Journée à thème AFH 2014 :

La congélation des tissus

Les cryocoupes

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La fixation : Pourquoi?

- ✓ **Maintenir l'architecture des tissus dans un état proche de l'*ante mortem***
- ✓ **Eviter la dégradation et la putréfaction des tissus par l'autolyse enzymatique**
- ✓ **Immobiliser les molécules *in situ* en particuliers les épitopes antigéniques**

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La fixation : Laquelle?

Nature chimique des molécules à détecter :

- **Glucides**
- **Lipides**
- **Protéines**
- **Acides nucléiques …**

Physique

- Froid (congélation)
- Chaleur

Chimique

Coagulants ou précipitants :

- Alcools
- Cétones
- Acide picrique
- Acide acétique

Pontants :

- Formaldéhyde
- Glutaraldéhyde

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La fixation : Physique par la congélation immédiate

Avantages

- ✓ **Bonne préservation des acides nucléiques**
- ✓ **Bonne préservation de l'antigènicité**
- ✓ **Rapidité**

Inconvénients

- ✓ **Perte importante d'information morphologique**
- ✓ **Détection antigènique délicate**

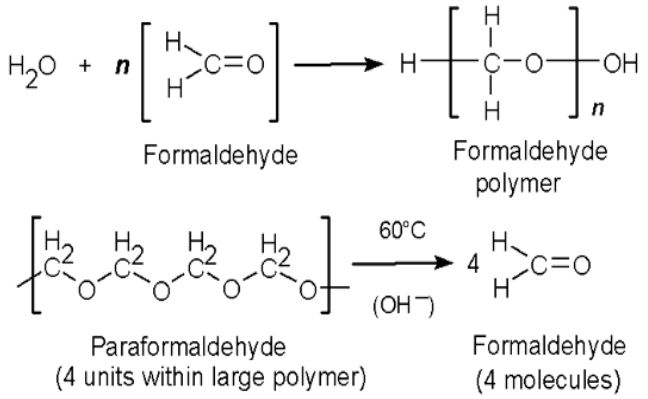
1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La fixation : Chimique par le formaldéhyde

Paraformaldéhyde

Formaldéhyde

Formol



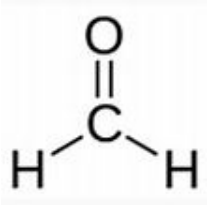
Formol = solution saturée de formaldéhyde (40% /vol)
Formol 10% = Formaldéhyde 4%

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

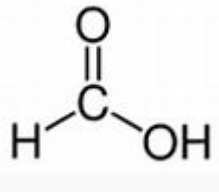
La fixation : Chimique par le formaldéhyde

- ✓ **Généralement préparée à 4%**
- ✓ **Préparée au moment de l'emploi**
- ✓ **Solution tamponnée**
- ✓ **Stockée en flacon étanche**
- ✓ **A t°C Ab**
- ✓ **A utiliser rapidement**

Formaldéhyde (méthanal)



Acide formique (acide méthanoïque)



La solution de formaldéhyde est oxydée par le dioxygène de l'air pour former de l'acide formique ou acide méthanoïque → **acidification de la solution**

Avec le temps, la solution de formaldéhyde se polymérise de façon spontanée à nouveau → **perte du pouvoir fixant**

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La fixation : Chimique par le formaldéhyde

Immersion

- ✓ Volume = au moins 10 à 20 fois celui de l'échantillon
- ✓ t / consistance et épaisseur de l'échantillon : de quelques min pour cellules isolées à plusieurs jours pour un organe entier)
- ✓ À 4°c pour éviter autolyse sous agitation modérée

Perfusion intracardiaque

- ✓ Formaldéhyde (microscopie photonique)
- ✓ +/- glutaraldéhyde (microscopie électronique)
- ✓ Excellente pénétration du fixateur au cœur des tissus (via vaisseaux et capillaires)
- ✓ Méthode de choix pour le système nerveux central (cerveau et moelle épinière)
- ✓ Nécessite souvent une post fixation
- ✓ Attention à la sur fixation

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La fixation : Chimique par le formaldéhyde

Avantages

- ✓ **Bonne architecture**
- ✓ **Bonne accessibilité des antigènes**
- ✓ **Permet une dissection fine en évitant l'autolyse**
- ✓ **Autorise la réalisation de coupes flottantes**
- ✓ **Bonne conservation des tissus**
- ✓ **Pénétration rapide des tissus**
- ✓ **Fixation lente**

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La fixation : Chimique par le formaldéhyde

Inconvénients

- ✓ **Modification chimique des antigènes → réduction de l'affinité des anticorps**
- ✓ **Modification des charges du tissus → répulsion des anticorps**
- ✓ **Réticulation du tissus → mauvaise diffusion des réactifs dans le tissu → perte de sensibilité**
- ✓ **Formation de molécules auto fluorescentes**
- ✓ **Risque de sur fixation**
- ✓ **Nécessite une étape de cryoprotection → plus lent**
- ✓ **Toxicité importante pour le manipulateur**

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La cryoprotection : Principe

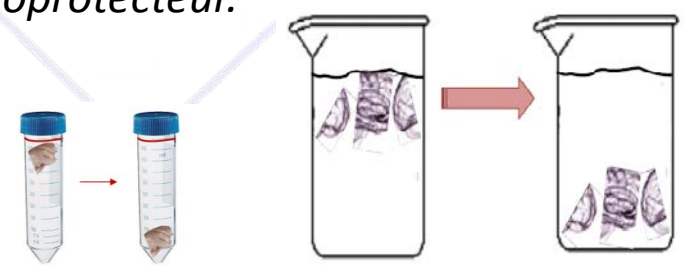
- ✓ Indispensable après une fixation chimique
- ✓ Imprégnation des tissus par une solution de saccharose en tampon
- ✓ Molarité comprise entre l'iso-osmolarité (13,4%) ou hyper-osmolarité (jusqu'à 50%)
- ✓ Un ou plusieurs bains de gradient progressif de sucrose permettent une bonne imprégnation du tissu, possibilité de perfusion également
- ✓ La chute du tissu au fond du contenant est la confirmation de l'imprégnation du prélèvement
- ✓ Empêche ou retarde l'apparition des cristaux de glace lors de la congélation

1. La préparation des tissus destinés à être congelés :

La cryoprotection : Exemple d'application

L'embryon *: constitué de plus de* ***90% d'eau****, Il est donc nécessaire d'éviter la formation de cristaux de glace qui par augmentation de volume déchireraient les membranes cellulaires lors de la congélation. On* ***élimine*** *donc l'eau en la remplaçant par un* ***cryoprotecteur****, véritable "antigel" cellulaire.*

L'embryon est plongé dans des bains successifs contenant le cryoprotecteur et du sucrose à des concentrations croissantes. Le sucrose rend le milieu hypertonique par rapport à l'embryon, ce qui entraîne la sortie de l'eau et la rentrée du cryoprotecteur.

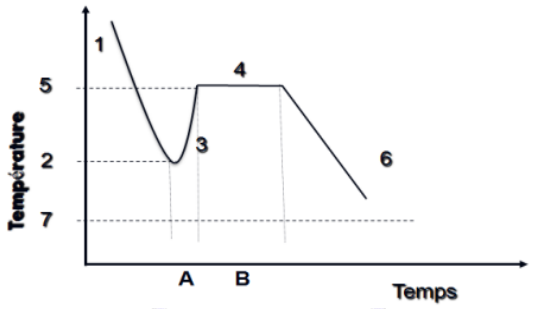


- ✓ **4°C**
- ✓ **Sans agitation**

2. La congélation des tissus :

Le phénomène de congélation :

La congélation est un changement de phase induit par un apport de froid. Pour les tissus animaux ou végétaux, elle ne concerne que l'eau et les solutés qu'elle contient.



Le cas de la congélation de l'eau pure:

- ✓ La température descend
- ✓ Au pic de surfusion (2) apparait le premier cristal de glace = nucléation
- ✓ Remontée en température puis stabilisation = les cristaux augmentent de taille
- ✓ Mais ne se multiplient plus
- ✓ Redescente en température lorsque toute l'eau est transformée en glace

La congélation doit être la plus rapide possible pour ne pas laisser le temps aux cristaux de glace de se former et/ou de grandir

2. La congélation des tissus :

Le phénomène de congélation :

Avec une vitesse de congélation rapide, obtention de cristaux de glace dits cubiques, moins volumineux → minimise les conséquences mécaniques de dilation sur les tissus

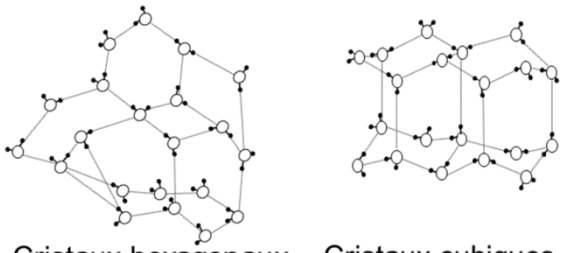
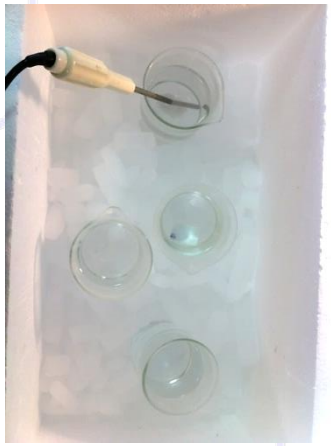


Figure 2 : Etat cristallin des molécules d'eau. Après une congélation lente les cristaux de glace formés sont des cristaux hexagonaux. A vitesse rapide les cristaux formés sont cubiques.

La formation de microcristaux peut avoir un effet bénéfique sur l'immuno-réaction en facilitant la diffusion des réactifs dans l'épaisseur des tissus et des coupes.

2. La congélation des tissus :

Les techniques de congélation :



- ✓ Directement dans le cryostat
- ✓ Dans l'azote
- ✓ Dans un bain d'isopentane refroidi (Lit de carboglace ou Snapfrost)
- ✓ Congélation sous haute pression

2. La congélation des tissus :

La conservation des tissus :

L'état obtenu n'est pas stable et il y a des remaniements dans le temps en fonction de la température → Croissance des cristaux de glace

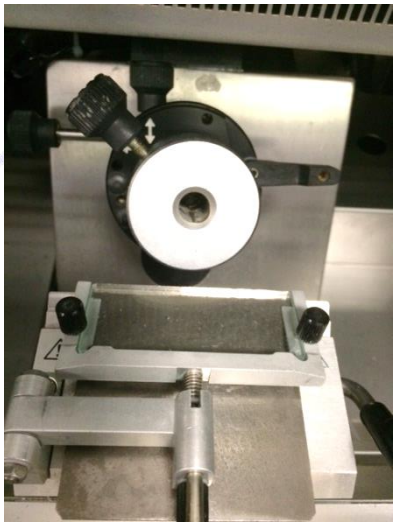
- ✓ En dessous de -100°C stabilité de la glace
- ✓ Remaniement plus lent à -80°c qu'à -20°c…

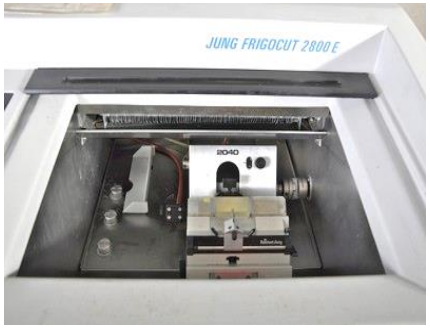
Conservation à -20°C de courte durée (qq jours)
Conservation à -80°C pendant plusieurs mois

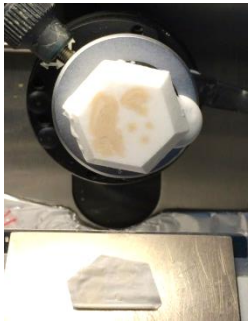
- ✓ Protéger le tissu de la dessiccation (aluminium, enrobage)
- ✓ Suremballage pour le stockage à long terme
- ✓ Éviter les variations de température, génèrent les cristaux de glace

3. La découpe des tissus congelés :

Le cryostat







3. La découpe des tissus congelés :

Maîtriser les paramètres de coupe

Température

plus ou moins -20°C?

Epaisseur

De 4 à 300 µm

Angle de coupe

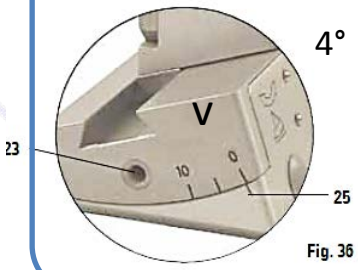


Fig. 36

La plaque anti-roll

La coupe s'enroule au dessus de la plaque anti-roll

La coupe se déchire, et après la découpe le tissu bloque sur la plaque anti-roll

La coupe est parfaitement guidée et par la plaque anti-roll et glisse sur la platine

EN RÈGLE GÉNÉRALE, nous recommandons de préajuster le système anti-roll avec une épaisseur de coupe élevée (par ex. 10 µm). – À partir de là, descendez progressivement à l'épaisseur de coupe souhaitée tout en ajustant chaque fois très légèrement le système anti-roll avec l'écrou moleté, selon la description ci-dessus.

3. La découpe des tissus congelés :

Alternatives

La technique du pinceau

La coupe est guidée par l'utilisateur avec un pinceau

Les coupes flottantes

La coupe est récupérée directement en tampon

La technique de « transfert de coupe »

- ✓ Un adhésif est placé sur la surface du bloc
- ✓ La coupe est réalisée (2µm)
- ✓ La coupe est facilement transférée sur la lame grâce à l'adhésif

3. La découpe des tissus congelés :

Applications

- ✓ Etudes morphométriques, colorations
- ✓ Immunomarquages
- ✓ Mise en évidence des lipides
- ✓ Etudes histoenzymologiques
- ✓ Hybridation in situ
- ✓ Microdissection laser
- ✓ Etudes biochimiques (westerns blot, …)
- ✓ Biologie moléculaire (PCR)

3. La découpe des tissus congelés :

Conservation des coupes

Sur lame

- ✓ A -80°c
- ✓ Protégées de la condensation
- ✓ Dans des boites étanches
- ✓ Pas de re-congélation possible

Flottantes (tissu fixé)

- ✓ Dans du PBS azide de sodium 0,2% à 4°C

  → quelques mois
- ✓ Dans une solution de cryoprotection à -20°C

  → plusieurs années

3. La découpe des tissus congelés :

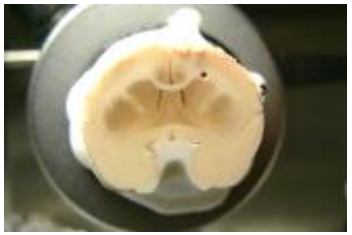
Les tissus particuliers

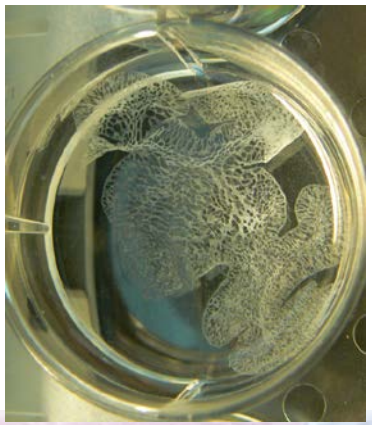
Tissu	Composition	Particularité		
Tissus adipeux	Riche en lipide	Température basse	Epaisseur fine	Plus facile a couper avec un autre organe
Os	Calcifié	Fixation	Décalcification	Cryoprotection
Œil	Humeur vitrée 98-99% eau	Cornée percée Cristallin?	Fixation	Cryoprotection
Poumon	Emplis d'air Bronches et bronchioles serrées	Fixation par insufflation de formol dans le poumon		Congélation en tissus frais → insufflation d'OCT tiédie
Tissus embryonnaires	Riche en eau	Cryoprotection +++, en plusieurs gradients		Congélation très rapide

3. La découpe des tissus congelés :

Les artéfacts : de congélation

- ✓ Fissures
- ✓ Trous
- ✓ Mauvaise cryoprotection
- ✓ Congélation trop lente / courte
- ✓ Dessèchement du tissu

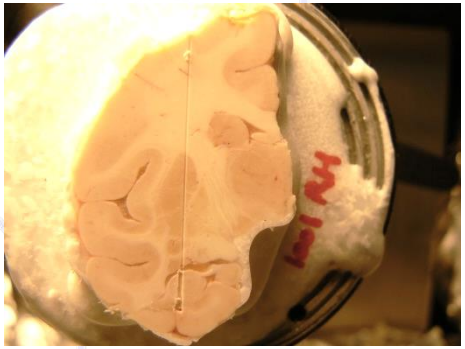


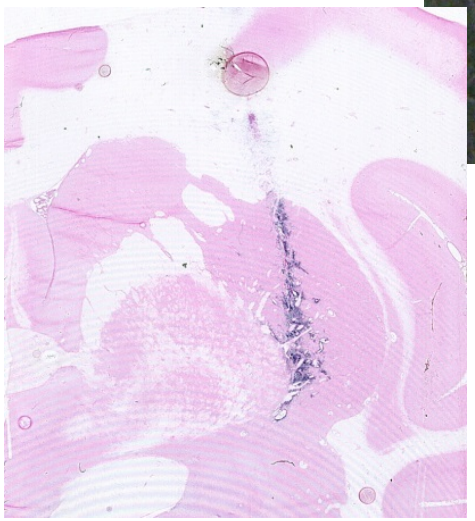


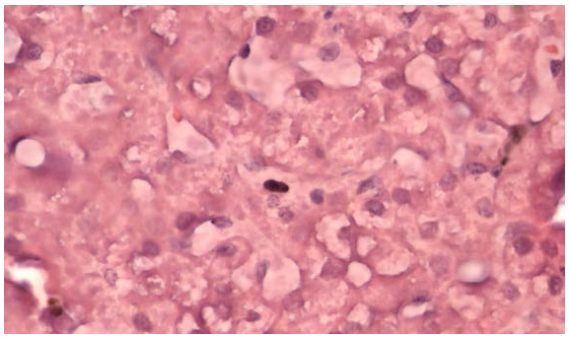
3. La découpe des tissus congelés :

Les artéfacts : de découpe

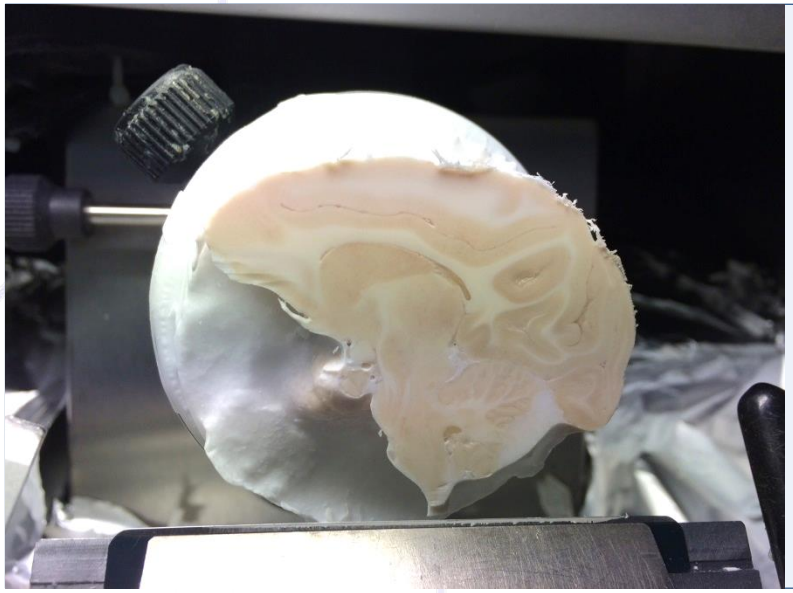
- ✓ Altération de la morphologie
- ✓ Bulles
- ✓ Plis
- ✓ Stries

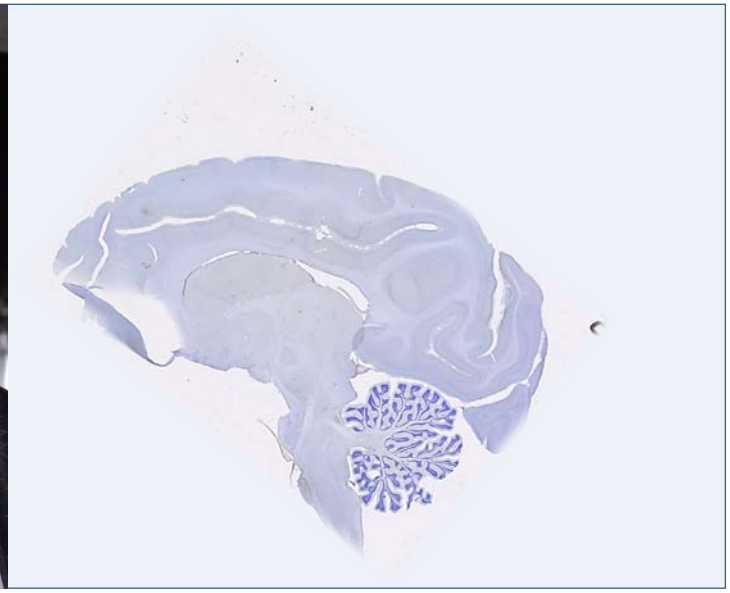


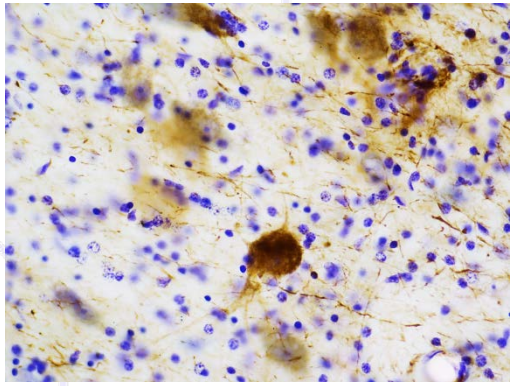


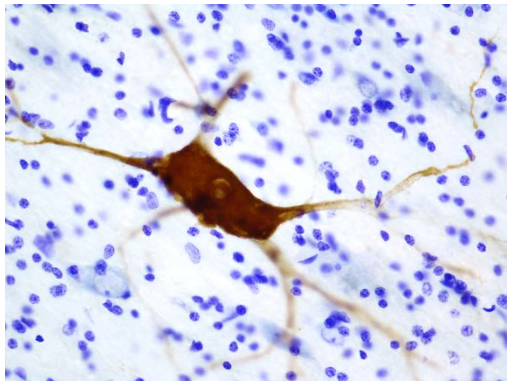


Association Française d'Histotechnologie

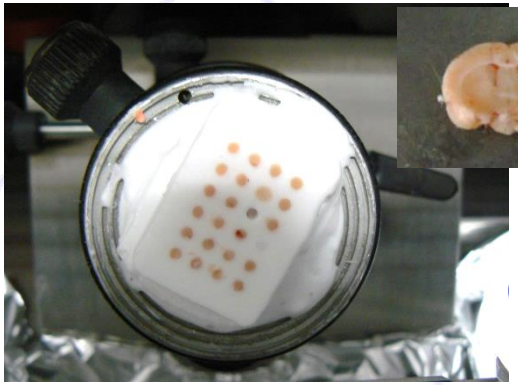


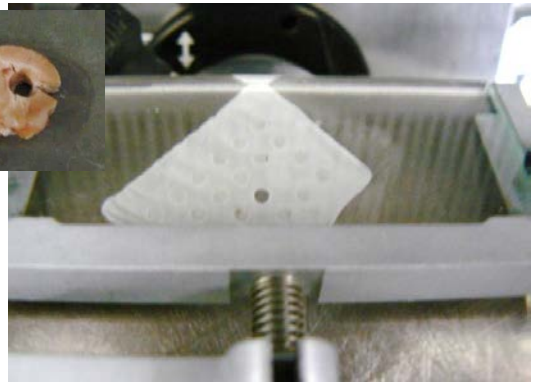


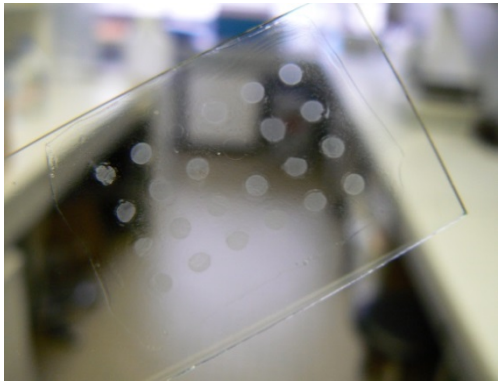


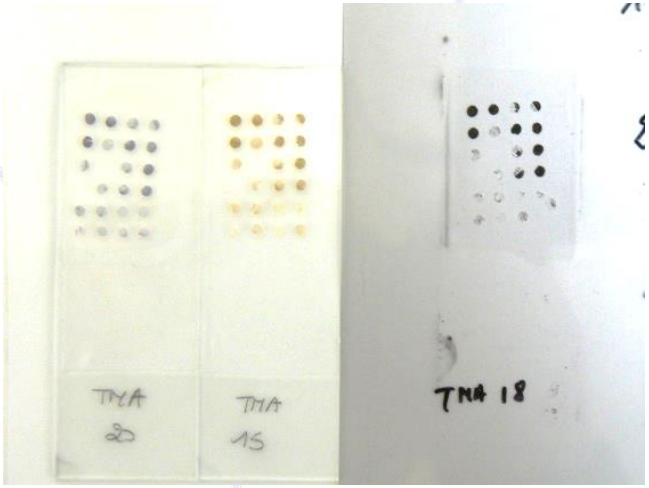


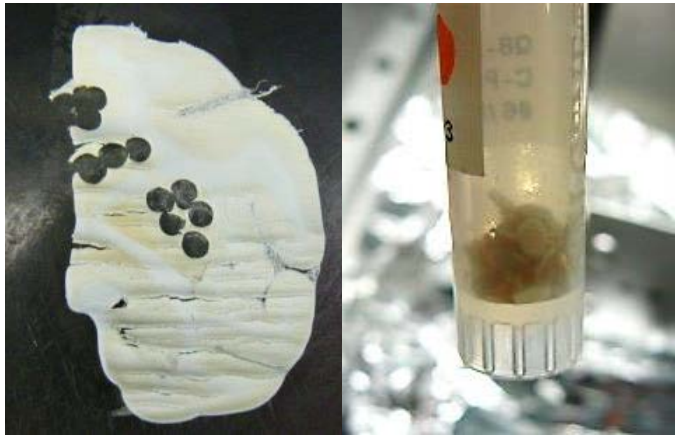
Association Française d'Histotechnologie











4. Conclusion :

- ✓ **Rapidité**
- ✓ **Applications très diverses**

Les paramètres sont à définir pour chaque cas expérimental
Des bases physiques existent
Rien ne vaut les expériences préliminaires
pour des cas particuliers

Lucie Fontaine

Fabienne Thillou

Florence Capilla

Lise Gutknecht

Fabienne Baraige

Chantal Ripoll

Gérard Morel

Merci à tous

Association Française d'Histotechnologie

Prochaine journée à thème :

9 Octobre 2015

PARIS

Immunofluorescence sur coupe de tissus inclus en paraffine

Inscriptions jusqu'au 1°Juillet

BI - Afhisto.fr