance avec l'image de projection à l'angle n . Le déplacement qui maximise la ressemblance entre l'image $n+1$ et l'image n est appliqué à l'image $n+1$. Pour le focus un processus similaire est appliqué. Ces calculs de corrélations sont très rapides ce qui permet, suivant le nombre d'images acquises, d'acquérir une série de projections entre une et deux heures. L'acquisition d'une série tiltée peut représenter plus d'une centaine d'images, chaque image pouvant faire plusieurs méga octets, une série peut donc représenter entre un et deux giga-octets de données.

Le fait que l'intervalle d'acquisition ne couvre pas l'ensemble des orientations de -90° à $+90^\circ$ peut entraîner l'apparition d'artéfacts dans le volume reconstruit, sous la forme d'ombres perpendiculairement à l'axe de rotation. Afin d'augmenter le nombre d'orientations et ainsi de parfaire la reconstruction, on fait appel à la technique dite du double axe (7). Cette technique consiste simplement à effectuer une série perpendiculairement à la première en tournant la grille de 90° . Ceci doublera le nombre de projections acquises et fera disparaître l'effet d'ombre. Cette rotation de la grille suppose soit l'utilisation d'un porte objet rotatif ou double-tilt, soit le fait de pouvoir retrouver la région d'intérêt après avoir tourner manuellement la grille.

RECONSTRUCTION

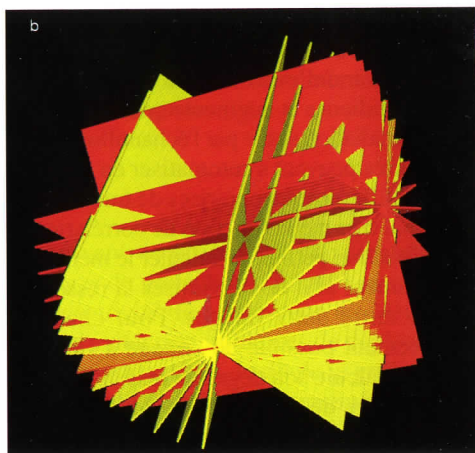
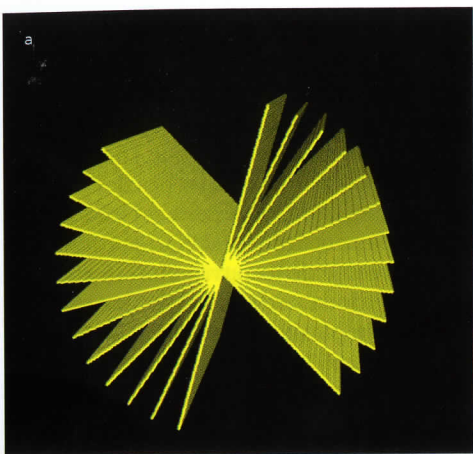
Si l'on revient à la définition, la tomographie est une technique non invasive, l'échantillon 3D observé n'est pas détruit, mais les données brutes que l'on récupère après l'acquisition ne sont pas des données directement 3D, elles portent l'information 3D. L'étape de reconstruction tomographique va permettre de recouvrir l'information 3D à partir de la série tiltée des projections. Pour cela plusieurs méthodes sont à notre disposition.

Le théorème section centrale

La première méthode de reconstruction se base directement sur le fondement théorique de la tomographie, à savoir que si l'on se place dans l'espace de Fourier (espace des fréquences) la projection se positionne dans un espace 3D dans l'orientation qui lui correspond. Ainsi la série des projections à différents angles remplit cet espace 3D, sauf dans un cylindre à base triangulaire correspondant aux grands angles (Figure 1a). Après une acquisition double-axe, l'espace vide est réduit à une pyramide (Figure 1b). Après remplissage de cet espace de Fourier 3D on repasse dans « le monde réel » pour obtenir le volume 3D reconstruit de notre échantillon. Cette méthode souffre d'un certain nombre de problèmes notamment du fait que l'espace 3D n'est pas uniformément rempli.

Rétro-projections

Une autre approche de reconstruction se base sur l'idée de projection - mathématiquement une projection est une somme – et opère donc dans l'espace de l'image, et non dans l'espace de Fourier. Considérant une projection et son angle d'acquisition, en projetant à « l'envers » on peut dire que suivant tel ou tel rayon de projection la somme des valeurs doit être égale à celle corres-



Figures 1 : (a) Illustration de l'information des angles de projections, chaque plan représente une projection placée dans l'espace des orientations. Il y a plus d'informations au centre qu'à la périphérie. Il n'y a pas d'information aux grands angles (b) Illustration du concept de « double-axe », au niveau des orientations. Cela correspond à deux séries simple axes qui se croisent perpendiculairement. L'information manquante est donc réduite



Figure 2 : Sections virtuelles extraites de la reconstruction tomographique d'une synapse. Un corps multivésiculaire et une vésicule synaptique sont observés. La synapse provient d'une culture de tranche de tissu nerveux de rongeur immobilisée par congélation sous haute pression. Barre d'échelle : 100 nm. (© S. Marty et L. Siksou, ENS)



Figure 3 : Modèle reconstruit d'un mélanosome, chaque structure a été modélisée sur chaque plan du tomogramme et un rendu surfacique a été produit (en rouge la membrane du mélanosome, en noir la mélanine, en jaune des vésicules internes, et en vert des structures cellulaires associées). En fond apparaît une coupe du tomogramme. (© Hurbain et al I. Curie. © 2008 National Academy of Sciences, U.S.A.)

pondante dans l'image. En combinant toutes les rétro-projections, on peut reconstruire le volume de départ. Afin d'augmenter le contraste de la reconstruction on applique généralement un filtre de pondération sur l'image avant reconstruction, on parle alors de rétro-projections pondérées (Weighted Back Projection en anglais, ou WBP).

Algorithmes itératifs

Les algorithmes précédents sont assez efficaces, notamment la WBP, cependant dans certains cas où l'acquisition double-axe n'a pas été possible ou si les données sont très bruitées, on a recours à des algorithmes dit itératifs. L'algorithme ART (Algebraic Reconstruction Technique) consiste à comparer les projections expérimentales et les projections théoriques obtenues à partir du volume reconstruit. Plus le volume reconstruit est proche de l'original plus ses projections seront proches des projections obtenues à l'acquisition. Afin de minimiser la différence entre le volume reconstruit et le volume réel on va minimiser les différences entre projections expérimentales et projections théoriques en rétro-projetant la différence entre les projections expérimentales et théoriques. Ce processus est itératif, à chaque étape on choisit un angle de projection, on calcule la différence entre expérimentale et théorique, on la rétro-projette, le volume est modifié, ce processus est répété jusqu'à ce que la différence entre les projections soit très faible. L'algorithme SIRT (Simultaneous Iterative Reconstruction Technique) est basé sur la même idée, le choix des angles ne se fait pas exactement de la même manière.

APPLICATIONS

Depuis son développement et sa généralisation, la tomographie électronique a été appliquée à de nombreux domaines et de

nombreux logiciels ont été développés pour l'acquisition et la reconstruction (8-10). Les applications de la tomographie électronique en biologie sont très diverses, elles vont du cytosquelette (11-12) à la visualisation de complexes macro-moléculaires (13) en passant par divers organites comme la mitochondrie (14), les structures impliquées dans la biogenèse de la mélanine, les mélanosomes (15) ou les structures synaptiques (16-17).

La Figure 2 représente trois coupes virtuelles consécutives dans le tomogramme reconstruit d'une synapse. Etant donné que la taille z est égal par reconstruction à la taille x - y , suivant le grandissement choisi on peut donc obtenir des coupes virtuelles de l'ordre du nanomètre ou inférieure, ce qui permet d'avoir une résolution vraiment ultra-structurale dans les 3 directions, et d'observer par exemple le changement de conformation d'un corps multivésiculaire.

Afin de mieux visualiser les structures d'intérêt après reconstruction, celles-ci sont modélisées en traçant leur contour dans chacun des plans, puis un rendu surfacique est effectué (Figure 3). La Figure 3 représente un mélanosome avec la mélanine à l'intérieur ainsi que quelques vésicules et organites associés.

CONCLUSION

La tomographie électronique est une technique puissante qui permet d'accéder à la structure tridimensionnelle cellulaire. Grâce au progrès de l'informatique et des logiciels d'acquisition et de reconstruction dédiés, elle est de plus en plus accessible à l'ensemble des biologistes, et pour cela est en passe de devenir la technique incontournable en biologie cellulaire au niveau ultra-structural.

BIBLIOGRAPHIE

1. MARCO S., BOUDIER T., MESSAOUDI C. et RIGAUD, J.-L. : Electron tomography of biological samples. *Biochemistry*, 2004, **69**, 1219-25.
2. BEN-HARUSH K., MAIMON T., PATLA I., VILLA E. et MEDALIA O. : Visualizing cellular processes at the molecular level by cryo-electron tomography. *J. Cell. Sci.*, 2010, **123**(1): 7-1
3. HAYAT M. A... Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications, third edition. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1989.
4. JENSEN G. J. & BRIEGEL, A. (2007). How electron cryotomography is opening a new window onto prokaryotic ultrastructure. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2007, **17**: 260-7.
5. BOUCHET-MARQUIS C. & HOENGER A. : Cryo-electron tomography on vitrified sections: a critical analysis of benefits and limitations for structural cell biology. *Micron*, 2011, **42**(2):152-62.
6. VAN DRIEL L. F., KNOOPS K., KOSTER A. J., et VALENTIJN J. A. : Fluorescent labelling of resin-embedded sections for correlative electron microscopy using tomography-based contrast enhancement. *J Struct. Biol.*, 2007, **161**(3) : 372-83.
7. MASTRONARDE D. N. : Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *J. Struct. Biol.*, 1997, **120** : 343-352.
8. KREMER J. R., MASTRONARDE, D. N. et MCINTOSH, J. R. : Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct. Biol.*, 1996, **116** : 71-76.
9. NICKELL S., FÖRSTER F., LINAROUNDIS A., NET W. D., BECK F., HEGERL R., BAUMEISTER W. et PLITZKO J. M. : TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. *J Struct. Biol.*, 2005, **149** : 227-234.
10. MESSAOUDI C., BOUDIER T., SANCHEZ SORZANO C. O. et MARCO S. : TomoJ : tomography software for three-dimensional reconstruction in transmission electron microscopy. *BMC Bioinformatics*, 2007, **8** : 288.
11. ELAD N., ABRAMOVITCH S., SABANAY H. et MEDALIA, O. : Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography, *J Cell. Sci.*, 2011, **124** : 207-15.
12. OTEGUI, M. S. : Electron tomography and immunogold labelling as tools to analyse de novo assembly of plant cell walls. *Methods Mol. Biol.*, 2011, **715** : 123-40.

13. BECK M., TOPF M., FRAZIER Z., TJONG H., XU M., ZHANG S. et ALBER F. Exploring the Spatial and Temporal Organization of a Cell's Proteome. *J Struct. Biol.*, 2010, **173** (3) : 483-496.
14. PERKINS G. A., TJONG J., BROWN J. M., POQUIZ P. H., SCOTT R. T., KOLSON D. R., ELLISMAN M. H. et SPIROU G. A. : The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J Neurosci.*, 2010, **30** : 1015-1026.
15. HURBAIN I., GEERTS W. J. C., BOUDIER T., MARCO S., VERKLEIJ A. J., MARKS M. S. et RAPOSO, G. : Electron tomography of early melanosomes : implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. *PNAS*, 2008, **105**: 19726-31.
16. ROSTAING P., REAL E., SIKSOU L., LECHAIRE J.-P., BOUDIER T., BOECKERS T. M., GERTLER F., GUNDELFINGER E. D., TRILLER A. et MARTY S. : Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *Eur. J Neurosci.*, 2006, **24** : 3463-74.
17. SIKSOU L., ROSTAING P., LECHAIRE J.-P., BOUDIER T., OHTSUKA T., FEJTOVÁ A., KAO H.-T., GREENGARD P., GUNDELFINGER E. D., TRILLER A. et MARTY S. : Three-dimensional architecture of presynaptic terminal cytomatrix. *J Neurosci.*, 2007, **27** : 6868-77.