



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

T/NCY/2005/MONTAGNE  
(double)

DOUBLE  
181930

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ , NANCY I  
2005

FACULTE DE MEDECINE DE NANCY  
n° 25



## THESE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement  
Dans le cadre du troisième cycle de Médecine spécialisée

Par

**Karine CONTET-AUDONNEAU épouse MONTAGNE**

Le 11 Avril 2005

**LES SIGNAUX NON DESIRES EN IMMUNOHISTOCHIMIE SUR TISSUS DE  
SOURIS. ETUDE COMPARATIVE DE SYSTEMES DE REVELATION.  
APPLICATION A L'ETUDE DES EFFETS DU DELAI DE FIXATION SUR LES  
INDICES DE PROLIFERATION TUMORALE.**

Examineurs de la thèse :

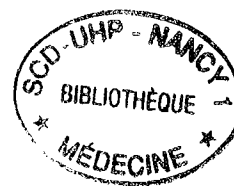
|                         |            |           |
|-------------------------|------------|-----------|
| <b>M. F. PLENAT</b>     | Professeur | Président |
| <b>M. J.M. VIGNAUD</b>  | Professeur | }         |
| <b>Mme M.C. BENE</b>    | Professeur | } Juges   |
| <b>M. P. CHASTAGNER</b> | Professeur | }         |

BIBLIOTHEQUE MEDECINE NANCY 1



D





## THESE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement  
Dans le cadre du troisième cycle de Médecine spécialisée

Par

**Karine CONTET-AUDONNEAU épouse MONTAGNE**

Le 11 Avril 2005

**LES SIGNAUX NON DESIRES EN IMMUNOHISTOCHIMIE SUR TISSUS DE  
SOURIS. ETUDE COMPARATIVE DE SYSTEMES DE REVELATION.  
APPLICATION A L'ETUDE DES EFFETS DU DELAI DE FIXATION SUR LES  
INDICES DE PROLIFERATION TUMORALE.**

Examineurs de la thèse :

|                         |            |   |           |
|-------------------------|------------|---|-----------|
| <b>M. F. PLENAT</b>     | Professeur |   | Président |
| <b>M. J.M. VIGNAUD</b>  | Professeur | } |           |
| <b>Mme M.C. BENE</b>    | Professeur | } | Juges     |
| <b>M. P. CHASTAGNER</b> | Professeur | } |           |

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

-----

**Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE**

**Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Patrick NETTER**

**Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE**

**Assesseurs**

du 1<sup>er</sup> Cycle :

du 2<sup>ème</sup> Cycle :

du 3<sup>ème</sup> Cycle :

de la Vie Facultaire :

**Mme le Docteur Chantal KOHLER**

**Mr le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI**

**Mr le Professeur Hervé VESPIGNANI**

**Mr le Professeur Bruno LEHEUP**

**DOYENS HONORAIRES**

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Georges GRIGNON – Professeur Jacques ROLAND

=====

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Louis PIERQUIN – Etienne LEGAIT – Jean LOCHARD – René HERBEUVAL – Gabriel FAIVRE – Jean-Marie FOLIGUET

Guy RAUBER – Paul SADOUL – Raoul SENAULT – Marcel RIBON

Jacques LACOSTE – Jean BEUREY – Jean SOMMELET – Pierre HARTEMANN – Emile de LAVERGNE

Augusta TREHEUX – Michel MANCIAUX – Paul GUILLEMIN – Pierre PAYSANT

Jean-Claude BURDIN – Claude CHARDOT – Jean-Bernard DUREUX – Jean DUHEILLE – Jean-Pierre GRILLIAT

Pierre LAMY – Jean-Marie GILGENKRANTZ – Simone GILGENKRANTZ

Pierre ALEXANDRE – Robert FRISCH – Michel PIERSON – Jacques ROBERT

Gérard DEBRY – Georges GRIGNON – Pierre TRIDON – Michel WAYOFF – François CHERRIER – Oliéro GUERCI

Gilbert PERCEBOIS – Claude PERRIN – Jean PREVOT – Jean FLOQUET

Alain GAUCHER – Michel LAXENAIRE – Michel BOULANGE – Michel DUC – Claude HURIET – Pierre LANDES

Alain LARCAN – Gérard VAILLANT – Daniel ANTHOINE – Pierre GAUCHER – René-Jean ROYER

Hubert UFFHOLTZ – Jacques LECLERE – Francine NABET – Jacques BORRELLY

Michel RENARD – Jean-Pierre DESCHAMPS – Pierre NABET – Marie-Claire LAXENAIRE – Adrien DUPREZ – Paul VERT

Philippe CANTON – Bernard LEGRAS – Pierre MATHIEU – Jean-Marie POLU – Antoine RASPILLER – Gilbert THIBAUT

Michel WEBER – Gérard FIEVE – Daniel SCHMITT

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS -  
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anatomie)**

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cytologie et histologie)**

Professeur Bernard FOLIGUET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)**

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD – Professeur Eric LABOUYRIE

-----

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Professeur Alain BERTRAND – Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)**

Professeur Luc PICARD – Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

-----

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)**

Professeur Jean-Pierre NICOLAS

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Physiologie*)**

Professeur Jean-Pierre CRANCE – Professeur Jean-Pierre MALLIE

Professeur François MARCHAL – Professeur Philippe HAOUZI

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Biologie cellulaire*)**

Professeur Claude BURLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Nutrition*)**

Professeur Olivier ZIEGLER

-----

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière*)**

Professeur Alain LE FAOU – Professeur Alain LOZNIEWSKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)**

Professeur Bernard FORTIER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Maladies infectieuses ; maladies tropicales*)**

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

-----

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Épidémiologie, économie de la santé et prévention*)**

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Médecine et santé au travail*)**

Professeur Guy PETIET – Professeur Christophe PARIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)**

Professeur Henry COUDANE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)**

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

-----

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)**

Professeur Christian JANOT – Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Pierre LEDERLIN – Professeur Jean-François STOLTZ

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie*)**

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Pierre BEY – Professeur Didier PEIFFERT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Immunologie*)**

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Génétique*)**

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

-----

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anesthésiologie et réanimation chirurgicale*)**

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Dan LONGROIS - Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Réanimation médicale*)**

Professeur Henri LAMBERT – Professeur Alain GERARD

Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT – Professeur Bruno LÉVY

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)**

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Thérapeutique*)**

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

-----

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Neurologie*)**

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI

Professeur Xavier DUCROCQ

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Neurochirurgie*)**

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE

Professeur Thierry CIVIT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Psychiatrie d'adultes*)**

Professeur Jean-Pierre KAHN

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Pédopsychiatrie*)**

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

**5<sup>ème</sup> sous-section : (*Médecine physique et de réadaptation*)**

Professeur Jean-Marie ANDRE

-----

**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Rhumatologie*)**

Professeur Jacques POUREL – Professeur Isabelle VALCKENAERE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie orthopédique et traumatologique*)**

Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Daniel MOLE

Professeur Didier MAINARD

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Dermato-vénéréologie*)**

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique*)**

Professeur François DAP

-----

**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Pneumologie*)**

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cardiologie*)**

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL –

Professeur Christian de CHILLOU

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie thoracique et cardiovasculaire*)**

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire*)**

-----

**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Gastroentérologie ; hépatologie*)**

Professeur Marc-André BIGARD

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie digestive*)**

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Néphrologie*)**

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN (Mme) – Professeur Luc FRIMAT

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Urologie*)**

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Luc CORMIER

-----

**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Médecine interne*)**

Professeur Francis PENIN – Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Denis WAHL

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY

Professeur Athanase BENETOS – Professeur Gisèle KANNY – Professeur Abdelouahab BELLOU

**2<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie générale*)**

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD

-----

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pédiatrie)**

Professeur Danièle SOMMELET – Professeur Michel VIDAILHET – Professeur Pierre MONIN  
Professeur Jean-Michel HASCOET – Professeur Pascal CHASTAGNER – Professeur François FEILLET

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie infantile)**

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Gilles DAUTEL – Professeur Pierre JOURNEAU

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)**

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Endocrinologie et maladies métaboliques)**

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

**5<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction)**

Professeur Hubert GERARD

-----

**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)**

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Ophtalmologie)**

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)**

Professeur Michel STRICKER – Professeur Jean-François CHASSAGNE

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**

**64<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Professeur Daniel BURNEL

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anatomie)**

Docteur Bruno GRIGNON

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cytologie et histologie)**

Docteur Edouard BARRAT – Docteur Jean-Claude GUEDENET

Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)**

Docteur Béatrice MARIE

Docteur Laurent ANTUNES

-----

**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

-----

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Docteur Xavier HERBEUVAL – Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Bernard NAMOUR – Docteur Marc MERTEN

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Docteur Gérard ETHEVENOT – Docteur Nicole LEMAU de TALANCE – Docteur Christian BEYAERT

Docteur Bruno CHENUÉL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Nutrition)**

Docteur Didier QUILLIOT

-----

**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)**

Docteur Francine MORY – Docteur Michèle WEBER – Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX – Docteur Véronique VENARD

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Parasitologie et mycologie)**

Docteur Marie-France BIAVA – Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU

**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)**

Docteur François ALLA

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)**

Docteur Pierre GILLOIS

-----

**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)**

Docteur François SCHOONEMAN

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Immunologie*)**

Docteur Marie-Nathalie SARDA

**4<sup>ème</sup> sous-section : (*Génétique*)**

Docteur Christophe PHILIPPE

-----

**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anesthésiologie et réanimation chirurgicale*)**

Docteur Jacqueline HELMER – Docteur Gérard AUDIBERT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)**

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT

Docteur Damien LOEUILLE

-----

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET  
RÉÉDUCATION**

**5<sup>ème</sup> sous-section : (*Médecine physique et de réadaptation*)**

Docteur Jean PAYSANT

-----

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,  
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**5<sup>ème</sup> sous-section : (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction*)**

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

**05<sup>ème</sup> section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE**

Monsieur Vincent LHUILLIER

-----

**32<sup>ème</sup> section : CHIMIE ORGANIQUE, MINÉRALE, INDUSTRIELLE**

Monsieur Jean-Claude RAFT

-----

**40<sup>ème</sup> section : SCIENCES DU MÉDICAMENT**

Monsieur Jean-François COLLIN

-----

**60<sup>ème</sup> section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE**

Monsieur Alain DURAND

-----

**61<sup>ème</sup> section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

-----

**64<sup>ème</sup> section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Madame Marie-Odile PERRIN – Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

-----

**65<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE CELLULAIRE**

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY – Madame Anne GERARD  
Madame Ketsia HESS – Monsieur Pierre TANKOSIC – Monsieur Hervé MEMBRE

-----

**67<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE**

Madame Nadine MUSSE

-----

**68<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE DES ORGANISMES**

Madame Tao XU-JIANG

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

**Médecine Générale**

Docteur Alain AUBREGE  
Docteur Francis RAPHAEL  
Docteur Jean-Marc BOIVIN

=====

**PROFESSEURS ÉMÉRITES**

Professeur Georges GRIGNON – Professeur Michel BOULANGE - Professeur Alain LARCAN - Professeur Michel WAYOFF  
Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Hubert UFFHOLTZ – Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Paul VERT  
Professeur Jean PREVOT – Professeur Jean-Pierre GRILLIAT - Professeur Philippe CANTON – Professeur Pierre MATHIEU  
Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Daniel SCHMITT – Mme le Professeur Colette VIDAILHET

=====

**DOCTEURS HONORIS CAUSA**

Professeur Norman SHUMWAY (1972)  
*Université de Stanford, Californie (U.S.A)*  
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)  
*Université Catholique, Louvain (Belgique)*  
Professeur Charles A. BERRY (1982)  
*Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)*  
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)  
*Brown University, Providence (U.S.A)*  
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)  
*Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)*  
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)  
*Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)*  
Harry J. BUNCKE (1989)  
*Université de Californie, San Francisco (U.S.A)*

Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)  
*Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)*  
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)  
*Université de Pennsylvanie (U.S.A)*  
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)  
*Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)*  
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)  
*Université d'Helsinki (FINLANDE)*  
Professeur James STEICHEN (1997)  
*Université d'Indianapolis (U.S.A)*  
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)  
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des  
Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)*

## **REMERCIEMENTS**

**A notre Maître et Président de thèse,**

**Monsieur le Professeur F. PLENAT**

**Professeur d'Anatomie et de Cytologie pathologiques (Option biologique)**

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail et de présider cette thèse

Vous avez su nous communiquer votre enthousiasme scientifique et vous nous avez guidé avec patience.

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond respect.

**A notre Maître et juge,**

**Monsieur le Professeur J.M. VIGNAUD**

**Professeur d'Anatomie et de Cytologie pathologiques**

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,

Nous vous remercions pour votre précieux enseignement en  
anatomo-pathologie au cours de notre internat

Veillez trouver ici la manifestation de notre sincère  
reconnaissance.

**A nos juges,**

**Madame le Professeur M.C. BENE**  
**Professeur d'Immunologie,**

Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail.  
Soyez assurée de notre profond respect.

**Monsieur le Professeur P. CHASTAGNER**  
**Professeur de Pédiatrie,**

Vous avez accepté de juger ce travail et nous vous en remercions. Nous avons été sensible à l'intérêt que vous portez à notre discipline et votre implication en recherche clinique.

**A nos maîtres successifs,**

**Monsieur le Professeur G. GAY ;**

**Monsieur le Professeur J.M. VIGNAUD,**

**Monsieur le Professeur F. PLENAT,**

**Monsieur le Professeur E. LABOUYRIE,**

**Madame le Docteur A. LEROUX**

**Je remercie tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :**

**Mesdames Corinne BONNET et Muriel ANFRYE,**

Pour leur enthousiasme, leur disponibilité et leur participation à la réalisation de ce travail

**Mesdames Bernadette CUNIN et Dominique MENG,**

Pour leur aide à la réalisation de ce travail

**Madame Claudine MAIRE,**

Pour la mise en forme de ce travail

**Sébastien,**

Pour son soutien, sa bonne humeur et sa formation accélérée en informatique

**Amandine, Sophie et Juliette,**

Pour leur gentillesse

**A tous les membres des laboratoires d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques des Hôpitaux de Brabois et de Central (Messieurs les Professeurs PLENAT et VIGNAUD) et du Centre Alexis Vautrin (Madame LEROUX) .**

**A mes collègues et amis,**

**A Serge, mon mari**

Que j'aime de tout mon coeur

**A Inès et Thibaud,**

Mes enfants adorés

**A Mes Parents,**

Qui m'ont soutenue durant toutes mes études et ont su me guider dans mes choix professionnels

**A Alexandra et Anne,**

Pour leur écoute et leur soutien

**A Araceli et Patrick,**

Pour leur disponibilité et leur aide

**A Marc et Eric,**

**A mon grand père,**

**A toute ma famille,**

**A tous mes amis,**

**Je dédie cette thèse.**

## **SERMENT**

*« Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver et de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et moraux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état et leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.*

*Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.*

*Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.*

*J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.*

*Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque ».*

# **TABLES DES MATIERES**



|                                                                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| REMERCIEMENTS .....                                                                                                                                                                       | 8         |
| SERMENT .....                                                                                                                                                                             | 14        |
| TABLES DES MATIERES .....                                                                                                                                                                 | 16        |
| ABREVIATIONS .....                                                                                                                                                                        | 20        |
| TABLEAUX ET SCHEMAS.....                                                                                                                                                                  | 21        |
| PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES.....                                                                                                                                                             | 22        |
| INTRODUCTION .....                                                                                                                                                                        | 23        |
| <br>                                                                                                                                                                                      |           |
| PREMIERE PARTIE : RAPPELS.....                                                                                                                                                            | 26        |
| 1. L'immunohistochimie, les problèmes chez la souris, les solutions.....                                                                                                                  | 27        |
| <i>1.1 La technique immunohistochimique en trois couches faisant appel au couple streptavidine-biotine/anticorps secondaire .....</i>                                                     | <i>27</i> |
| <i>1.2 Les problèmes sur les tissus de souris.....</i>                                                                                                                                    | <i>28</i> |
| <i>1.3 Les solutions proposées pour diminuer ces signaux.....</i>                                                                                                                         | <i>32</i> |
| <i>1.3.1 Pré incubation des lames avec des fragments Fc et Fab d'Ig anti souris.....</i>                                                                                                  | <i>32</i> |
| <i>1.3.2 La pré incubation en tube.....</i>                                                                                                                                               | <i>33</i> |
| <i>1.3.3 Utilisation d'un anticorps secondaire anti-IgG1 .....</i>                                                                                                                        | <i>33</i> |
| 2. Application : détection de marqueurs du cycle cellulaire sur des tumeurs humaines greffées chez la souris ayant subi un retard de fixation et comparaison avec l'indice mitotique..... | 35        |
| <i>2.1 Le compte mitotique.....</i>                                                                                                                                                       | <i>35</i> |
| <i>2.2 Délai avant fixation et ses conséquences sur le compte mitotique et sur les indices de prolifération en immunohistochimie .....</i>                                                | <i>38</i> |
| <i>2.3 Les marqueurs de prolifération.....</i>                                                                                                                                            | <i>39</i> |
| <i>2.3.1 Les anticorps dirigés contre la protéine Ki-67.....</i>                                                                                                                          | <i>40</i> |
| <i>2.3.2 L'ICBP 90 : nouveau marqueur du cycle cellulaire .....</i>                                                                                                                       | <i>41</i> |
| <i>2.3.3 L'anticorps anti-phosphohistone H3 .....</i>                                                                                                                                     | <i>41</i> |
| <br>                                                                                                                                                                                      |           |
| DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES .....                                                                                                                                              | 43        |
| 1. Les animaux.....                                                                                                                                                                       | 44        |
| 2. Les greffes.....                                                                                                                                                                       | 44        |
| 3. Les prélèvements.....                                                                                                                                                                  | 44        |
| 3.1 Pour l'étude des signaux immunohistochimiques indésirables.....                                                                                                                       | 44        |
| 3.1.1 Echantillons de tissus murins .....                                                                                                                                                 | 44        |

|                                                                                                                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.2 Greffons de tumeurs gliales.....                                                                                                                                                                                                           | 46        |
| 3.2 Pour l'étude des effets du délai de fixation sur les indices de prolifération cellulaire.....                                                                                                                                                | 46        |
| 4. Les techniques immunohistochimiques.....                                                                                                                                                                                                      | 47        |
| 4.1 Pour la détermination des conditions optimales de limitation des signaux non souhaités.....                                                                                                                                                  | 47        |
| 4.1.1 Mise en évidence des signaux gênant l'analyse des résultats techniques immunohistochimiques de routine lors de leur application à des tissus murins .....                                                                                  | 47        |
| 4.1.2 Mise en évidence des colorations indésirables après détection de l'anticorps primaire murin par un anticorps secondaire de lapin anti IgG1 de souris, biotinylé, suivi d'une incubation dans une solution de streptavidine peroxydase..... | 50        |
| 4.1.3 Analyse des signaux non souhaités après pré incubation des coupes dans une solution de fragments résultant de la digestion complète de l'anticorps de lapin dirigé contre les IgG (H+L) de souris.....                                     | 51        |
| 4.1.4 Analyse des signaux non souhaités par utilisation, comme réactifs primaires, de complexes anticorps primaire/anticorps secondaire formés in vitro. ....                                                                                    | 52        |
| 4.2 Etude des effets du délai de fixation sur l'appréciation de différents indices de prolifération cellulaire.....                                                                                                                              | 53        |
| 4.2.1 Mesure de l'indice mitotique .....                                                                                                                                                                                                         | 53        |
| 4.2.2 Appréciation des cellules en division par mise en évidence immunohistochimique de protéines dont l'expression est synchrone du cycle cellulaire .....                                                                                      | 54        |
| <b>TROISIEME PARTIE : RESULTATS.....</b>                                                                                                                                                                                                         | <b>56</b> |
| 1. Les signaux immunohistochimiques indésirables.....                                                                                                                                                                                            | 57        |
| 1.1 mise en évidence des signaux gênant l'analyse des résultats des techniques immunohistochimiques de routine lors de leur application à des tissus murins .....                                                                                | 57        |
| 1.1.1 Introduction .....                                                                                                                                                                                                                         | 57        |
| 1.1.2 Les signaux non souhaités dans le cas de tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine .....                                                                                                                                       | 60        |
| 1.1.3 Dans le cas de coupes à congélation immédiatement post fixées au formol.....                                                                                                                                                               | 61        |
| 1.1.4 Dans le cas de coupes à congélation séchées à l'air puis post fixées au formol                                                                                                                                                             | 62        |
| 1.1.5 Dans le cas de coupes à congélation séchées à l'air post fixées aux vapeurs de formol .....                                                                                                                                                | 62        |
| 1.2 glioblastome greffé chez la souris .....                                                                                                                                                                                                     | 63        |

|                                                                                                                                                        |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>2. Comparaison de méthodes de limitation de bruit de fond.....</b>                                                                                  | <b>64</b>  |
| <b>2.1 Pré incubation des lames par une solution bloquante .....</b>                                                                                   | <b>64</b>  |
| <b>2.2 Modification du système de révélation par l'anticorps secondaire.....</b>                                                                       | <b>64</b>  |
| 2.2.1 Utilisation d'un anticorps secondaire anti IgG1 de souris biotinylé, fabriqué<br>chez le lapin.....                                              | 64         |
| 2.2.2 Utilisation de complexes anticorps primaire /anticorps secondaire biotinylé<br>formés in vitro.....                                              | 65         |
| <b>3. Compte mitotique, indice de prolifération et délai de fixation.....</b>                                                                          | <b>69</b>  |
| <b>3.1 Le compte mitotique et le délai de fixation .....</b>                                                                                           | <b>72</b>  |
| <b>3.2 Les indices de prolifération .....</b>                                                                                                          | <b>74</b>  |
| <b>DISCUSSION.....</b>                                                                                                                                 | <b>81</b>  |
| <b>1. Les signaux non souhaités en immunohistochimie après utilisation d'anticorps<br/>        monoclonaux sur des coupes de tissus de souris.....</b> | <b>82</b>  |
| <b>2. Effet du délai de fixation sur les indices mitotiques et de prolifération.....</b>                                                               | <b>87</b>  |
| <b>CONCLUSION.....</b>                                                                                                                                 | <b>92</b>  |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>                                                                                                               | <b>94</b>  |
| <b>ANNEXES.....</b>                                                                                                                                    | <b>101</b> |



## **ABREVIATIONS**



Ig: immunoglobuline

Fc : fragment cristallisable

Fab : fragment « antigen binding »

SBR : Scarff Bloom Richardson

CD : cluster differentiation

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

BrdU : Bromodésoxyuridine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

MIB : molecular immunology borstel

ICBP : inverted CCAAT box binding protein

IHC : immuno histo chimie

IgG (H+L) : immunoglobuline dirigée contre les chaînes lourdes (Heavy) et légères (Light) des immunoglobulines de type IgG

**TABLEAUX ET SCHEMAS****Pages**

|                                                                                                                           |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>Tableau n°1</b> : les différents types d'immunoglobulines .....                                                        | 32    |
| <b>Tableaux n°2 à 13</b> : résultats des indices de prolifération et de l'indice mitotique.....                           | 69-72 |
| <b>Tableau n°14</b> : résumé des anticorps primaires et secondaires utilisés.....                                         | 105   |
| <b>Schéma n°1</b> : technique immunohistochimique en trois couche classique .....                                         | 30    |
| <b>Schéma n°2</b> : limites de la technique immunohistochimique en trois couches appliquée sur des<br>tissus murins ..... | 30    |
| <b>Schéma n°3</b> : principe du micro polymère de peroxydase lié à l'anticorps<br>secondaire.....                         | 32    |
| <b>Schéma n°4</b> : digestion des immunoglobulines par la papaïne .....                                                   | 33    |
| <b>Schéma n°5</b> : Méthode de pré incubation en tube .....                                                               | 34    |
| <b>Schéma n°6</b> : méthode utilisant un anticorps secondaire anti IgG1 .....                                             | 34    |
| <b>Schémas n° 7 et 8</b> : variations du compte mitotique.....                                                            | 37    |

***PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES***

|                                                                             | <b>Page</b> |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Planche n°1</b> : les signaux observés non désirés.....                  | 66          |
| <b>Planche n°2</b> : les signaux observés non désirés .....                 | 67          |
| <b>Planche n°3</b> : les signaux observés non désirés.....                  | 68          |
| <b>Planche n°4</b> : les indices de prolifération immunohistochimiques..... | 80          |



# **INTRODUCTION**

La souris, le xénope, le poulet et le poisson zèbre représentent les quatre grands modèles animaux pour l'étude des vertébrés. La souris constitue un modèle de choix pour l'étude des maladies humaines, en particulier des cancers. Les trois dernières décennies ont été marquées par le développement rapide de très nombreux modèles murins de ces affections, que ces derniers soient radios induits, obtenus par transgénèse ou par greffe de tumeurs humaines chez l'animal athymique. Les analyses phénotypiques immunohistochimiques dans cette espèce sont très souvent gênées par le développement de colorations non souhaitées provenant de l'interaction des systèmes de révélation avec certains constituants des coupes tissulaires. Ces signaux sont particulièrement marqués lors de l'utilisation d'anticorps monoclonaux de souris comme réactif primaire car l'anticorps secondaire utilisé reconnaîtra également les immunoglobulines endogènes murines. Notre travail a consisté à faire un relevé des colorations « artéfactuelles » observées lors de l'emploi des techniques immunohistochimiques de routine et selon plusieurs modes de fixation, puis à tester différents procédés pour les éviter ou, tout au moins, en limiter l'intensité.

L'appréciation des paramètres de prolifération et de mort cellulaire constitue une étape fondamentale de la compréhension de nombreux phénomènes biologiques. En cancérologie clinique, les paramètres de prolifération sont très utilisés pour l'établissement du diagnostic (tumeurs musculaires lisses utérines ou gastro intestinales) et du pronostic de nombreux types tumoraux (méningiome, adénocarcinome canalaire du sein etc.). En cancérologie expérimentale, ces paramètres sont également indispensables à la compréhension de la croissance tumorale spontanée ou sous l'effet des traitements. Ces dernières décennies, de nombreuses méthodes ont été mises au point et utilisées pour mesurer ces paramètres. En expérimentation animale, la mesure de l'indice et du compte mitotiques et celle des indices de prolifération après administration à l'animal d'un nucléoside radioactif ou d'un analogue nucléosidique halogéné (BrdU ou IdU) détectable par méthode immunohistologique, ont été, pendant longtemps, les plus utilisées. Cette dernière méthode, souvent considérée comme constituant la référence, présente les deux inconvénients principaux suivants : 1) l'impossibilité de réaliser des travaux rétrospectifs, 2) la difficulté de standardiser la dose de nucléoside administrée à l'animal en fonction du poids de ce dernier et du volume tumoral. Ce dernier paramètre n'est, le plus souvent, pas pris en compte en expérimentation. Les indices de prolifération peuvent également être appréciés par la mesure de la fraction des cellules

tumorales parcourant le cycle cellulaire après mise en évidence de protéines spécifiquement exprimées par les cellules en division tels que PCNA, la protéine Ki-67, etc. Compte tenu de la maîtrise du « bruit de fond » et notamment de l'obtention de préparations immunohistochimiques sans artéfact nucléaire résultant de la première partie de notre travail, nous avons poursuivi nos recherches en déterminant la technique d'étude de la cinétique de cellulaire la mieux adaptée à l'analyse des modèles animaux de tumeur utilisés au laboratoire, en l'occurrence, des glioblastomes humains greffés chez des souris athymiques. Dans notre travail, nous avons comparé les résultats de la mesure classique de l'indice mitotique à ceux obtenus après mise en évidence des protéines : 1) Ki-67, 2) ICBP 90 ( inverted CCAAT box binding protein), et 3) histone H3 phosphorylée. Enfin, profitant des manipulations immunohistochimiques nécessaires à l'analyse comparative de ces différents indices, nous avons évalué la sensibilité de ces marqueurs au délai de fixation et donc à l'ischémie.

## **PREMIERE PARTIE : RAPPELS**

## 1. L'immunohistochimie, les problèmes chez la souris, les solutions

### *1.1 La technique immunohistochimique en trois couches faisant appel au couple streptavidine-biotine/anticorps secondaire*

En pratique courante comme en recherche, la technique immunohistochimique la plus pratiquée sur les coupes de tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine est une technique en trois couches dont la première étape est constituée par une incubation dans une solution de l'anticorps d'intérêt, appelé anticorps primaire. Après un lavage ayant pour but d'éliminer les anticorps adhérents à la coupe du fait d'interactions non spécifiques, sont déposées successivement les différentes couches d'un système de révélation constitué le plus souvent d'un antisérum biotinylé dirigé contre les immunoglobulines de l'espèce ayant fourni l'anticorps primaire puis une streptavidine (ou une avidine) conjuguée à une enzyme telle que la peroxydase ou la phosphatase alcaline. La liaison entre l'anticorps secondaire et la streptavidine résulte de la très grande affinité de cette dernière pour la biotine. Les activités peroxydasique ou phosphatasique sont ensuite mises en évidence par incubation dans une solution de révélation donnant lieu à un produit coloré insoluble.

*(schéma N°1).*

En immunohistochimie, les signaux colorés peuvent correspondre à un marquage spécifique mais aussi résulter de réactions parasites de mécanismes variés :

- \* réactions immunologiques spécifiques développées entre les anticorps primaire ou secondaire et un déterminant antigénique n'appartenant pas à la molécule cible (réactions croisées),

- \* interactions non spécifiques développées entre l'une des protéines du montage (anticorps primaire, secondaire, streptavidine, peroxydase ou phosphatase) et des constituants de la coupe,

- \* activité enzymatique endogène identique à celle utilisée comme traceur (peroxydases granulocytaires par exemple). L'oxydation du substrat de la peroxydase peut également être catalysé par des ions métalliques, notamment par le couple redox  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  présent dans les globules rouges et l'hémoglobine. Il est classique, en anatomie pathologique, d'appeler cette catalyse non enzymatique « pseudoactivité peroxydasique ». La biotine est liée de façon covalente à différentes protéines, principalement mitochondriales, ce qui explique l'aspect granulaire ou en bâtonnets des artéfacts qui résultent de son interaction avec la

streptavidine et l'intensité des colorations artéfactuelles secondaires à l'interaction de la streptavidine avec la biotine endogène au niveau des cellules riches en mitochondries telles que l'hépatocyte, le sébocyte ou la cellule du tube contourné proximal rénal. La covalence de la liaison biotine/protéine, quant à elle, rend compte du fait que la biotine, une vitamine hydrosoluble de petite taille, n'est pas perdue lors de la fixation et de l'inclusion et résiste au démasquage thermique. Un moyen pour ne pas détecter la biotine endogène, utilisé dans notre travail, consiste à utiliser un anticorps secondaire lié à un micropolymère de peroxydase. (schéma n°3) (Voir ci-dessous).

### ***1.2 Les problèmes sur les tissus de souris***

Les réactions parasite décrites ci-dessus ne sont pas spécifique d'espèce. Elles peuvent s'observer tant dans les tissus humains que murins. L'utilisation d'anticorps monoclonaux fabriqués chez la souris sur des tissus de la même espèce est, en revanche, à l'origine de difficultés spécifiques liées à la présence des immunoglobulines circulantes et extra vasculaires. En effet, si des adaptations ne sont pas apportées à la technique de base, le système de révélation dont la première étape est un sérum anti immunoglobulines de souris, réagit non seulement avec l'anticorps primaire fixé dans la coupe, mais également avec les immunoglobulines de l'animal, générant ainsi un marquage parasite très gênant. (*schéma n°2*). Ces immunoglobulines sont présentes en quantité variable selon les organes et selon le type d'immunoglobuline. Cinq classes d'immunoglobulines existent chez le mammifères : IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Leur structure de base comporte quatre chaînes polypeptidiques, deux chaînes légères identiques et deux chaînes lourdes identiques, reliées entre-elles par des ponts di sulfures. Il existe deux types de chaînes légères,  $\kappa$  et  $\lambda$ , communes à toutes les immunoglobulines, identiques chez l'homme et chez la souris. Les chaînes lourdes sont de plusieurs types,  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ,  $\mu$ ,  $\gamma$  déterminant l'iso type de l'immunoglobuline respectivement IgA, IgE, IgD, IgM et IgG (*tableau n°1*). L'IgG est le type d'immunoglobuline majoritaire. Il est divisé en plusieurs sous-types IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 lesquels diffèrent par leurs chaînes lourdes. Les IgG sont réparties dans les secteurs extravasculaires et intravasculaires. Les IgM sont essentiellement intra vasculaires. Les IgA sont retrouvées dans les sécrétions des muqueuses tels que les sécrétions trachéo-bronchiques, digestives et uro-génitales. Les IgD sont peu abondantes dans le liquide plasmatique mais sont présentes en surface des lymphocytes B. Les IgE sont présentes en surface des basophiles et des mastocytes.

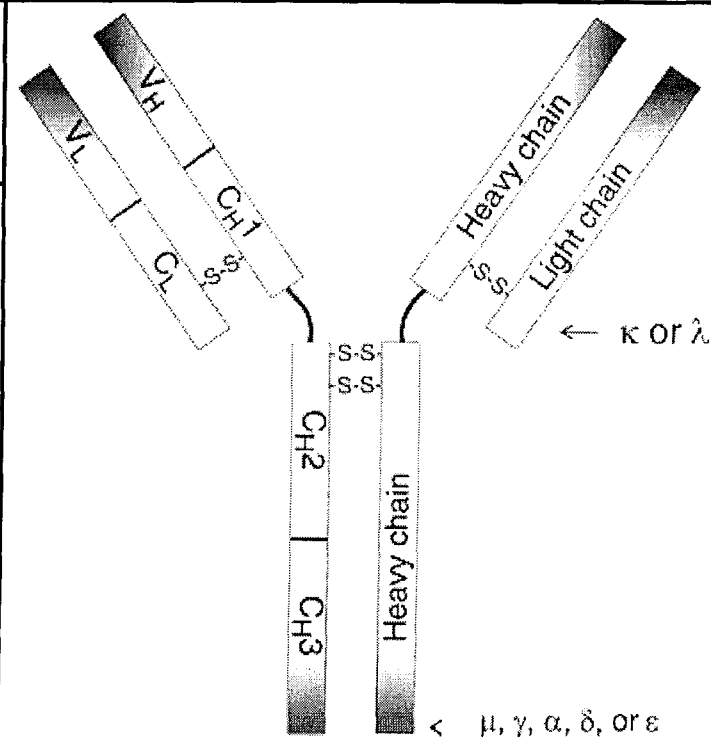
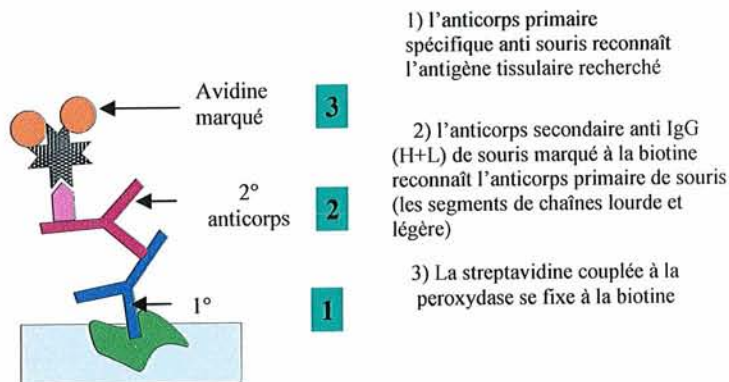
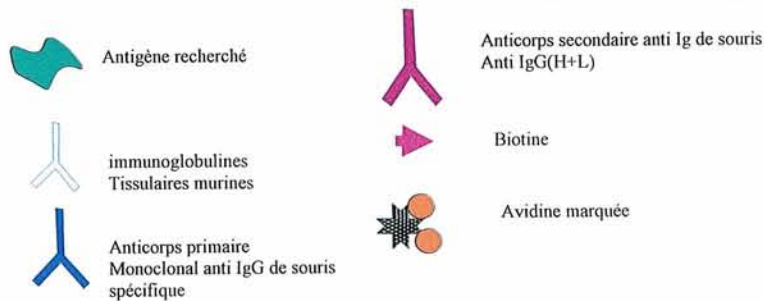
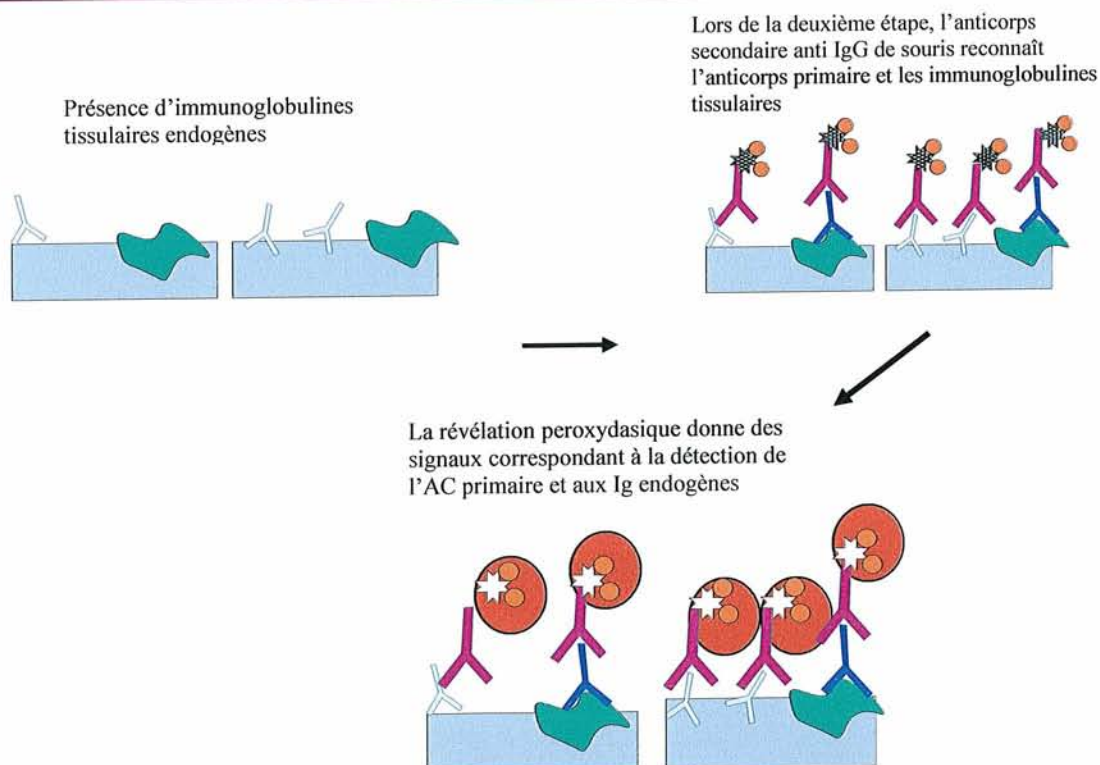
| Antibody | Human and Mouse                      |                                                                              |                                                                      |                                                                                     |                                                                                |                                                                        |
|----------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
|          | Light Chain                          | Subtype                                                                      | Heavy Chain                                                          |  |                                                                                |                                                                        |
| IgA      | κ or λ<br>κ or λ                     | IgA <sub>1</sub><br>IgA <sub>2</sub>                                         | α <sub>1</sub><br>α <sub>2</sub>                                     |                                                                                     |                                                                                |                                                                        |
| IgE      | κ or λ                               | None                                                                         | ε                                                                    |                                                                                     |                                                                                |                                                                        |
| IgD      | κ or λ                               | None                                                                         | δ                                                                    |                                                                                     |                                                                                |                                                                        |
| IgM      | κ or λ                               | None                                                                         | μ                                                                    |                                                                                     |                                                                                |                                                                        |
|          | Human                                |                                                                              |                                                                      | Mouse                                                                               |                                                                                |                                                                        |
| IgG      | Light Chain                          | Subtype                                                                      | Heavy Chain                                                          | Light Chain                                                                         | Subtype                                                                        | Heavy Chain                                                            |
|          | κ or λ<br>κ or λ<br>κ or λ<br>κ or λ | IgG <sub>1</sub><br>IgG <sub>2</sub><br>IgG <sub>3</sub><br>IgG <sub>4</sub> | γ <sub>1</sub><br>γ <sub>2</sub><br>γ <sub>3</sub><br>γ <sub>4</sub> | κ or λ<br>κ or λ<br>κ or λ<br>κ or λ                                                | IgG <sub>1</sub><br>IgG <sub>2a</sub><br>IgG <sub>2b</sub><br>IgG <sub>3</sub> | γ <sub>1</sub><br>γ <sub>2a</sub><br>γ <sub>2b</sub><br>γ <sub>3</sub> |

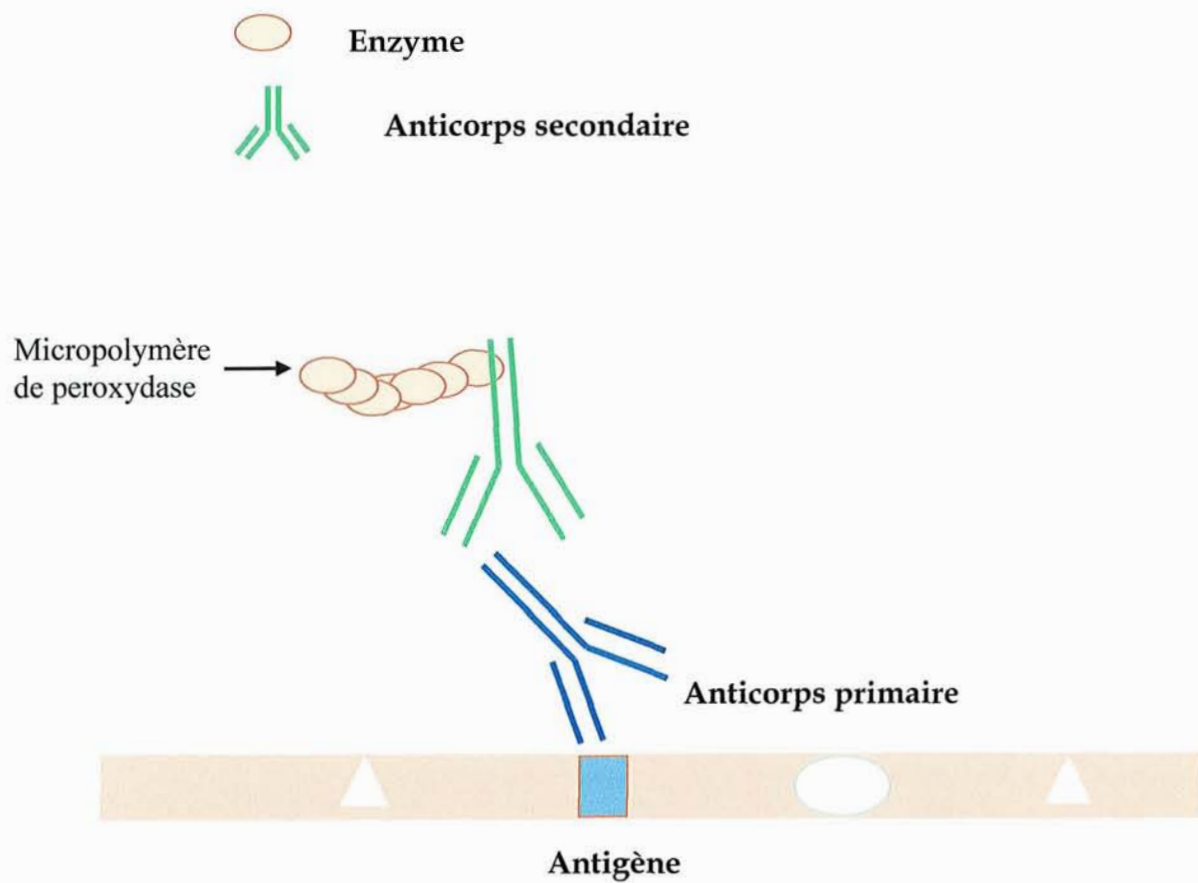
Tableau n°1 Structure des immunoglobulines et classification

**Schéma n° 1 Technique immunohistochimique classique en trois couches faisant appel au couple Streptavidine-biotine/ anticorps secondaire biotinylé.**



**Schéma n°2 : reconnaissance des immunoglobulines endogènes des tissus murins.**





**Schéma n°3** : anticorps secondaire couplé à un micropolymère de peroxydase (ImmPRESS). Il n'existe pas de détection de la biotine endogène.

### 1.3 Les solutions proposées pour diminuer ces signaux

#### 1.3.1 Pré incubation des lames avec des fragments Fc et Fab d'Ig anti souris

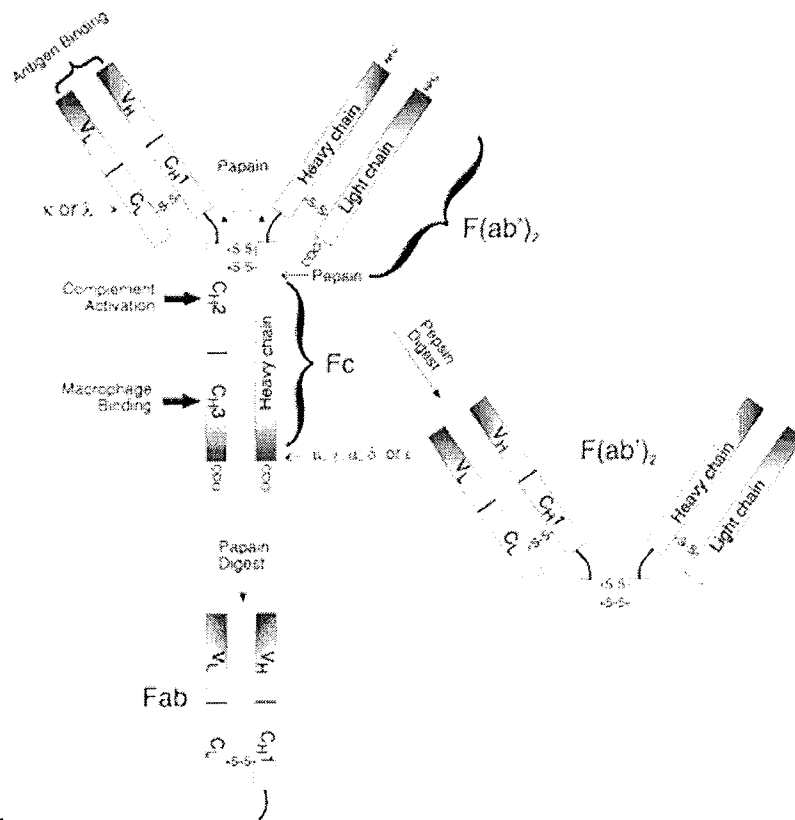


Schéma n° 4 : La digestion d'une immunoglobuline par la papaïne aboutit à la formation de deux fragments Fab et d'un fragment Fc ; la digestion avec la pepsine donne un fragment  $F(ab')_2$  et un fragment Fc.

Une méthode décrite par Lu (24) consiste à tenter de masquer les sites d'interaction des sérums anti IgG (H+L) avec les immunoglobulines tissulaires à l'aide de fragments Fab de l'antisérum, obtenus par protéolyse enzymatique à la papaïne d'immunoglobulines anti IgG (H+L) de lapin.

Les coupes sont mises en présence de la solution de fragments Fab avant l'incubation de l'anticorps primaire. Lu suggère, de plus, d'enrichir la solution de blocage en fragments Fc pour masquer les récepteurs de ces derniers présents à la surface des macrophages.

### 1.3.2 La pré incubation en tube

Cette technique est basée sur le principe de formation d'un complexe anticorps primaire /anticorps secondaire, *in vitro*, avant application sur les coupes histologiques (11) (17). Elle consiste à utiliser des complexes solubles formés *in vitro* entre l'anticorps primaire monoclonal de souris d'intérêt et un anticorps secondaire biotinylé. Ce dernier peut être un anti IgG (H+L) ou un anti IgG1. Les fragments Fab, purifiés par affinité biotinylé d'un antisérum dirigé contre l'extrémité Fc des IgG1, peuvent également être utilisés. Cette dernière solution est théoriquement la meilleure du fait de la monovalence du réactif. Dans le cas où la quantité d'anticorps anti immunoglobulines utilisée serait supérieure à celle nécessaire à la formation des complexes, les molécules d'anticorps secondaires excédentaires peuvent être inhibées par ajout, dans la solution d'immunoglobulines, de souris non spécifiques de l'antigène recherché. Des kits basés sur ces procédés sont commercialisés par Dakocytomation (Kit ARK : Animal Research Kit) et Molecular Probes (Zenon).

(schéma n° 5)

### 1.3.3 Utilisation d'un anticorps secondaire anti-IgG1

Une autre méthode consiste à tirer partie du fait qu'une grande majorité des anticorps monoclonaux fabriqués chez la souris sont des IgG1 et que cet isotype ne constitue qu'une fraction minoritaire des immunoglobulines circulantes dans cette espèce. Ce fait est particulièrement marqué chez la souris athymique (nu/nu). Les concentrations des différentes classes d'immunoglobulines circulantes chez les souris normale et athymique, immunisées ou non, sont rapportées dans le tableau suivant.

**Concentration en immunoglobulines dans le sérum des souris normales et nude (a)**

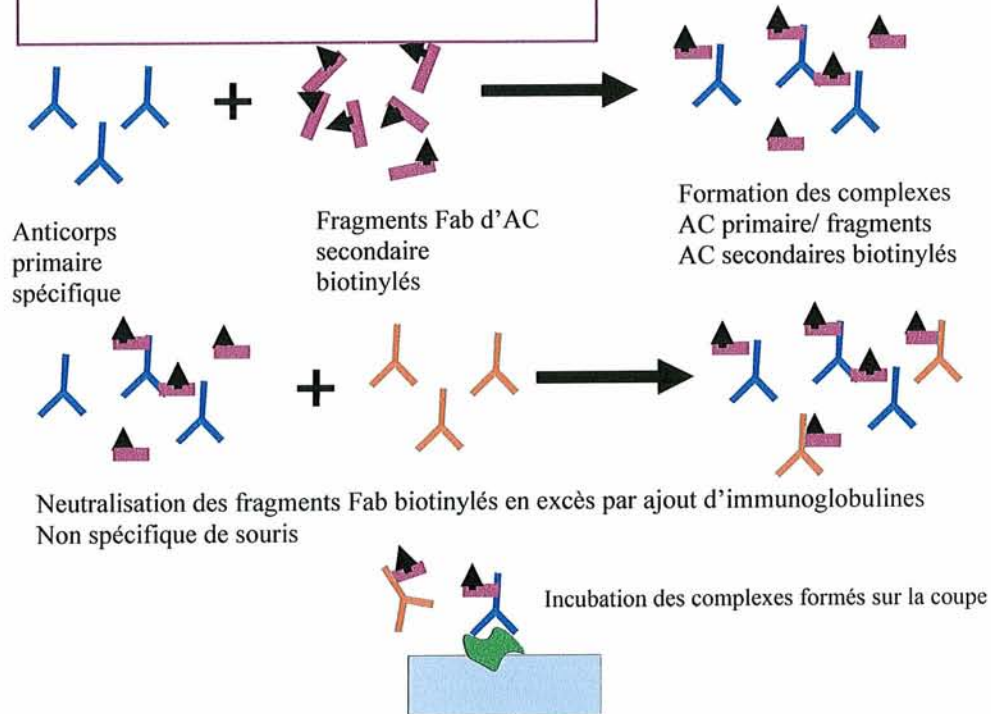
| Immunoglobulines  | Non immunisées (b) |                           | Immunisées   |                           |
|-------------------|--------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|
|                   | nu/nu<br>(9)       | + / ?<br>(9) <sup>c</sup> | nu/nu<br>(6) | + / ?<br>(7) <sup>c</sup> |
| IgG <sub>1</sub>  | 0,11 +/- 0,12      | NS 0,18 +/-               | 0,59 +/-     | X 2,06 +/-                |
| IgG <sub>2a</sub> | 1,02 +/- 1,19      | 0,14                      | 0,51         | 1,46                      |
| IgM               | 1,07 +/- 0,36      | X 4,23 +/-                | 0,55 +/-     | XX 7,26 +/-               |
| IgA               | 0,068 +/-          | 3,47                      | 0,58         | 5,1                       |
|                   | 0,030              | NS 1,13 +/-               | 1,35 +/-     | NS 1,25 +/-               |
|                   |                    | 0,28                      | 0,34         | 0,32                      |
|                   |                    | XX 0,363                  | 0,095 +/-    | XX 0,518 +/-              |
|                   |                    | +/- 0,260                 | 0,260        | 0,364                     |

a : emprunté à Salomon JC, Bazin H. Low levels of some serum immunoglobulin classes in nude mice. Rev Eur Etud Clin Biol 1972;17:880-2

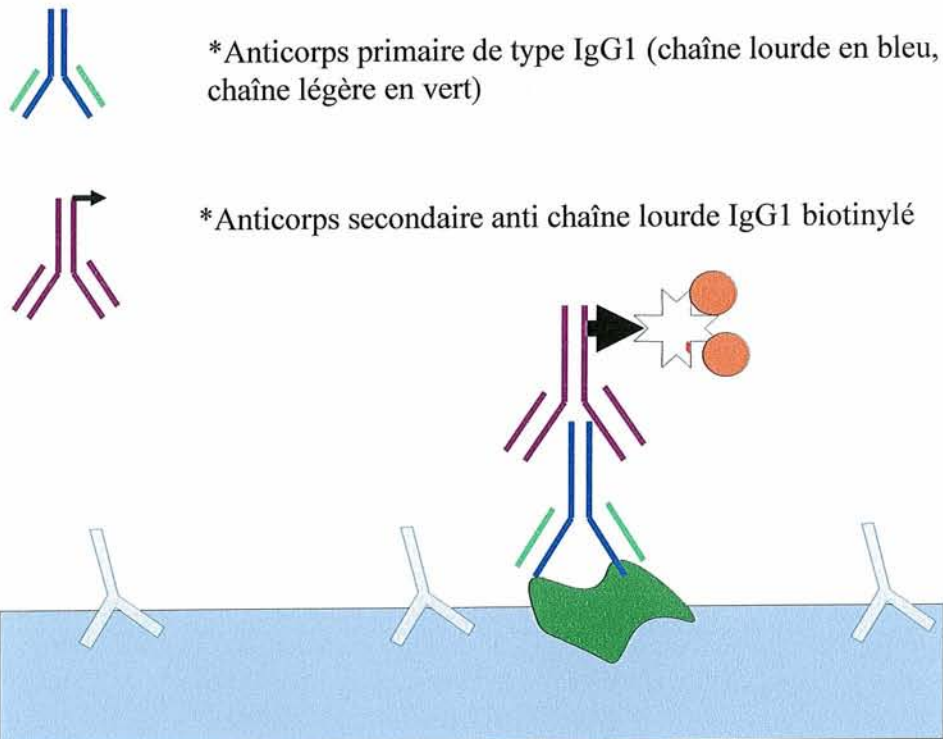
b : valeurs exprimées en mg/ml

c : NS : non significatif ; X :  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$

### Schéma n° 5 Pré incubation en tube



### Schéma n°6 Utilisation d'un anticorps secondaire anti chaîne lourde d'IgG1 de souris



Dans cette méthode, le choix de la spécificité de l'antisérum a toute son importance. Beaucoup d'anticorps secondaires sont, en effet, préparés contre des IgG complètes. Ils réagissent donc à la fois avec les chaînes légères et les chaînes lourdes et, par là même, avec tous les isotypes puisque les chaînes légères sont communes à toutes les classes d'immunoglobulines. C'est tout l'intérêt d'utiliser des anticorps secondaires complémentaires de l'extrémité Fc de la chaîne  $\gamma$  1 (schéma n°6)

## **2. Application : détection de marqueurs du cycle cellulaire sur des tumeurs humaines greffées chez la souris ayant subi un retard de fixation et comparaison avec l'indice mitotique**

Différentes méthodes morphologiques peuvent être utilisées pour apprécier la fraction cellulaire qui prolifère dans une tumeur. Une première consiste à compter les cellules en caryocinèse, la division nucléaire se présentant sous la forme des classiques « figures » de mitose. Une deuxième repose sur la mise en évidence de la population des cellules tumorales ayant dupliqué tout ou partie de leur ADN. Dans la dernière méthode, sont comptées les cellules exprimant une protéine connue pour être synthétisée de façon synchrone d'une période plus ou moins étendue du cycle cellulaire mais non exprimée par les cellules hors cycle. Cette dernière méthode suppose l'absence d'anomalies d'expression de la protéine par les cellules cancéreuses.

### ***2.1 Le compte mitotique***

L'indice mitotique est un indice pronostique et diagnostique fréquemment utilisé en anatomo-pathologie. Ce compte a une valeur déterminante dans le diagnostic et le pronostic de nombreuses tumeurs comme dans les tumeurs des tissus mous, dans le grade SBR des adénocarcinomes mammaires ou dans les méningiomes.

Cependant, l'identification correcte des figures de division cellulaire est variable en fonction des phases de la mitose : aisée pendant les phases centrales où la condensation chromatinienne est maximale, elle est plus délicate pour les prophases débutantes, caractérisées

par la condensation progressive du matériel nucléaire et pour les télophases tardives où se déroule le procédé inverse.

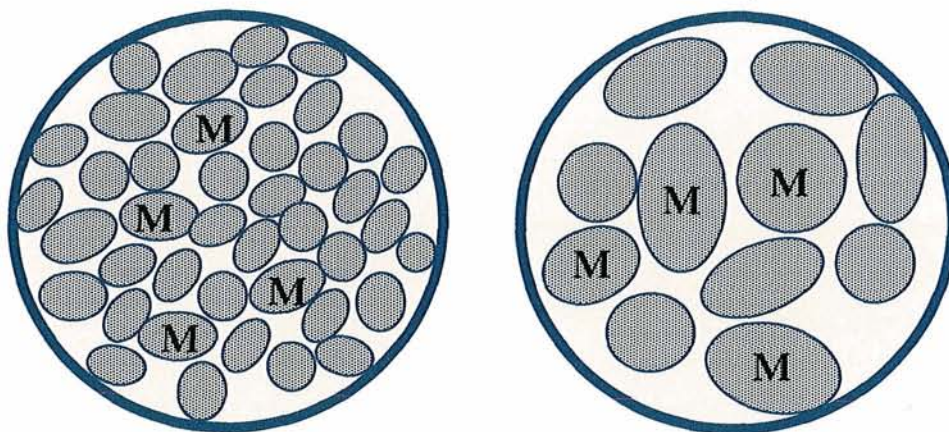
Des critères cytologiques des cellules en mitose sont proposés par Baak (1)(2) et par le groupe d'Amsterdam : la membrane nucléaire doit être absente ; les chromosomes doivent être condensés, soit en début de condensation (début de métaphase), soit au centre (métaphase, anaphase), soit en cours de séparation (télophase). Les noyaux hyper chromatiques et apoptotiques sont ignorés.

| Critères de sélection des figures de mitoses (résumé d'après Baak et al)                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Absence d'enveloppe nucléaire                                                                              |
| Extensions chevelues du matériel nucléaire                                                                 |
| Cytoplasme pourpre ou bleuté de dimensions supérieures à celles du cytoplasme d'une cellule interphasique. |

De plus, la reproductibilité du compte mitotique (8)(9) nécessite des conditions de comptage identique : cela dépend de l'épaisseur de la coupe, de la zone sélectionnée, du nombre de champs étudiés et du champ de vision de chaque microscope.

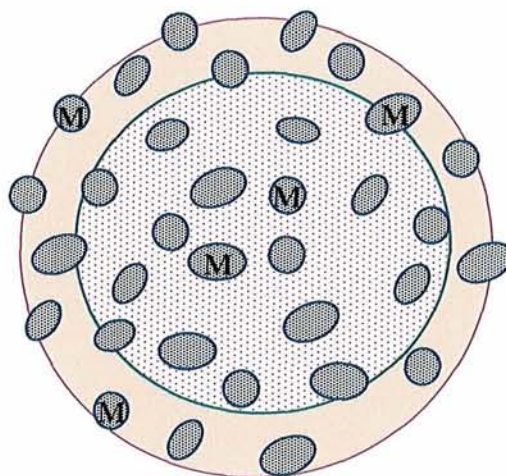
Ainsi, les variations des surfaces analysées sont considérables en fonction des caractéristiques optiques des microscopes. L'aire d'un champ au grossissement 400 varie aux extrêmes de 0,0071 à 0,414 mm<sup>2</sup> soit une variation possible de 600 % (schéma n°7).

Une autre source de variabilité est celle de densité cellulaire d'une tumeur à une autre. Entre une tumeur très densément cellulaire et une tumeur lâche, 10 champs optiques ne permettent pas d'observer le même nombre de cellules (schéma n°8). Un moyen fastidieux, mais scientifiquement plus exact, consiste à apprécier le nombre de mitoses pour un nombre donné de cellules. Cependant, cette méthode est longue et fastidieuse et par conséquent, non applicable en routine.



**Schéma n°7**

**Deux tumeurs différentes sont examinées avec le même microscope.  
La densité cellulaire de la tumeur influence l'indice mitotique pour un nombre de  
champ donné**



**Schéma n°8**

**Un même territoire tumoral est examiné avec deux microscopes différents, à  
grossissement 400. Les aires des champs microscopiques ne sont pas identiques. Il en va  
de même du nombre des mitoses comptées avec chaque microscope.**

Dans le cas où les cellules en division sont réparties de façon homogène dans les tumeurs, ce qui n'est pas le cas dans notre travail du fait du caractère nécrosé des tumeurs, il est possible d'effectuer les comptes dans des territoires choisis au hasard. (22). La périphérie de la tumeur, souvent mieux oxygénée, sera souvent plus active que la zone centrale, moins bien vascularisée, plus souvent nécrosée où siège de remaniements fibreux.

## ***2.2 Délai avant fixation et ses conséquences sur le compte mitotique et sur les indices de prolifération en immunohistochimie***

Des données contradictoires existent sur le compte mitotique et l'influence du délai avant fixation ; certaines équipes observent une nette diminution du compte mitotique en cas de délais avant fixation tandis que d'autres non. En 1990, une étude de Cross et al (9) retrouve une diminution de 30 % de l'indice mitotique dans un tissu colique normal pour un retard de fixation de 2 heures et une baisse de 50 % au-delà de 6 heures.

De même, une étude de Start et Flynn en 1991(37) réalisée au niveau d'adénocarcinomes du sein, a mis en évidence une diminution de l'indice mitotique de 53 % entre une tumeur fixée immédiatement et une tumeur fixée après un délai de 6 heures. En revanche, le degré de différenciation et le pléomorphisme cellulaire (réalisés pour le grade SBR) ne changent qu'au-delà de 6 heures de délai avant fixation. Les hypothèses concernant la diminution des mitoses secondaire à un retard de fixation seraient l'achèvement des mitoses en cours, sans entrée en cycle de nouvelle cellule, et l'autolyse débutante gênant leur reconnaissance.

Dans l'étude de Graem et al (15), les conséquences d'un retard de fixation ont été étudiées sur des ostéosarcomes greffés chez la souris nude. Une baisse du compte mitotique est retrouvée mais également une modification dans la répartition des différentes phases de mitoses avec plus de phases tardives (anaphase et la télophase) que de phases précoces (prophase et la métaphase). Ces résultats ne sont pas unanimement acceptés (3) (4).

Existe-t-il véritablement une diminution des mitoses ou bien n'est-ce qu'un problème de lisibilité et de difficulté d'interprétation, les mitoses devenant moins visibles ?

Une proposition d'explication de ces données contradictoires a été proposée par Donhuijsen (10) qui a observé une diminution de l'indice mitotique en technique histologique, tandis que l'indice restait stable en cytométrie de flux. Il concluait qu'un retard à la fixation avait pour conséquence des difficultés d'interprétation de certaines images évocatrices de cellule pycnotique mais sans véritable diminution de l'indice mitotique.

Si les mitoses sont sensibles à un retard de fixation, qu'en est-il des épitopes recherchés par les indices de prolifération en immunohistochimie ? Certains marqueurs de prolifération comme le PCNA sont très sensibles à un retard de fixation et à une sur fixation formolée. D'autres anticorps ont, en revanche, un marquage plus stable malgré un retard à la fixation ou une ischémie des tissus. Pelstring et al (31) ont étudié la préservation antigénique sur du tissu lymphoïde infiltré par une tumeur épithéliale, laissé à température ambiante : une bonne stabilité des marqueurs leucocyte commun CD45 et d'une pankératine AE1 était retrouvée alors que l'analyse morphologique devenait très difficile.

### ***2.3 Les marqueurs de prolifération***

Tout d'abord, il est nécessaire de préciser les critères d'un indice de prolifération. Il s'agit d'une protéine ou d'un marqueur présent dans une cellule non quiescente donc qui n'est pas en phase G0. Deux critères majeurs pour ces indices ont été définis par van Dierendonck et al (39). Le premier est que l'antigène étudié doit être présent durant tout le cycle cellulaire « actif » c'est-à-dire durant les phases G1, S, G2 et M. Le second est la disparition complète de cet antigène pendant la période non proliférative de la cellule.

Donc, les marqueurs de prolifération étudient le plus souvent les cellules en cycle ou celles qui vont rentrer en phase de mitoses et non les cellules en mitose. En effet, une cellule en cycle peut, pendant la phase G1, soit continuer vers la division soit redevenir quiescente. Ces marqueurs de prolifération mettent donc en évidence des cellules potentiellement en mitose dans un avenir proche. En d'autres termes, ils nous renseignent sur un état de croissance et non sur un taux de croissance contrairement au comptage strict des figures de mitose.

La détection de la protéine Ki-67 avec l'anticorps Mib-1 est fréquemment utilisée sur tissu humain ; mais il ne reconnaît pas les tissus murins à la différence du Ki-67 monoclonal de lapin. Chez la souris, d'autres indices de prolifération sont utilisés (5). Le BrdU, jusqu'ici fréquemment utilisé est un marqueur qui nécessite une pré injection plusieurs heures avant le sacrifice de l'animal ; la molécule est ensuite intégrée dans l'ADN pendant la phase S. Cependant, elle est également incorporée en cas de réparation de l'ADN. Elle est aussi un mutagène et n'est pas convenable pour les études toxicologiques (41). De plus, ce marqueur, une fois intégré dans le génome, peut persister même dans une cellule auparavant en cycle puis

repassée en phase G0. Enfin, cette méthode empêche toute étude rétrospective, le produit devant être injecté *in vivo*.

Le PCNA a été longtemps utilisé. Il s'agit d'une protéine annexe de polymérases nécessaire à la synthèse de l'ADN. Sa détection augmente pendant la phase G1, avec un pic en phase S pour décliner pendant les phases G2 et M. Il existe donc des difficultés d'interprétation, liées à la variabilité d'expression selon les phases du cycle, à la variabilité d'expression selon les cellules tumorales ou non, selon la durée de fixation et la restauration antigénique employée. De plus, il semble ne pas être corrélé strictement aux marquages du BrdU ou du Ki-67. Dans une étude comparative sur les indices de prolifération sur des tissus humains (36) et chez le rat (26), il a été démontré que des anticorps recherchant l'antigène Ki-67 et l'hybridation *in situ* à la recherche d'ARNm d'histone étaient des techniques aussi fiable que celle utilisant le BrdU.

### 2.3.1 Les anticorps dirigés contre la protéine Ki-67

La protéine Ki-67 a été découverte en 1983 (7)(34)(35) et porte le nom de sa ville de découverte, Kiel. Il s'agit d'une protéine exprimée durant les phases G1, S et G2 ainsi que pendant la phase M. Longtemps inconnue, cette protéine correspond à une molécule de 345 à 395 kDa, donc beaucoup plus lourde que les autres protéines du cycle cellulaires telles que les cyclines ou la P53 (12). Elle contient des séries de nucléotides répétées qui correspondent vraisemblablement à l'épitope reconnu ensuite par l'anticorps Ki-67(13).

Hendricks (16) a démontré une grande stabilité de cet antigène à un retard de fixation par des méthodes d'analyse d'image : le signal à l'aide d'un anticorps Ki-67 utilisé chez la souris (Mib-a) est stable malgré des retards allant de 2 à 8 heures, avec une faible diminution après 24 heures de retard. Il s'agit donc d'un marqueur du cycle cellulaire dont la recherche immunohistochimique renseigne sur l'état prolifératif ou non d'un tissu.

L'anticorps Ki-67 clone Mib-1 (Molecular Immunology Borstel) est un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine humaine Ki-67, synthétisée pendant les phases du cycle cellulaire G1, S, G2, et M et localisée dans le noyau. Cet anticorps ne reconnaît pas les cellules murines en cycle contrairement à l'anticorps Ki-67 monoclonal de lapin, non spécifique d'espèce.

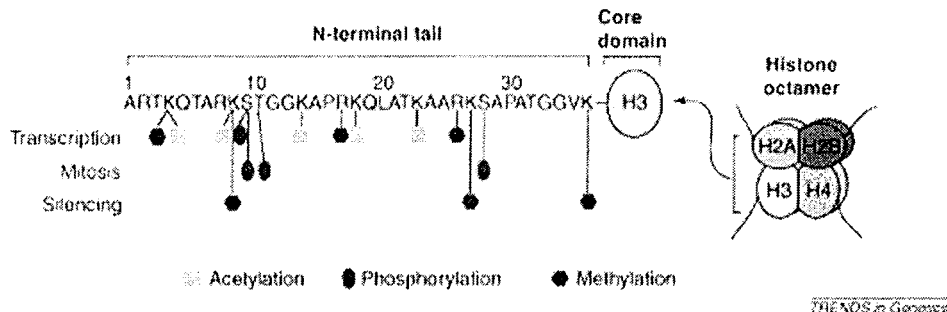
### 2.3.2 L'ICBP 90 : nouveau marqueur du cycle cellulaire

L'anti-ICBP90 (inverted CCAAT box Binding Protein of 90 kDa) (clone 1RC1C-10, protéogénix) est un anticorps monoclonal IgG de souris. Il reconnaît une protéine humaine de 90kDa impliquée dans la régulation de l'expression du gène topoisomérase II alpha (19) (20) (21) (25). Cette protéine est présente dans les noyaux des cellules en cycle cellulaire et absente dans les tissus quiescents. Son expression est anormalement élevée dans certains carcinomes (sein, prostate et colon).

### 2.3.3 L'anticorps anti-phosphohistone H3

Les histones, protéines essentielles associées à la chromatine, sont divisées en deux groupes : les histones sont organisées en octamères, associant deux dimères d'histones appelées H2A et H2B et un tétramère d'histones H3 et H4.

La phosphorylation de l'histone H3 est intimement liée à la condensation chromatinienne survenant à la phase initiale de la mitose (33). Cette phosphorylation survient sur la serine 10 et sur la serine 28 de la chaîne N terminale (28) (29).



Des analyses de cette histone ont montré le début de sa phosphorylation en prophase avec un pic en métaphase. Cette phosphorylation serait nécessaire à la condensation initiale de la chromatine chez les mammifères (23).

Dans certaines études (14) (18) (6), il a été montré une haute spécificité de ce marqueur pour la phase M en l'absence totale de marquage de l'interphase. Ce marqueur est considéré par certains auteurs comme supérieur au compte mitotique pour l'appréciation de la fraction de prolifération. En effet, d'une part la protéine peut être détectée dès la prophase, étape de la mitose toujours difficile à reconnaître sur les coupes histologiques et, d'autre part,

l'immunohistochimie permet aisément la différenciation des télophases des cellules en pycnose.

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES**

## **1. Les animaux**

Toutes les interventions sont réalisées chez l'animal conformément à la législation européenne en vigueur (Directive n° 86/609/CEE, Décrets n°87-848 et n° 2001-131). En particulier, les greffes de tumeurs humaines sont réalisées sous une anesthésie générale obtenue par injection intra péritonéale d'un mélange de Kétamine (Kétalar®, PARKE-DAVIS, Courbevoie, France) et de Xylazine (Rompun®, BAYER, Puteaux, France) à la dose de 10 µL pour 10 g de poids corporel. La solution est préparée de la façon suivante : à 15 mL d'une solution à 10 mg/mL de Ketalar® sont ajoutés 10 mL d'une solution de Rompun® à 2% (v/v) dans du sérum physiologique. Quand cela est nécessaire, les animaux sont euthanasiés par administration intra péritonéale d'une dose létale de cette même solution anesthésique.

## **2. Les greffes**

L'étude des signaux indésirables au niveau des tumeurs ainsi que celle des effets du délai de fixation sur les indices de prolifération cellulaire sont réalisées à l'aide d'un modèle hétérotopique de gliome malin humain chez la souris athymique Swiss nu/nu (Charles River Laboratories, L'Arbresle France), maintenu au laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire sous une forme respirante. Les greffons tumoraux, millimétriques, sont implantés au contact de chacun des pédicules vasculaires iliaques externes. Après l'implantation, la peau est suturée. Les tumeurs sont prélevées lorsque leur plus grand diamètre approche 2 cm. Des prélèvements sont alors réalisés pour étude histologique et d'autres pour greffe sur d'autres souris. Pour la mise en évidence des territoires tumoraux hypoxiques, du pimonidazole (Hydroxyprobe<sup>TM</sup>, Chemicon International, commercialisé par Eurogenex Strasbourg, France) est injecté aux animaux porte-greffe, une heure avant le sacrifice, à la dose de 60 mg/kg (voir ci-dessous).

## **3. Les prélèvements**

### ***3.1 Pour l'étude des signaux immunohistochimiques indésirables***

#### ***3.1.1 Echantillons de tissus murins***

L'étude des signaux immunohistochimiques indésirables est réalisée à partir d'échantillons de peau, de rein, de foie, de poumon, d'intestin, de coeur, d'encéphale, de vessie, de testicule, de vésicules séminales, d'utérus, de glandes salivaires et de muscle squelettique congelés ou inclus en paraffine prélevés chez des souris CBA-CA (don du Pr A Le Faou, Service de Virologie, CHU de Nancy).

Pour la congélation, les échantillons, placés individuellement dans un cryotube, sont simplement déposés dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Des coupes de chacun de ces prélèvements, épaisses de  $5\text{ }\mu\text{m}$ , réalisées au cryostat, sont montées sur des lames ordinaires. Les sections subissent alors l'un des traitements suivants : 1) un séchage de 20 minutes à température du laboratoire suivi d'une fixation dans une solution de formol à 10 % (v/v) dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4 pendant 5 minutes puis d'un bref rinçage dans un tampon PBS, 2) une fixation sans séchage préalable de 5 minutes dans la solution formolique précédemment décrite suivie d'un bref rinçage dans un tampon PBS, 3) enfin, un séchage de 20 minutes, les coupes étant ensuite fixées par du formaldéhyde sous forme de vapeur. Pour ce faire, les lames sont placées dans un bocal de conserve en verre, contenant un bécher de 6 g de paraformaldéhyde. Le degré d'humidité de l'atmosphère du bocal est standardisé par ajout dans ce dernier de 100mL d'une solution aqueuse à 30 % (v/v), d' $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Les bocaux, préparés la veille de leur utilisation, sont conservés jusqu'à l'emploi dans une étuve à  $37^{\circ}\text{C}$ . La fixation elle-même se déroule à la température du laboratoire pendant 20 minutes. Elle est suivie d'un rinçage au PBS.

Pour les échantillons fixés, les tissus sont immergés dans du formol tamponné pH 7,4 à 10 %, dans environ 20 fois leur volume, pendant 16 heures à la température du laboratoire. Les prélèvements sont ensuite inclus dans de la paraffine à l'aide d'un automate V.I.P.<sup>TM</sup> (Sakura, Paris, France). Des coupes de  $5\text{ }\mu\text{m}$  sont réalisées et étalées à l'eau distillée sur des lames prétraitées à la polysine<sup>TM</sup> (MENZEL-GLASER®).

Pour l'étude des signaux non désirés observés sur les tissus murins, un prélèvement autopsique d'un poumon de rat est également étudié. Il s'agit d'un fragment de tissu pulmonaire prélevé chez un rat décédé d'un adénocarcinome peu différencié chimioinduit avec des métastases pulmonaires. Sur le prélèvement de poumon, fixé dans du formol à 10 % puis inclus en paraffine, des coupes de  $5\text{ }\mu\text{m}$  sont réalisées puis étalées à l'eau distillée sur des lames traitées à la polysine<sup>TM</sup>.

### *3.1.2 Greffons de tumeurs gliales*

Deux greffons de glioblastomes humains, mesurant au moins 1 cm dans leur plus grand axe sont prélevés chez des souris euthanasiées ou anesthésiées. Chaque tumeur est immédiatement découpée en 2 fragments ne mesurant pas plus de 3 mm d'épaisseur. Une moitié est congelée et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$  tandis que l'autre est fixée au formol à 10 % (v/v) dans un tampon phosphate pH 7,4. Après une fixation de 24 heures, les échantillons sont inclus dans de la paraffine en suivant les procédés habituels.

Pour les prélèvements en paraffine, des coupes de 5  $\mu\text{m}$  sont étalées à l'eau distillée sur lames pré traitées à la polysine<sup>TM</sup> ; pour les prélèvements congelés, des coupes de 5  $\mu\text{m}$  sont étalées sur lames ordinaires et sont soit immédiatement fixées dans du formol à 10 % (v/v), soit séchées pendant 20 minutes à la température du laboratoire puis fixées dans du formol à 10 % (v/v).

### *3.2 Pour l'étude des effets du délai de fixation sur les indices de prolifération cellulaire*

Sept greffons de glioblastomes humains, mesurant au moins 1 cm dans leur plus grand axe sont prélevés chez des souris euthanasiées ou anesthésiées. Chaque tumeur est immédiatement découpée en 12 fragments ne mesurant pas plus de 3 mm d'épaisseur. Ces fragments sont séparés en deux lots. Le premier sert à étudier les effets du délai de fixation dans le cas où les tissus sont conservés à  $4^{\circ}\text{C}$  avant leur fixation par voie chimique. Les échantillons constituant le deuxième lot sont, quant à eux, conservés à température du laboratoire, humidifiés dans du sérum physiologique pour limiter leur dessèchement. Dans chaque série, un échantillon est immédiatement fixé au formol à 10 % (v/v) dans un tampon phosphate pH 7,4. Les autres échantillons sont fixés avec des délais respectivement de 1 heure, 3 heures, 6 heures, 12 heures et 24 heures dans le même fixateur. Après une fixation de 24 heures, les échantillons sont inclus dans de la paraffine en suivant les procédés habituels.

## 4. Les techniques immunohistochimiques

### *4.1 Pour la détermination des conditions optimales de limitation des signaux non souhaités*

#### *4.1.1 Mise en évidence des signaux gênant l'analyse des résultats techniques immunohistochimiques de routine lors de leur application à des tissus murins*

Les techniques immunohistochimiques sont le plus souvent réalisées en deux étapes principales successives. La première correspond à l'incubation des coupes dans une solution d'un anticorps primaire spécifique de l'antigène recherché. Après un rinçage ayant pour but d'éliminer les molécules d'anticorps non complexées à leurs cibles spécifiques, cette étape est suivie de l'application d'un système de révélation des anticorps primaires plus ou moins complexe. Ce dernier peut lui-même générer des signaux n'ayant pas de rapport avec l'antigène recherché. Pour reconnaître l'existence de ces colorations parasites, il suffit de réaliser des techniques en omettant l'anticorps primaire. Le système de révélation le plus utilisé en routine diagnostique fait appel à un anticorps secondaire dirigé contre les IgG (H+L) de souris, biotinylé, puis à une incubation dans une solution de streptavidine peroxydase, l'activité peroxydasique étant, elle-même, mise en évidence à l'aide d'un milieu d'incubation conduisant à la production d'un produit coloré insoluble. Cet anticorps secondaire réagit avec les différentes classes de chaînes lourdes et légères des immunoglobulines de souris. Il reconnaît donc à la fois les segments Fc et F(ab')<sub>2</sub> des IgG et réagit avec les autres classes d'immunoglobulines puisque ces dernières partagent les mêmes chaînes légères. Dans notre travail, la recherche de ces colorations non voulues est réalisée tant sur des coupes de tissus congelés, post fixées ou non, au formol en milieu liquide ou gazeux, tel que décrit ci-dessus, ainsi que sur des sections de tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine.

Les coupes de tissus congelés sont réhydratées par immersion dans un tampon PBS et les images sont cerclées à l'aide d'un crayon hydrophobe (Dako pen). Elles sont ensuite incubées dans une solution d'un antisérum de chèvre anti IgG (H+L) de souris, biotinylé, (E 433, Dakocytomation, Trappes, France) dans un tampon PBS tween, utilisé aux dilutions suivantes (1/200<sup>ème</sup> ; 1/400<sup>ème</sup> , 1/800<sup>ème</sup> , 1/1600<sup>ème</sup>) pendant 1 heure en chambre humide à température du laboratoire. Après deux brefs rinçages à la pissette, les lames sont incubées pendant une heure à température ambiante, en chambre humide, dans une solution de

streptavidine peroxydase (P 397, Dako) au 1/200<sup>ème</sup> dans un tampon PBS tween. Après deux brefs rinçages réalisés à la pissette avec du tampon PBS tween, l'activité peroxydasique est révélée pendant 5 minutes à l'abri de la lumière à l'aide du milieu prêt à l'emploi Novared<sup>TM</sup> (Vector laboratories, commercialisé par les laboratoires AbCys, Paris, France). Les coupes sont ensuite rincées à l'eau osmosée puis contre colorées pendant 10 secondes à l'hématoxyline de Harris, rincées à l'eau osmosée et bleuies par un bref passage dans un tampon Tris-HCL 0,1M pH 8. Après déshydratation dans l'éthanol et passage dans le toluène, elles sont recouvertes d'une lamelle montée à l'Eukitt®.

Les techniques utilisées pour les prélèvements en paraffine sont superposables à quelques différences près. Les coupes sont tout d'abord déparaffinées par immersion sous agitation dans un bain de toluène pendant 10 minutes. Elles sont ensuite réhydratées par passage dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (alcool absolu puis alcool à 95°) pendant 10 minutes pour finir immergées pendant 10 minutes au moins dans de l'eau distillée. Une inversion des conséquences de la fixation formolique est ensuite réalisé. L'hydrolyse des produits d'addition du formaldéhyde aux macromolécules tissulaires est pratiquée à l'autocuiseur, en tampon citrate 0,1M pH 6, en suivant les indications du fabricant (2100, Retriever, Protéogénix, Strasbourg, France). En pratique, les lames immergées dans le tampon sont dans un premier temps portées à la température de 120° C sous haute pression pendant 10 minutes ; la température décroît ensuite progressivement pendant deux heures. Les activités peroxydasiques et pseudoperoxydasiques endogènes sont bloquées après l'incubation dans la solution d'anticorps secondaire par une immersion des coupes de 15 minutes à la température du laboratoire dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6 % (v/v) dans de l'eau distillée.

La signification des signaux observés sur les préparations ainsi réalisées est variable. Ces derniers peuvent, en effet, correspondre 1) à des immunoglobulines de souris en position cytoplasmique, membranaire ou interstielle, 2) à de la biotine endogène du fait de l'utilisation d'un montage faisant appel à la streptavidine, 3) à une activité peroxydasique ou pseudo peroxydasique, présente au sein des coupes, sans relation avec le système de détection de l'anticorps primaire, 4) enfin, à des antigènes sans relation avec des immunoglobulines de souris (réactions croisées). Pour distinguer ces différents signaux, nous avons réalisé sur des coupes adjacentes aux précédentes la mise en évidence de l'activité peroxydasique ou pseudoperoxydasique endogène par une incubation dans la solution de révélation Novared<sup>TM</sup> précédemment citée. Par ailleurs, nous avons comparé les signaux obtenus avec le montage

utilisant l'anticorps anti IgG (H+L) de souris précédemment décrit d'une part et un autre ne comportant, après le blocage de l'activité peroxydasique et pseudoperoxydasique endogène, qu'une étape d'incubation dans une solution d'un anticorps secondaire de lapin anti Ig G (H+L) de souris sur lequel est greffé un micropolymère de peroxydase l'ImPRESS<sup>TM</sup> (MP-7401, Vector Laboratories, commercialisé par AbCys, Paris, France)(voir schéma n°5) Ce dernier montage ne fait pas appel au couple streptavidine biotine et permet ainsi, par comparaison avec les signaux obtenus avec la technique précédente, de reconnaître les colorations liées à la présence de biotine endogène. Enfin, pour vérifier que certains signaux n'étaient pas secondaires à l'utilisation de l'anticorps de lapin anti IgG (H+L) de souris à des concentrations trop élevées, nous avons comparé les résultats obtenus avec cet anticorps à ceux observés, dans les mêmes conditions de concentrations, avec des tissus humains congelés ou fixés au formol.

Les immunoglobulines présentes dans l'espace interstitiel peuvent diffuser à travers les membranes plasmiques des cellules mortes ou en souffrance donnant lieu à des colorations cytoplasmiques plus rarement nucléaires trompeuses. Par ailleurs, les territoires hypoxiques des greffons tumoraux peuvent être mis en évidence par détection immunohistochimique des adduits formés par l'interaction du pimonidazole avec les macromolécules tissulaires dans les conditions hypoxiques. Ces territoires correspondent non seulement aux zones de nécrose de coagulation constituée, mais également à des plages plus ou moins étendues de cellules en souffrance situées entre la nécrose elle même et un manchon immédiatement péri vasculaire de cellules bien oxygénées. Nous avons cherché à savoir si l'augmentation de la perméabilité membranaire aux protéines était concomitante du développement d'une hypoxie en comparant sur des coupes de glioblastome immédiatement adjacentes, la distribution des territoires hypoxiques et celles des immunoglobulines intracellulaires. Cette recherche est réalisée sur les coupes à congélation de trois greffons différents. Les immunoglobulines extravasculaires sont mises en évidence comme décrit ci-dessus. Les adduits du pimonidazole, quant à eux, sont détectés à l'aide d'une technique faisant appel tout d'abord à un anticorps monoclonal de souris détectant spécifiquement les adduits du pimonodazole (anticorps MAB-1, Chemicon International, Eurogenex, Strasbourg, France), dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans le diluant des anticorps primaires, puis un anticorps secondaire de lapin dirigé contre les IgG<sub>1</sub> de souris, dont l'utilisation permet de limiter fortement le bruit de fond lié aux immunoglobulines extravasculaires (voir ci-dessous).

La quantification de l'intensité des signaux observés est réalisée de façon semi quantitative en utilisant un système en trois classes d'intensité croissante.

Pour compléter les résultats obtenus sur le tissu murins, nous avons également étudié des fragments de tissu pulmonaire de rat siège de métastases parenchymateuses et d'embolies tumorales endovasculaires. Sur ces prélèvements, une étude immunohistochimique est réalisée sur des coupes adjacentes avec les anticorps secondaires suivants : 1) un anticorps de chèvre anti IgG (H+L) de souris biotinylé dilué au 1/200<sup>ème</sup> ; 2) un anticorps dirigé contre la chaîne lourde  $\gamma 1$  des IgG de souris dilué au 1/1000<sup>ème</sup> comme décrit ci-dessous. Après incubation de ces anticorps secondaires une heure à la température du laboratoire, les lames sont rincées avec du tampon PBS, puis incubées pendant une heure avec une solution de streptavidine diluée au 1/200<sup>ème</sup> à température ambiante puis révélées avec une solution prête à l'emploi de Novared<sup>TM</sup>. Les résultats obtenus sont comparés à ceux observés après mise en évidence de l'activité peroxydasique endogène et de la biotine endogène.

#### *4.1.2 Mise en évidence des colorations indésirables après détection de l'anticorps primaire murin par un anticorps secondaire de lapin anti IgG1 de souris, biotinylé, suivi d'une incubation dans une solution de streptavidine peroxydase*

Cette technique fait appel à un anticorps secondaire de lapin, purifié par affinité, biotinylé, complémentaire de la chaîne lourde gamma 1 des IgG. La réactivité croisée avec les autres chaînes lourdes des immunoglobulines est faible (1 %) et l'anticorps ne reconnaît pas les chaînes légères kappa et lambda. Il ne présente donc pas de réaction croisée avec les IgG autres que les IgG<sub>1</sub>, les IgM et les IgA. Le principe de la technique repose alors sur le fait que les anticorps monoclonaux de souris les plus souvent utilisés sont des IgG1 et sur la faible concentration relative de cette sous-classe parmi les immunoglobulines sériques ou localisées à la surface des lymphocytes B. Ce point est particulièrement marqué chez la souris nude. L'anticorps anti IgG1 de souris fabriqué chez le lapin (610-4640, Rockland, commercialisé par Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) est utilisé à la concentration de 1/100<sup>ème</sup>. L'incubation est d'une heure. Elle est réalisée à la température du laboratoire. Les étapes ultérieures de la technique sont identiques à celles utilisées avec l'anticorps de chèvre anti IgG (H+L) de souris décrite ci-dessus.

*4.1.3 Analyse des signaux non souhaités après pré incubation des coupes dans une solution de fragments résultant de la digestion complète de l'anticorps de lapin dirigé contre les IgG (H+L) de souris*

La digestion par la papaïne des immunoglobulines en présence de L-cystéine conduit, quand elle est complète, à la formation de deux fragments Fab et d'un fragment Fc. Dans notre travail, nous avons utilisé, pour préparer les fragments Fab, des fractions purifiées d'immunoglobulines de lapin anti immunoglobulines de souris, qui réagissent avec les sous classes IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 des IgG de souris, les IgA et les IgM (Dako, Z 0259). Pour la digestion, à 1mL de la solution d'immunoglobulines à 3,2 mg/mL sont ajoutés 20 µL d'une solution de L-cystéine 1M (20mM), 2 µL d'EDTA trisodique 0.5M (1mM) pH 7,4 et 12,5 µL d'une solution de papaïne à 110U/mL (11U/mg) (soit 5 % m/m des immunoglobulines). L'incubation est réalisée à 37° C pendant 16 heures au bain marie. L'hydrolyse est arrêtée par ajout de 10 µL d'une solution 1M d'acide iodo-acétique dilué dans de l'eau distillée. La solution est conservée à température ambiante pendant 30 min. Après digestion, la solution d'immunoglobulines est conservée à 4° C dans des tubes hermétiques jusqu'à l'emploi.

La qualité de la digestion est vérifiée par immuno empreinte après séparation électrophorétique des fragments sur un gel de polyacrylamide à 10 % (m/v) en présence d'un témoin de masse moléculaire (LWM 17-0446-01, LMW calibration kit for SDS Electrophoresis, Amersham Biosciences, commercialisé par Parc Technologique, Orsay, France). La migration est réalisée à 100 volts pendant 1 heure 30 dans un tampon d'électrophorèse. Les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide sur des membranes de Poly Vinylidene Di Fluoride (PDVF transfert, PERKIN ELMER, Courtaboeuf, France) par application d'un champ électrique (15 volts pendant 30 minutes). Le succès du transfert est vérifié par une coloration des protéines au Rouge Ponceau. Les membranes sont rincées dans un tampon de transfert pendant 10 minutes, dans un tampon TBS pendant 10 minutes, puis immergées dans une solution de saturation. Les fragments de digestion sont détectés à l'aide d'une technique immunohistochimique indirecte en chémiluminescence (kit chémiluminescence western blotting mouse/rabbit, Roche, Meylan, France).

La solution est testée à plusieurs dilutions, à l'aide du diluant pour anticorps. L'incubation se fait pendant 1, 2 ou 3 heures, à température ambiante, en chambre humide, à l'abri de la lumière. L'incubation de la solution d'immunoglobulines hydrolysées avant dépose de l'anticorps primaire et l'incubation de solution d'immunoglobulines digérées après incubation sur la nuit avec l'anticorps primaire sont comparées. Les lames sont soit rincées au tampon PBS tween, soit juste égouttées.

Cette méthode est étudiée pour la détection de la protéine Ki-67 à l'aide de l'anticorps monoclonal MIB-1 sur des glioblastomes greffés chez la souris nude en congélation et en paraffine.

#### *4.1.4 Analyse des signaux non souhaités par utilisation, comme réactifs primaires, de complexes anticorps primaire/anticorps secondaire formés in vitro.*

Pour limiter le bruit de fond résultant de l'interaction de l'anticorps secondaire anti immunoglobulines de souris avec les immunoglobulines extravasculaires, il est possible de faire réagir ces deux réactifs *in vitro* avant de les appliquer sur les coupes histologiques. L'activité anti Ig de souris résiduelle éventuelle de la solution est neutralisée par une incubation avec une petite quantité de sérum normal ou d'IgG non spécifiques de souris. Dans notre travail, nous avons utilisé :

1) le Kit Zenon (Zénon<sup>TM</sup> Biotin-XX mouse IgG1, Z 25052, Molecular Probes, commercialisé par Interchim, Montluçon, France) en suivant les recommandations du fabricant. Dans ce kit, l'anticorps secondaire apparaît sous la forme de fragments Fab biotinylé, purifiés par affinité, d'un antiserum de lapin dirigé contre l'extrémité Fc des IgG1 de souris.

En pratique, ce kit a été testé sur des coupes d'un glioblastome greffé chez une souris nude avec l'anticorps Ki-67 clone MIB-1 (M 7240, Dako).

Les lames ont été déparaffinées puis réhydratées et le démasquage réalisé en autocuiseur pendant 7 minutes dans du tampon citrate à pH 6. La formation des complexes est réalisée en mélangeant 1 µg d'anticorps soit 10 µL d'anticorps Ki-67 MIB-1 avec 5 µL de solution A du kit Zénon pendant 5 minutes à la température du laboratoire. La solution de blocage B est ajoutée, contenant des immunoglobulines IgG de souris, destinées à neutraliser les fragments Fab biotinylés de la solution A présents en excès. Un délai de 5 minutes est nécessaire avant

l'incubation des lames par les complexes formés. Des temps d'incubation différents ont été réalisés : sur 16 heures à 4° C ou sur une heure à température ambiante en chambre humide et à l'abri de la lumière.

La suite des techniques est identique à celle décrite précédemment, avec successivement des rinçages au tampon PBS-Tween, une inhibition de l'activité peroxydase endogène avec l'eau oxygénée puis une incubation avec la streptavidine pendant 1 heure et enfin une révélation de l'activité peroxydasique avec une solution prête à l'emploi, le Novared<sup>TM</sup>.

2) Nous avons également réalisé une pré incubation en tube avec le même anticorps primaire et un anticorps secondaire IgG (H+L) biotinylé de souris, non fragmenté (E 433, Dakocytomation, Trappes, France). A 100 µL d'anticorps primaire (d'une solution au 1/100<sup>ème</sup>) sont ajoutés 100 µL d'anticorps secondaire (d'une solution au 1/250<sup>ème</sup>). Après une incubation de 5 minutes, 100 µL de la solution de Zenon sont ajoutés. L'application du complexe réalisé sur les lames est effectué de la même manière que ci-dessus.

#### ***4.2 Etude des effets du délai de fixation sur l'appréciation de différents indices de prolifération cellulaire***

##### *4.2.1 Mesure de l'indice mitotique*

Les indices mitotiques sont appréciés sur des coupes de tissus, épaisses de 5µm, colorées à l'Hématoxyline-Eosine-Safran. Après coloration, ces dernières sont observées en immersion, au grossissement 1000, en faisant varier la mise au point afin d'apprécier les cellules dans l'épaisseur de la coupe. Les mitoses sont comptées sur des champs contigus, à distance des zones de souffrance ischémique et de nécrose tumorale. Une attention particulière est portée à distinguer les cellules en mitose de celles dont les noyaux sont en pycnose ou en caryorrhexie. Il n'est pas tenté de reconnaître les prophases débutantes. Le comptage est réalisé deux fois, la valeur retenue étant la moyenne des résultats des deux comptes précédents. L'indice mitotique est exprimé en nombre de cellules en mitose pour 1000 cellules tumorales. Une attention particulière est portée à ne pas compter les cellules murines en cycle ou mitose du stroma.

*4.2.2 Appréciation des cellules en division par mise en évidence immunohistochimique de protéines dont l'expression est synchrone du cycle cellulaire*

Les techniques immunohistochimiques sont réalisées sur des coupes de 5 µm étalées à l'eau distillée sur des lames pré traitées à la polysine. Elles sont séchées une heure sur une platine à 40° C, puis séchées à l'étuve à 37° C durant une nuit. Après déparaffinage, réhydratation et inversion des conséquences de la fixation formolique, une méthode d'immunohistochimie classique en trois couches, faisant appel au couple streptavidine peroxydase/anticorps secondaire biotinylé, est réalisée à l'aide des anticorps primaires suivant : 1) un anticorps monoclonal de lapin dirigé contre la protéine Ki-67 humaine (RM-9106, NeoMarkers, commercialisé par Microm, Francheville, France) non spécifique d'espèce, dilué au 1/300<sup>ème</sup> dans du diluant anticorps, 2) un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine Ki-67 humaine, spécifique d'espèce, clone MIB-1 (M 7240, Dako) dilué au 1/400<sup>ème</sup>, 3) un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'ICBP 90 (Inverted CCAAT box Binding protein) (clone 1RC1C-10, Proteogenix Strasbourg, France) dilué au 1/50<sup>ème</sup>. Il s'agit d'une protéine humaine de masse moléculaire 90 000, impliquée dans la régulation du gène codant la topoisomérase II alpha. Cette protéine est présente dans les noyaux des cellules en cycle et n'est pas présente dans les tissus quiescents, 4) un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'histone H3 phosphorylée (06-570, Laboratoire Upstate cell signaling solution, commercialisé par Euromedex, Strasbourg, France) sur un résidu sérine en position 10, non spécifique d'espèce, dilué au 1/3000<sup>ème</sup>.

Le système de révélation des anticorps monoclonaux de souris Ki-67 clone MIB-1 et ICBP90, choisi en fonction des résultats des techniques précédemment décrites, est un montage faisant appel à l'anticorps polyclonal de chèvre anti IgG1 biotinylé (800-656-7625 Rockland) à la concentration de 1/1000<sup>ème</sup>. L'anticorps monoclonal de lapin dirigé contre la protéine Ki-67 tout comme l'antisérum de lapin anti Histone H3 sont détectés à l'aide d'un anticorps anti lapin biotinylé de chèvre (E432, Dakocytomation, Trappes, France), dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans le tampon PBS-Tween. L'incubation de l'anticorps secondaire est suivie d'un blocage des activités peroxidasique et pseudoperoxydasique endogènes par une incubation de 15 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6 % (v/v) dans l'eau, la biotine est ensuite détectée dans les conditions décrites précédemment à savoir tout d'abord une incubation dans une solution de streptavidine peroxydase (P397, Dakocytomation, Trappes, France) diluée au 1/200<sup>ème</sup> dans du

tampon PBS-Tween, suivie par la mise en évidence des activités peroxydasiques à l'aide de la solution Novared<sup>TM</sup>. L'incubation dans cette dernière solution est de 4 minutes. Les coupes sont ensuite rincées à l'eau osmosée puis contre-colorées pendant 10 secondes à l'hématéine de Harris, puis rincées à l'eau courante et bleuies dans du tampon Tris-HCl 0,1M, pH8. Après déshydratation et passage dans un bain de toluène, les coupes sont recouvertes d'une lamelle montée à l'Eukitt®.

Les indices de prolifération sont mesurés de la même manière que l'indice mitotique. Dans la mesure où aucun bruit de fond n'est observé, tous les signaux nucléaires, même faibles, sont considérés comme témoignant de l'entrée de la cellule en cycle.

## **TROISIEME PARTIE : RESULTATS**

## 1. Les signaux immunohistochimiques indésirables.

### *1.1 mise en évidence des signaux gênant l'analyse des résultats des techniques immunohistochimiques de routine lors de leur application à des tissus murins*

#### *1.1.1 Introduction*

Dans un premier temps, notre travail a consisté à réaliser un relevé des différentes variétés de signaux non souhaités, pouvant gêner l'interprétation des résultats des techniques immunohistochimiques lorsque ces dernières sont réalisées sur des tissus de souris, après utilisation d'anticorps monoclonaux de souris et de systèmes de révélation faisant appel à des sérums dirigés contre les IgG (H+L) de la même espèce. Cette recherche est réalisée sur des tissus de souris inclus dans de la paraffine après fixation formolique ou sur coupes à congélation de tissus post fixées selon les techniques décrites dans le chapitre matériel et méthodes. Ces techniques sont réalisées sur de multiples échantillons issus de trois animaux auxquels sont ajoutés des échantillons de poumons prélevés chez un rat porteur d'un adénocarcinome métastatique chimio induit.

Les signaux suivants sont recherchés :

- 1) des colorations cytoplasmiques, granulaires ou en bâtonnets, observées sur les coupes colorées à l'aide d'un système de révélation faisant appel au couple streptavidine/biotine, non observées après utilisation d'un anticorps secondaire modifié par greffage covalent d'un « micropolymère » de peroxydase ou après mise en évidence des activités peroxydasique ou pseudoperoxydasique endogènes. Ces signaux résultent de la détection de la biotine endogène.
- 2) des colorations granulaires, plus grossières du cytoplasme des polynucléaires et des macrophages, associées à une coloration diffuse avec renforcement membranaire des globules rouges. Ces colorations, également observées sur des coupes contrôle après mise en évidence des activités peroxydasique et pseudoperoxydasique, correspondent à ces activités quand ces dernières ne sont pas préalablement inhibées.
- 3) des colorations cytoplasmiques diffuses, homogènes intenses, du cytoplasme des plasmocytes

- 4) des colorations des membranes plasmiques des lymphocytes B correspondant à des immunoglobulines de membrane
- 5) enfin, des colorations plus diffuses, intra vasculaires, interstitielles ou cytoplasmiques ne correspondant à aucune des catégories précédentes.

La présence de ces colorations non souhaitées dans les différents tissus de souris est résumée dans les tableaux ci-dessous en précisant leur localisation.

L'intensité de ce signal est exprimée de manière semi quantitative :

- + : Signal peu intense
- ++ : Signal modérément intense
- +++ : Signal très intense.

| ORGANES            | MODE DE FIXATION                                                                                    |                                                                                                                              |                                                                                     |                                                                                     |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                    | Fixé dans le formol puis inclus en paraffine                                                        | Congelé                                                                                                                      |                                                                                     |                                                                                     |
|                    |                                                                                                     | Non séchée puis fixée formol                                                                                                 | Séchée puis fixée formol                                                            | Séchée puis fixée vapeur formol                                                     |
| POUMONS            | ++ vaisseaux<br>+ en surface des alvéoles et de l'épithélium bronchique                             | ++ vaisseaux<br>+ mucosécrétion                                                                                              | ++ vaisseaux<br>+ interstitium                                                      | ++ vaisseaux<br>+ interstitium                                                      |
| COEUR              | + vaisseaux                                                                                         | ++ entre les fibres myocardiques<br>+ vaisseaux                                                                              | ++ entre les fibres myocardiques<br>+ vaisseaux                                     | ++ entre les fibres myocardiques<br>++ vaisseaux                                    |
| INTESTINS          | + vaisseaux<br>++ lymphocytes B et plasmocytes intra-muqueux dans axes conjonctifs et sous muqueuse | ++ chorion<br>++ vaisseaux                                                                                                   | + chorion<br>+ vaisseaux                                                            | + axes conjonctifs<br>++ vaisseaux<br>++ granulations interstitielles               |
| FOIE               | ++ vaisseaux et capillaires sinusoides<br>+ biotine endogène intrahépatocytaire                     | ++ vaisseaux<br>+ capillaires sinusoides                                                                                     | ++ vaisseaux<br>+ capillaires sinusoides                                            | ++ vaisseaux<br>+ capillaires sinusoides                                            |
| RATE               | + vaisseaux                                                                                         | +++ plasmocytes et lymphocytes B membranaire signal membranaire<br>+ vaisseaux                                               | +++ plasmocytes et lymphocytes B signal membranaire<br>+ vaisseaux                  | ++ plasmocytes<br>+ dépôts interstitiels<br>+ vaisseaux                             |
| PEAU               | + vaisseaux<br>+ biotine des glandes sébacées                                                       | + vaisseaux<br>+++ derme                                                                                                     | + vaisseaux<br>+++ derme                                                            | Non réalisé                                                                         |
| MUSCLE STRIE       | + vaisseaux                                                                                         | ++ interstitium                                                                                                              | ++ interstitium                                                                     | ++ interstitium                                                                     |
| REINS              | + vaisseaux et dans les capillaires glomérulaires<br>+ biotine dans les tubes contournés proximaux  | ++ interstitium<br>++ capillaires glomérulaires<br>++ vaisseaux                                                              | ++ interstitium<br>++ cellules mésangiales glomérulaires<br>++ vaisseaux            | + capillaires glomérulaires<br>+ interstitiel sous forme de protéines coagulées     |
| VESSIE             | + vaisseaux                                                                                         | ++ entre les fibres musculaires<br>+ vaisseaux                                                                               | ++ entre les fibres musculaires<br>+ vaisseaux                                      | ++ entre les fibres musculaires<br>+ vaisseaux                                      |
| UTERUS             | + vaisseaux                                                                                         | Non réalisé                                                                                                                  | Non réalisé                                                                         | Non réalisé                                                                         |
| CERVEAU            | + vaisseaux intra cérébraux, intra hypophysaire et vaisseaux des plexus choroïdes                   | + +vaisseaux intra cérébraux, intra hypophysaire et vaisseaux des plexus choroïdes <sup>2</sup>                              | + + vaisseaux intra cérébraux, intra hypophysaire et vaisseaux des plexus choroïdes | + + vaisseaux intra cérébraux, intra hypophysaire et vaisseaux des plexus choroïdes |
| TESTICULES         | + vaisseaux<br>+ sécrétions des vésicules séminales                                                 | ++ interstitium entre les tubes séminifères<br>+ contenu des vésicules séminales<br>+ acrosome spermatozoïdes<br>+ vaisseaux | ++ interstitium entre les tubes séminifères<br>+ spermatozoïdes<br>+ vaisseaux      | ++ interstitium et dans la lumière des vaisseaux                                    |
| GLANDES SALIVAIRES | + vaisseaux                                                                                         | + interstitium<br>+ vaisseaux                                                                                                | + interstitium<br>+ vaisseaux                                                       | + vaisseaux                                                                         |

*1.1.2 Les signaux non souhaités dans le cas de tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine*

Dans ce cas, les constatations suivantes peuvent être faites :

1) il n'est pas observé d'activités peroxydasiques ou pseudoperoxydasiques, y compris dans les polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles et les macrophages lorsque les techniques utilisées comportent une étape de blocage enzymatique à l'eau oxygénée.

2) Les signaux liés à la biotine endogène sont observés au niveau des tissus riches en mitochondries, à savoir les hépatocytes, les cellules tubulaires des tubes contournés proximaux du rein, les sébocytes et les adipocytes multi vacuolaires du tissu adipeux brun. Des colorations granulaires sont également observées au pôle apical des cellules séreuses des glandes salivaires. L'intensité du signal est particulièrement élevée au niveau des glandes sébacées et du tissu adipeux brun et après démasquage thermique des conséquences de la fixation formolique. Les signaux hépatocytaires et rénaux sont nettement moins intenses que ceux correspondants observés chez l'homme.

3) Des plasmocytes sont détectés dans le chorion des muqueuses bronchique, intestinale, utérine, dans celui des glandes salivaires, la rate et les structures lymphoïdes périphériques observées au hasard des coupes.

4) En plus des localisations décrites ci dessus, les immunoglobulines sont observées :

a) Dans la lumière des vaisseaux et ceci quelque soit l'organe étudié. A ce niveau, elles se présentent sous la forme de plages finement granuleuses et homogènes dans la lumière des gros vaisseaux ou de liserés denses, plus ou moins épais à la surface des cellules endothéliales. Ces signaux sont plus intenses au niveau de la microcirculation que des vaisseaux de plus grand calibre, dans les artérioles que dans les veinules. Le niveau de résolution rendu possible par l'emploi de coupes à la paraffine ne permet pas de reconnaître une localisation au sein même des cellules endothéliales. L'adsorption des immunoglobulines à la surface des globules rouges peut être à l'origine d'une coloration, apparemment diffuse avec renforcement membranaire de

ces derniers, ressemblant de très près à une activité pseudoperoxydasique. La négativité des contrôles correspondant permet de redresser l'erreur d'interprétation.

b) Dans l'interstitium sur les coupes de tissus normaux inclus dans de la paraffine, il n'est pas détecté de signaux interstitiels. En revanche, le poumon du rat, qui est parsemé de multiples métastases d'un adénocarcinome peu différencié, est le siège d'un œdème alvéolaire diffus, très fortement coloré.

c) Au niveau du poumon métastatique, des signaux très intenses sont observés au niveau du cytoplasme des macrophages alvéolaires. Comme le montre l'absence de coloration sur les coupes témoins correspondantes, ces signaux ne proviennent pas de la présence de biotine ou d'une activité peroxydasique endogène. Ils correspondent donc à des immunoglobulines internalisées. Dans la mesure où l'intensité de la coloration est très supérieure à celle de l'œdème alvéolaire, l'internalisation résulte d'un phénomène actif

En revanche, il n'est pas détecté d'immunoglobulines de membrane ou de signaux épithéliaux pouvant correspondre à des IgA.

### *1.1.3 Dans le cas de coupes à congélation immédiatement post fixées au formol*

Les recherches précédentes ont été répétées sur des coupes de tissus congelés, fixées au formol, sans étape de séchage intermédiaire. La technique pratiquée est identique à celle utilisée pour les tissus inclus à la paraffine à l'exception, cependant, de l'étape d'inhibition des activités peroxydasique ou pseudoperoxydasique, trop délétère pour les tissus.

Dans ces conditions :

Les différents signaux décrits dans le cas des tissus inclus dans de la paraffine sont observés dans les coupes de tissus congelés post fixées mais leur intensité est plus importante.

En plus de ces signaux sont observées :

- \* une coloration interstitielle diffuse, avec renforcement le long des fibres du tissu conjonctif, particulièrement marquée au niveau du derme et, à un moindre degré, de la lamina propria du tube digestif, et de l'interstitium rénal. Au niveau du foie, il est difficile de différencier les immunoglobulines intra vasculaires de celles éventuellement présentes au sein des espaces de Disse.

- \* une coloration des épithéliums de revêtement des muqueuses, avec parfois renforcement apical (épithélium intestinal) correspondant selon toute probabilité à des IgA

\* une coloration membranaire de certains lymphocytes au niveau des organes lymphoïdes périphériques. Au niveau de la rate, ces derniers signaux ne peuvent être différenciés de ceux résultant de l'adsorption sur la membrane des lymphocytes des immunoglobulines circulantes.

\* une coloration dense arciforme, juxtanucléaire, des spermatocytes et des spermatozoïdes, non observée sur les coupes préparées avec un anticorps modifié à l'aide d'un micro polymère peroxydasique et correspondant probablement à une réaction.

Il convient de signaler l'existence de difficultés d'interprétation de signaux, diffus, interstitiels ou épithéliaux peu intenses, pouvant résulter d'un accrochage non spécifique lié à une concentration un peu élevée du système de révélation. Les signaux les moins intenses sont observés avec les dilutions les plus faibles de l'anticorps secondaire. A cette dernière concentration, aucune coloration n'est observée sur des tissus humains traités dans les mêmes conditions.

#### *1.1.4 Dans le cas de coupes à congélation séchées à l'air puis post fixées au formol*

Les signaux correspondant à la biotine endogène et à l'activité peroxydasique et pseudoperoxydasique sont similaires à ceux observés en l'absence de séchage. Le séchage des lames induit une modification dans la morphologie des tissus. Ceux-ci sont moins rétractés, les cellules sont étalées sur la lame. Il en découle moins de désunion au sein des tissus et donc moins de piégeage des anticorps sur le bord des tissus. Le signal obtenu est, par conséquent, moins linéaire, plus diffus et finement granulaire mais globalement d'intensité similaire.

Dans les vaisseaux, le contenu est mieux préservé, les immunoglobulines sériques sont détectées par une coloration du revêtement endothélial et du contenu vasculaire. De même, dans l'interstitium, les protéines semblent coagulées dans le milieu extracellulaire sous la forme d'agréats, lesquels se colorent avec l'anticorps anti Ig. Dans les capillaires glomérulaires, l'endothélium n'est plus signalé sous la forme d'un marquage linéaire. En revanche, il existe une coloration des cellules mésangiales.

#### *1.1.5 Dans le cas de coupes à congélation séchées à l'air post fixées aux vapeurs de formol*

De façon générale, les tissus fixés en vapeur de formol ont un signal moins prononcé. Comme pour les tissus fixés par immersion après séchage, les protéines extracellulaires et intra

vasculaires sont mieux préservées et agglutinées en amas soit dans la lumière, soit dans l'interstitium. Le marquage obtenu est granulaire ou laqué dans les vaisseaux et non linéaire.

Pour quel motif le marquage obtenu est inférieur à celui des tissus fixés par immersion alors que les protéines extracellulaires semblent aussi bien préservées ? Il est probable que la fixation formolique est supérieure et donc que les épitopes recherchés sont masqués.

Dans les intestins, le marquage obtenu dans les villosités intestinales est granulaire tandis que les cellules inflammatoires précédemment colorées ne le sont plus ou peu.

### ***1.2 glioblastome greffé chez la souris***

Les glioblastomes sont des tumeurs comportant souvent de larges plages de nécrose mais également riches en vaisseaux. Dans les prélèvements de tumeur gliale fixée dans le formol et incluse en paraffine, plusieurs types de signaux sont observés. Au sein des vaisseaux est retrouvé le même aspect que celui précédemment décrit avec des dépôts endoluminaux d'immunoglobulines et en surface de l'endothélium. Par ailleurs, il existe un accrochage non spécifique de tous les anticorps utilisés sur la nécrose, dont l'intensité est fonction de la qualité des rinçages.

En congélation, que les tissus soit fixés immédiatement dans le formol ou séchés puis fixés en formol ou en vapeur de formol, des signaux intenses sont retrouvés. En périphérie des plages de nécrose, des cellules tumorales dont le cytoplasme est rétracté sont marquées par l'anticorps anti immunoglobulines de souris (H+L) sous forme d'un marquage intra cytoplasmique intense. Ces cellules sont probablement des cellules ischémiques en voie de nécrose. A distance et en périphérie des vaisseaux, les cellules tumorales sont de plus grande taille, sans rétraction du cytoplasme. Elles ne sont pas marquées par l'anticorps anti- immunoglobuline. L'anticorps MAB-1 met en évidence les zones tissulaires ischémiques par un marquage intra cytoplasmique des cellules tumorales, lesquelles sont situées à distance des vaisseaux. Bien que la quantité de cellules ischémiques détectées à l'aide de l'anticorps MAB 1 soit supérieure au nombre de cellules marquées avec l'anticorps anti immunoglobulines, il existe une corrélation entre ces deux marquages. En conclusion, les cellules ischémiques en voie de nécrose contiennent des immunoglobulines intra cytoplasmiques.

## 2. Comparaison de méthodes de limitation de bruit de fond

Plusieurs méthodes de réduction du bruit de fond ont été testées. Dans la mesure où les signaux non souhaités les plus intenses sont observés au niveau des coupes congelées, post fixées au formol liquide, c'est sur des tissus sains ou tumoraux pré traités de cette manière que ces essais ont été réalisés dans un premier temps, puis sur tissus tumoraux inclus en paraffine.

### 2.1 *Pré incubation des lames par une solution bloquante*

Dans un premier temps, nous avons testé un blocage immunologique des épitopes des immunoglobulines (et dans le même temps des récepteurs des fragments Fc) par incubation des coupes dans une solution d'immunoglobulines de lapin complètement digérées par la papaïne, réalisé en tout début de technique. La complétude de la digestion des immunoglobulines est, dans un premier temps, vérifiée par immuno empreinte. Plusieurs concentrations de la solution de blocage sont testées. Les blocages les meilleurs sont observés avec les concentrations au 1/2 et au 1/4. L'inhibition des signaux liés aux immunoglobulines n'est cependant que très partielle et l'intensité des signaux spécifiques plus faible que celle obtenue avec la technique de référence. Bien entendu, les signaux liés à la biotine endogène et aux activités peroxydasique et pseudoperoxydasique ne sont pas modifiés.

### 2.2 *Modification du système de révélation par l'anticorps secondaire*

#### 2.2.1 *Utilisation d'un anticorps secondaire anti IgG1 de souris biotinylé, fabriqué chez le lapin*

Pour tous les tissus murins ayant fait l'objet de l'étude immunohistochimique à l'aide de l'anticorps de chèvre anti souris (H+L) biotinylé, la comparaison avec l'anticorps IgG1 a montré une diminution très nette du signal lié aux immunoglobulines que ce soit en paraffine ou en congélation. Cet anticorps ne reconnaît que la chaîne lourde des IgG1, lesquelles sont peu abondantes dans le milieu extravasculaire. Sur l'ensemble des prélèvements fixés en paraffine, les signaux présents dans les lumières vasculaires ont diminué ou disparu. Pour les prélèvements en congélation, une diminution du signal a été observée aussi bien dans les vaisseaux que dans le

tissu interstitiel. Très importante pour les tissus musculaires lisses et striés, les testicules, la rate, cette diminution a été moins prononcée dans le rein, le derme et le poumon.

Au final, l'utilisation de l'anticorps secondaire anti IgG1 est une méthode satisfaisante, qui diminue le signal lié aux immunoglobulines circulantes et situées en surface de l'endothélium. Elle permet également de diminuer de façon plus modérée les signaux liés aux immunoglobulines extravasculaires. Il s'agit d'une méthode simple d'utilisation et reproductible, améliorant nettement la qualité des études immunohistochimiques.

### *2.2.2 Utilisation de complexes anticorps primaire /anticorps secondaire biotinylé formés in vitro*

La méthode de pré incubation en tube réalisée à l'aide du kit Zénon de Molecular probes donne des résultats satisfaisants dans leur ensemble.

La détection de cellules en cycle repérées à l'aide de l'anticorps Ki-67 clone MIB-1 donne un signal net des cellules, sans que la nécrose, les cellules ischémiques ou les immunoglobulines intravasculaires ne soient marquées.

De la même façon, la pré incubation réalisée avec un anticorps secondaire biotinylé non fragmenté, a donné des résultats satisfaisants, dépourvus de bruit de fond, avec un signal légèrement moins marqué.

Toutefois, à plusieurs reprises, certaines séries immunohistochimiques n'ont pas fonctionné sans que le motif ne soit retrouvé. Ces aléas ont été observés bien que les recommandations du kit du Fournisseur (Molecular Probes) aient été suivies. Cette technique est, par conséquent, intéressante pour la diminution parfois complète des signaux liés aux immunoglobulines, mais nécessite un calibrage de départ pour chaque anticorps primaire, une préparation des complexes au dernier moment.

## **Planche n°1**

**Photo n°1** : technique immunohistochimique classique en trois couches sur une peau de souris fixé dans le formol et inclus dans de la paraffine (x400).

Détection de la biotine endogène dans les glandes sébacées sous forme d'un marquage finement granulaire intra cytoplasmique.

**Photo n°2** : tissu ganglionnaire de souris fixé dans le formol et inclus dans de la paraffine. Etude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x400).

Détection des immunoglobulines intra cytoplasmiques et membranaires des plasmocytes.

**Photo n°3** : glioblastome humain greffé chez une souris nude ; tissu congelé, fixé 5 minutes en formol. Etude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200).

Détection des immunoglobulines de souris dans les vaisseaux et dans les zones de nécrose

**Photo n°4** : comparaison des zones ischémiques tumorales.

**4a** : étude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200).

Marquage intra cytoplasmique granulaire des cellules situées en périphérie des plages de nécrose.

**4b** : étude immunohistochimique avec l'anticorps MAB-1 suivi d'un anticorps secondaire dirigé contre la chaîne lourde des IgG1 (x200).

Marquage intra cytoplasmique granulaires des cellules situées en périphérie des plages de nécrose, quasi superposable à la précédente photo.

**Photo n°5** : rein de souris fixé dans le formol et inclus dans de la paraffine. Etude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x400).

Détection des immunoglobulines intra vasculaires, adsorbées en surface du revêtement endothélial. Inhibition totale de l'activité pseudo peroxydasique endogène des globules rouges avec l'eau oxygénée.

**Photo n°6** : rein de souris congelé, fixé immédiatement. Etude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200).

Détection des immunoglobulines endogènes dans la lumière des vaisseaux, dans le tissu conjonctif péri vasculaires. Signal dans les tubes contournés et dans la graisse brune.

**Photo n°7** : poumon de souris congelé, séché puis fixé en vapeur de formol. Etude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200).

Détection des immunoglobulines intra vasculaires coagulées dans l'interstitium, adsorbées en surface de l'endothélium et contenues dans le sérum.

**Photo n°8** : rein de souris congelé, fixé immédiatement. Témoin négatif ne comportant que l'étape d'incubation avec la streptavidine suivi de la révélation de l'activité peroxydasique (x200).

Signaux dans les tubes rénaux et dans la graisse brune correspondant à la biotine endogène.

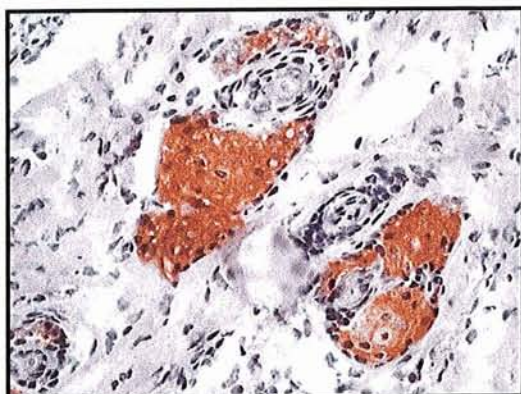


Photo n°1

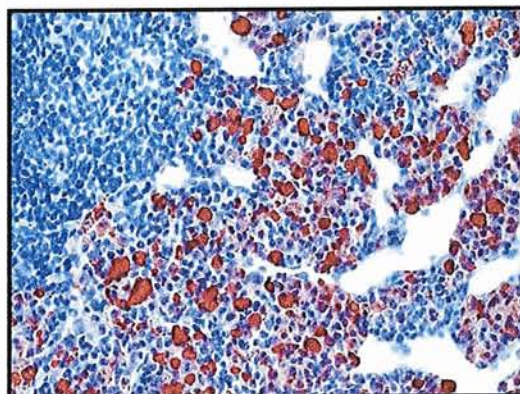


Photo n°2

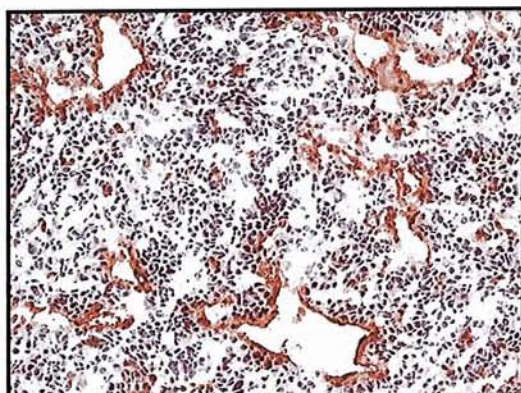


Photo n°3

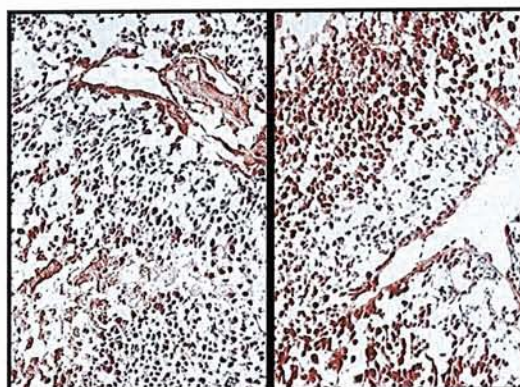


Photo n°4a

n°4b

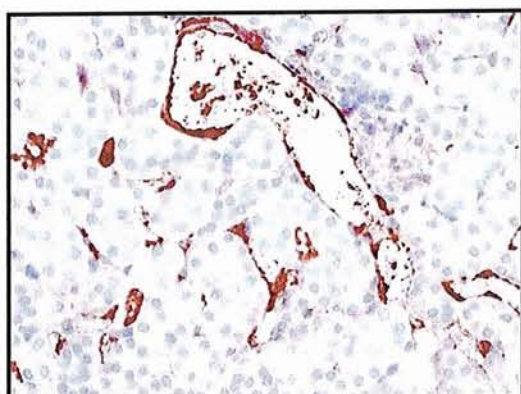


Photo n°5

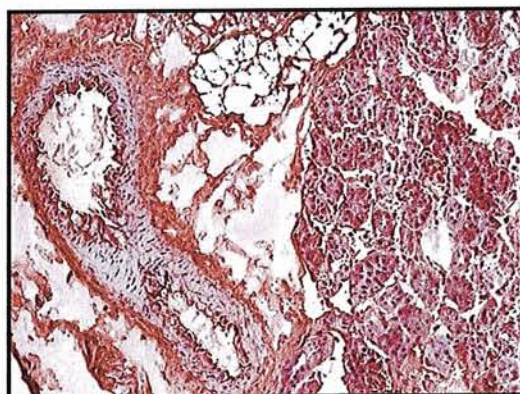


Photo n°6

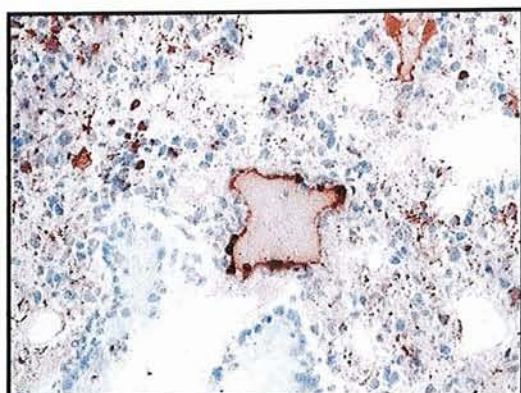


Photo n°7

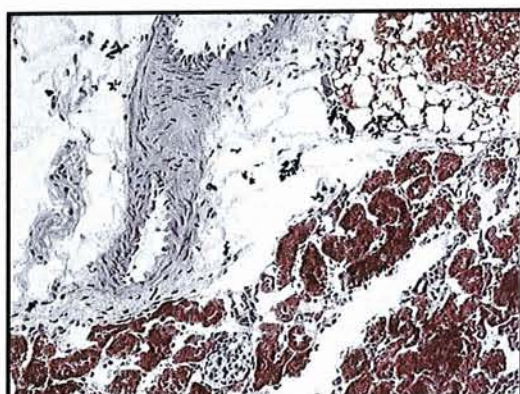


Photo n°8

## Planche n°2

**Photo n°1a** : poumon de souris fixé dans le formol et inclus dans de la paraffine. Etude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris. (x 100). Les Ig sont essentiellement intra vasculaires.

**Photo n°1b** : poumon de souris séché et fixé dans le formol. Etude immunohistochimique avec l'anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200). Les Ig sont localisées dans les vaisseaux, l'interstitium et les plasmocytes.

**Photo n°2** : testicule de souris congelé, séché puis fixé dans le formol.

**2a** : étude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200)

**2b** : étude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG1 (H) de souris (x200)

Pour un même mode de fixation, la détection des Ig endogènes, localisées dans l'interstitium, est nettement diminuée avec l'anticorps anti IgG1.

**Photo n°3a** : rein de souris fixé dans le formol et inclus dans de la paraffine. Etude immunohistochimique avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x400)

Les Ig endogènes sont localisées dans les vaisseaux, surtout de petits calibres.

**Photo n° 3b** : rein de souris congelé, fixé immédiatement du formol. Etude immunohistochimique avec ImmPRESS (anticorps anti IgG (H+L) de souris couplé à un micropolymère de peroxydase) (x 400)

La biotine endogène n'est pas détectée. Les Ig sont localisées dans les vaisseaux et dans l'interstitium.

**Photo n°4** : rein de souris congelé, séché puis fixé dans le formol.

**4a** : étude avec ImmPRESS : localisation mésangiale des Ig (x 400)

**4b** : étude IHC avec anticorps anti IgG1 (H) (x 400)

Diminution nette du signal lié aux Ig.

**Photo n°5** : intestins de souris congelés ; étude avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris

**5a** : coupe fixée immédiatement dans le formol (x400)

**5b** : coupe séchée puis fixée dans le formol (x400)

Le séchage des lames préserve mieux les Ig intestinales qui sont coagulées. Détection des IgA en surface des entérocytes.

**Photo n°6** : intestins de souris congelés. Coupes séchées puis fixées en vapeur de formol

**6a** : étude IHC avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200)

**6b** : étude IHC avec un anticorps anti IgG1 (H) (x200)

Avec la vapeur de formol et dans les mêmes conditions, les Ig sont moins détectées.

L'anticorps anti IgG1 (H) détecte moins d'Ig.

**Photo n°7** : foie de souris

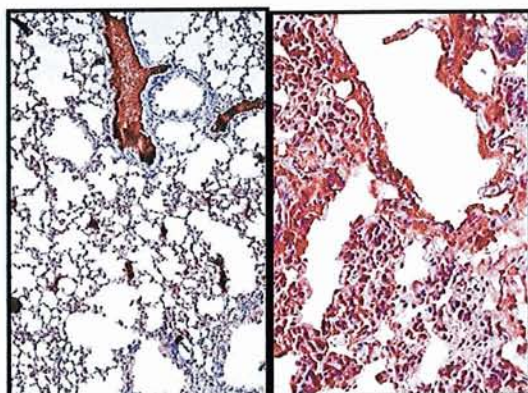
**7a** : tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine. Etude avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200). La biotine endogène donne un marquage intracytoplasmique granulaire.

**7b** : tissu congelé, séché puis fixé. Etude avec ImmPRESS (x200). Détection des Ig dans les capillaires sinusoides.

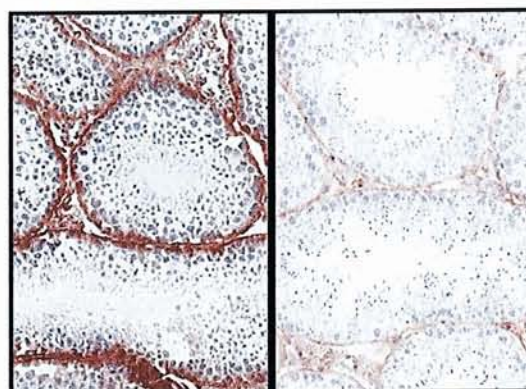
**Photo n°8** : foie de souris congelé, coupes séchées puis fixées en vapeur de formol.

**8a** : étude avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (x200)

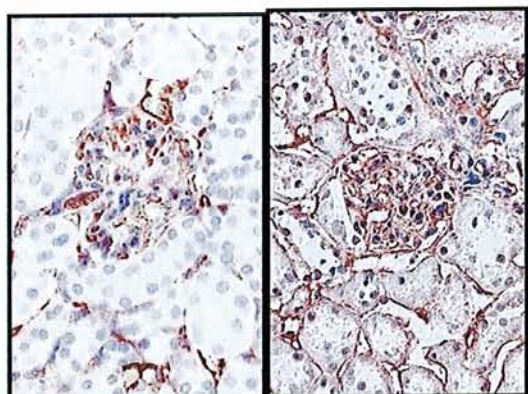
**8b** : étude avec l'anticorps anti IgG1 (H) (x200)



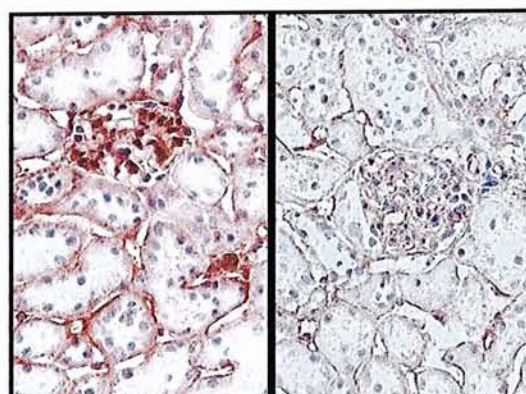
Photos n°1a n°1b



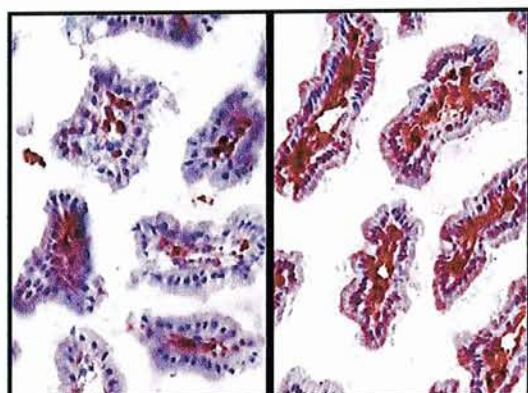
Photos n°2a n°2b



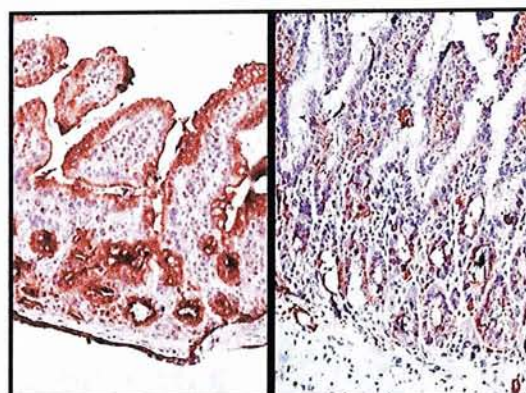
Photos n°3a n°3b



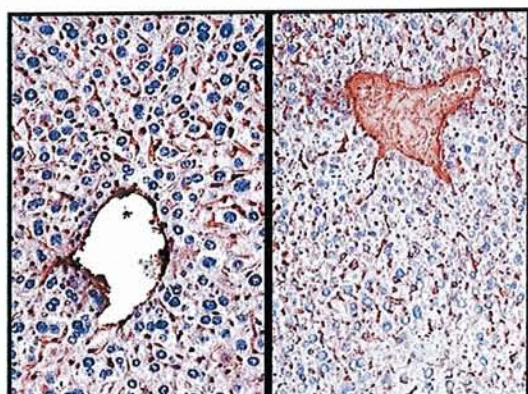
Photos n°4a n°4b



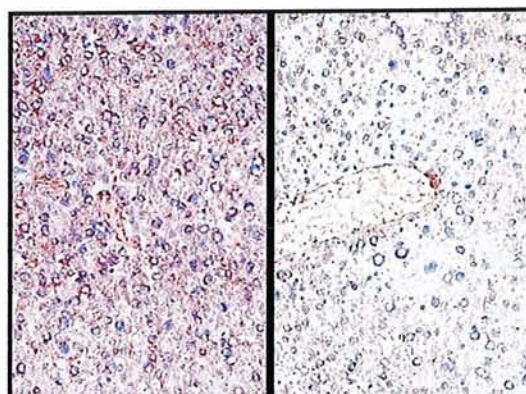
Photos n°5a n°5b



Photos n°6a n°6b



Photos n°7a n°7b



Photos n°8a n°8b

### **Planche n°3**

**Photo n°1, 2, 3, 4** : poumon d'un rat avec un néoplasme métastatique. Tissu fixé dans le formol et inclus dans de la paraffine.

**Photo n°1** : témoin négatif. Montage IHC avec la streptavidine et la révélation peroxydasique. (400). Pas de détection de biotine endogène ou d'activités peroxydasique et pseudo peroxydasique résiduelles.

**Photo n°2** : étude IHC avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (400). Marquage intra cytoplasmique des macrophages.

**Photo n°3** : étude IHC en trois couche avec une cytokératine 7 puis un anticorps secondaire anti IgG (H+L) de souris puis la streptavidine. (400).

**Photo n°4** : étude IHC avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris(100). Marquage intra cytoplasmique des macrophages. Signal observé autour des embolus tumoraux vasculaires, l'inhibition de l'activité peroxydasique étant complète.

**Photo n°5** : glandes salivaires de souris, fixées dans le formol puis incluses dans de la paraffine.

**5a** : étude IHC avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (400). Marquage intra cytoplasmique des cellules glandulaires et intra vasculaires

**5b** : étude IHC avec ImmPRESS.(400) Disparition du marquage intra cytoplasmique correspondant à de la biotine endogène.

**Photo n°6** : tubes séminifères de souris. Tissu congelé, coupes séchées puis fixées dans le formol. Etude IHC avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (400). Réaction croisée au niveau de l'acrosome.

**Photo n°7** : muscle de souris. Tissu congelé, coupes séchées puis fixées dans le formol. Etude IHC avec un anticorps anti IgG (H+L) de souris (400). Signal interstitiel important.

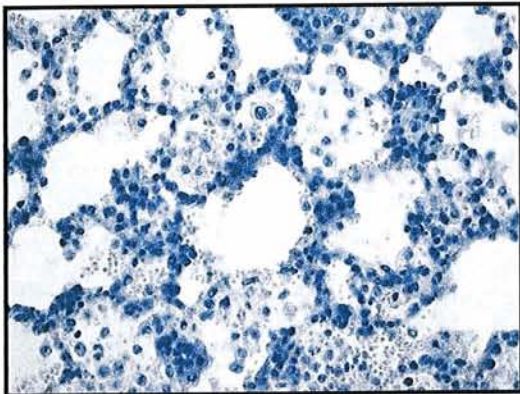


Photo n°1

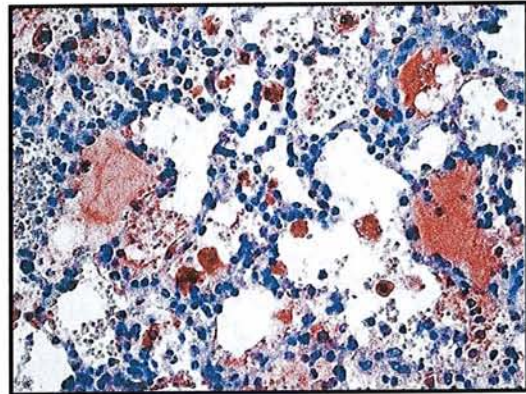


Photo n°2

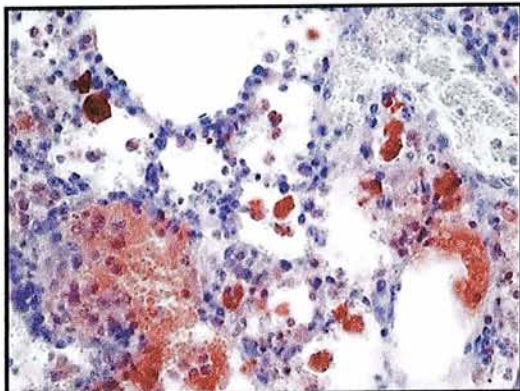


Photo n°3

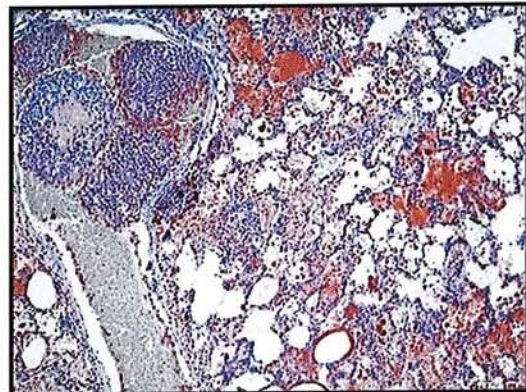


Photo n°4

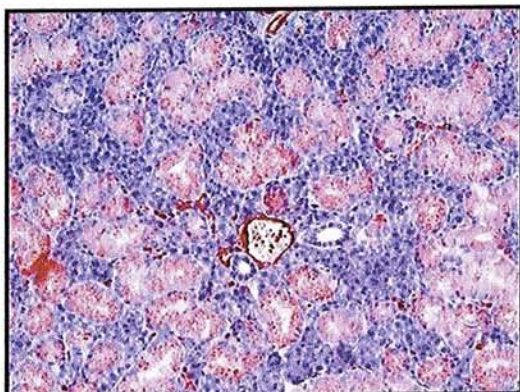


Photo n°5a

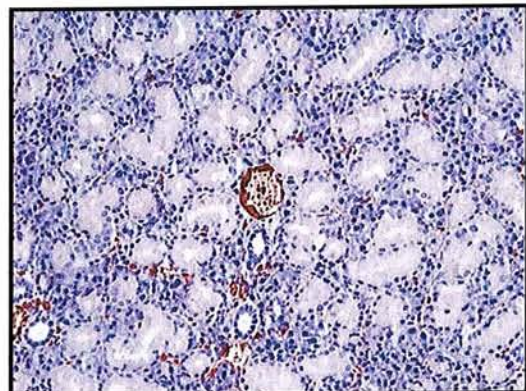


Photo n°5b

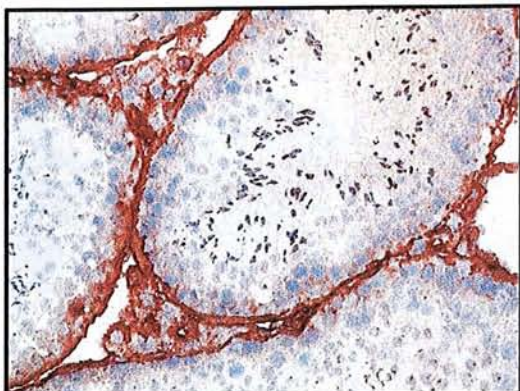


Photo n°6

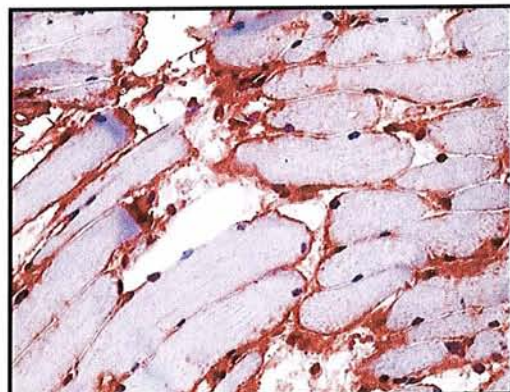


Photo n°7

### 3. Compte mitotique, indice de prolifération et délai de fixation

| Technique utilisée       | Délai avant fixation |         |          |          |           |           |
|--------------------------|----------------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|
|                          | 5 minutes            | 1 heure | 3 heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES : cellules en mitose | 33                   | 23      | 22       | 21       | 23        | 17        |
| Phosphohistone H3        | 28                   | 24      | 18       | 22       | 21        | 17        |
| MIB-1                    | 314                  | 305     | 301      | 340      | 321       | 302       |
| Ki-67 lapin              | 380                  | 388     | 390      | 359      | 373       | 385       |
| ICBP90                   | 898                  | 881     | 893      | 860      | 872       | 879       |

Tableau 2 : tumeur numéro 1, prélèvement mis à 4° C avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée       | Délai avant fixation |         |          |          |           |           |
|--------------------------|----------------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|
|                          | 5 minutes            | 1 heure | 3 heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES : cellules en mitose | 23                   | 22      | 19       | 18       | 12        | 7         |
| Phosphohistone H3        | 27                   | 26      | 25       | 12       | 8         | 1         |
| MIB-1                    | 506                  | 608     | 544      | 518      | 550       | 522       |
| Ki-67 lapin              | 452                  | 481     | 483      | 468      | 501       | 491       |
| ICBP90                   | 912                  | 909     | 923      | 703      | 721       | 748       |

Tableau 3 : tumeur numéro 2, prélèvements mis à température ambiante avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée       | Délai avant fixation |         |          |          |           |           |
|--------------------------|----------------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|
|                          | 5 minutes            | 1 heure | 3 heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES : cellules en mitose | 29                   | 28      | 24       | 16       | 15        | 9         |
| Phosphohistone H3        | 35                   | 32      | 29       | 20       | 16        | 18        |
| MIB-1                    | 490                  | 502     | 501      | 497      | 494       | 492       |
| Ki-67 lapin              | 501                  | 510     | 498      | 481      | 489       | 497       |
| ICBP90                   | 699                  | 710     | 683      | 667      | 688       | 702       |

Tableau 4 : tumeur numéro 3, prélèvements mis à température ambiante avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

|                          | Délai avant fixation |         |         |        |           |           |
|--------------------------|----------------------|---------|---------|--------|-----------|-----------|
| Technique utilisée       | 5 minutes            | 1 heure | 3heures | heures | 12 heures | 24 heures |
| HES : cellules en mitose | 29                   | 25      | 23      | 15     | 13        | 9         |
| Phosphohistone H3        | 35                   | 23      | 22      | 20     | 17        | 9         |
| MIB-1                    | 490                  | 511     | 507     | 496    | 518       | 498       |
| Ki-67 lapin              | 501                  | 472     | 480     | 485    | 490       | 483       |
| ICBP90                   | 699                  | 766     | 759     | 732    | 770       | 744       |

Tableau 5 : tumeur numéro 3, prélèvements mis à 4° C avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

|                         | Délai avant fixation |         |         |          |           |           |
|-------------------------|----------------------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
| Technique utilisée      | 5 minutes            | 1 heure | 3heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES :cellules en mitose | 21                   | 22      | 16      | 15       | 9         | 7         |
| Phosphohistone H3       | 20                   | 20      | 19      | 17       | 11        | 12        |
| MIB-1                   | 491                  | 489     | 475     | 482      | 473       | 499       |
| Ki-67 lapin             | 487                  | 476     | 492     | 502      | 502       | 492       |
| ICBP90                  | 783                  | 784     | 799     | 778      | 769       | 770       |

Tableau 6: tumeur numéro 4, prélèvements mis à température ambiante avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

|                        | Délai avant fixation |         |         |          |             |           |
|------------------------|----------------------|---------|---------|----------|-------------|-----------|
| Technique utilisée     | 5 minutes            | 1 heure | 3heures | 6 heures | 12 heures   | 24 heures |
| HES cellules en mitose | 21                   | 19      | 18      | 16       | 7 (nécrose) | 12        |
| Phosphohistone H3      | 20                   | 22      | 22      | 17       | 12          | 14        |
| ICBP90                 | 783                  | 821     | 862     | 827      | 839         | 841       |
| MIB-1                  | 491                  | 503     | 512     | 502      | 510         | 522       |
| Ki-67 lapin            | 487                  | 490     | 470     | 487      | 503         | 506       |

Tableau 7 : tumeur numéro 4, prélèvements mis à 4° C avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée       | Délai avant fixation |         |          |          |           |           |
|--------------------------|----------------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|
|                          | 5 minutes            | 1 heure | 3 heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES : cellules en mitose | 28                   | 24      | 17       | 13       | 10        | 7         |
| Phosphohistone H3        | 25                   | 27      | 15       | 9        | 5         | 9         |
| ICBP90                   | 803                  | 813     | 815      | 819      | 802       | 790       |
| MIB-1                    | 512                  | 504     | 499      | 502      | 451       | 507       |
| Ki-67 lapin              | 469                  | 485     | 491      | 493      | 479       | 490       |

Tableau 8 : tumeur numéro 5, prélèvements mis à température ambiante avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée     | Délai avant fixation |         |          |          |           |           |
|------------------------|----------------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|
|                        | 5 minutes            | 1 heure | 3 heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES cellules en mitose | 28                   | 17      | 19       | 17       | 16        | 12        |
| Phosphohistone H3      | 25                   | 23      | 18       | 15       | 17        | 14        |
| ICBP90                 | 803                  | 742     | 781      | 777      | 761       | 762       |
| MIB-1                  | 512                  | 499     | 490      | 493      | 488       | 499       |
| Ki-67 lapin            | 469                  | 489     | 475      | 480      | 473       | 501       |

Tableau 9 : tumeur numéro 5, prélèvements mis à 4° C avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée     | Délai avant fixation |         |          |          |           |           |
|------------------------|----------------------|---------|----------|----------|-----------|-----------|
|                        | 5 minutes            | 1 heure | 3 heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES cellules en mitose | 16                   | 13      | 11       | 13       | 6         | 7         |
| Phosphohistone H3      | 18                   | 11      | 10       | 5        | 4         | 3         |
| ICBP90                 | 818                  | 785     | 770      | 806      | 767       | 784       |
| MIB-1                  | 581                  | 392     | 499      | 503      | 510       | 484       |
| Ki-67 lapin            | 532                  | 491     | 489      | 510      | 520       | 509       |

Tableau 10 : tumeur numéro 6, prélèvements mis à température ambiante avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée     | Délai avant fixation |         |         |          |           |           |
|------------------------|----------------------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
|                        | 5 minutes            | 1 heure | 3heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES cellules en mitose | 16                   | 14      | 13      | 15       | 12        | 9         |
| Phosphohistone H3      | 18                   | 16      | 17      | 15       | 11        | 4         |
| ICBP90                 | 818                  | 732     | 749     | 753      | 741       | 790       |
| MIB-1                  | 581                  | 499     | 513     | 508      | 504       | 520       |
| Ki-67 lapin            | 532                  | 505     | 489     | 496      | 510       | 513       |

Tableau 11 : tumeur numéro 6, prélèvements mis à 4° C avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée     | Délai avant fixation |         |         |          |           |           |
|------------------------|----------------------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
|                        | 5 minutes            | 1 heure | 3heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES cellules en mitose | 12                   | 7       | 8       | 5        | 5         | 5         |
| Phosphohistone H3      | 14                   | 8       | 7       | 9        | 8         | 5         |
| ICBP90                 | 813                  | 790     | 803     | 818      | 807       | 792       |
| MIB-1                  | 541                  | 520     | 512     | 508      | 522       | 531       |
| Ki-67 lapin            | 522                  | 482     | 498     | 505      | 510       | 508       |

Tableau 12 : tumeur numéro 7, prélèvements mis à température ambiante avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

| Technique utilisée     | Délai avant fixation |         |         |          |           |           |
|------------------------|----------------------|---------|---------|----------|-----------|-----------|
|                        | 5 minutes            | 1 heure | 3heures | 6 heures | 12 heures | 24 heures |
| HES cellules en mitose | 12                   | 14      | 9       | 8        | 9         | 8         |
| Phosphohistone H3      | 14                   | 15      | 11      | 9        | 7         | 9         |
| ICBP90                 | 813                  | 810     | 813     | 793      | 769       | 731       |
| MIB-1                  | 541                  | 482     | 497     | 503      | 520       | 521       |
| Ki-67 lapin            | 522                  | 502     | 505     | 497      | 513       | 508       |

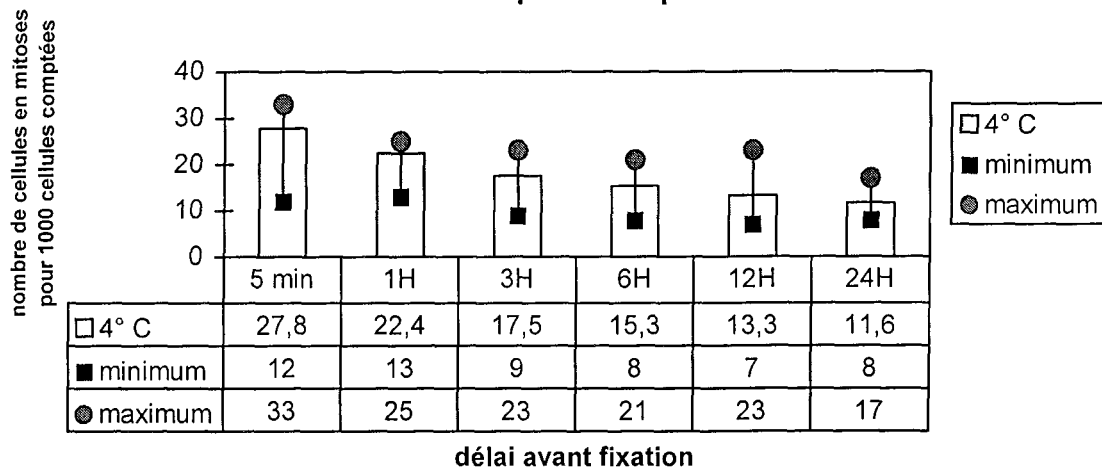
Tableau 13 : tumeur numéro 7, prélèvements mis à 4° C avant fixation dans le formol ; nombre de cellules marquées pour 1000 cellules observées au grossissement 1000 en immersion

### 3.1 Le compte mitotique et le délai de fixation

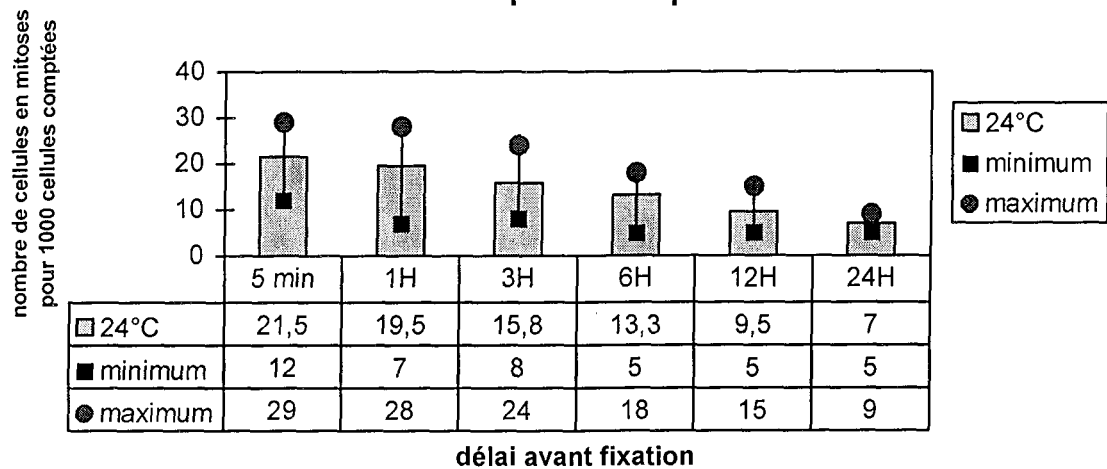
Le nombre de cellules en mitose diminue lorsqu'il existe un retard à la fixation. Cette diminution est plus nette lorsque les tissus sont laissés à température ambiante que lorsqu'ils sont conservés à 4° C. Les tissus ayant subi un retard de fixation sont moins facilement analysables du

fait d'une autolyse débutante. Les cellules se dissocient et les cytoplasmes se rétractent. Une autre observation de notre travail est l'impression d'une modification de représentation des phases de mitoses. Les phases tardives et précoces comme la prophase et la télophase semblent moins représentées alors que les métaphases semblent plus nombreuses. Existe-t-il une réelle modification de répartition des différentes phases de mitose avec plus de phases tardives comme décrit par Graem ?

**Evolution indice mitotique à 4°C pour 1000 cellules**

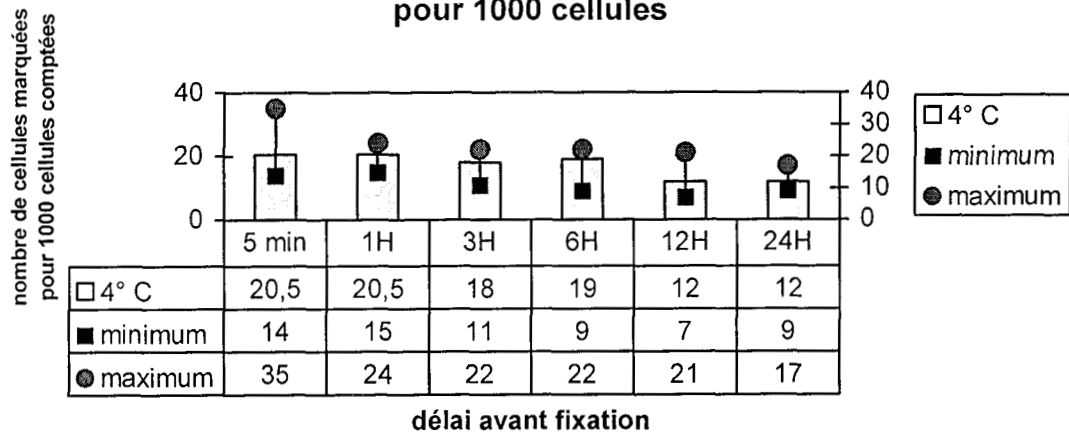


**Evolution indice mitotique à 24°C pour 1000 cellules**

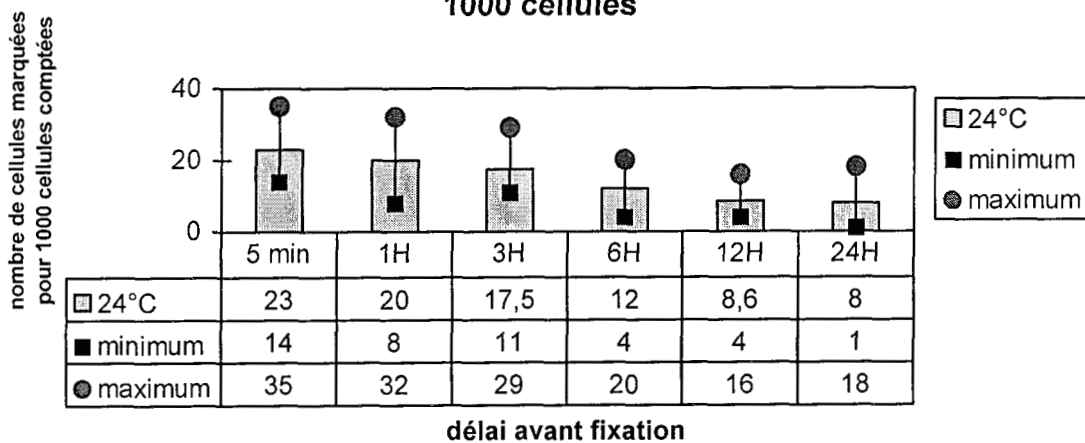


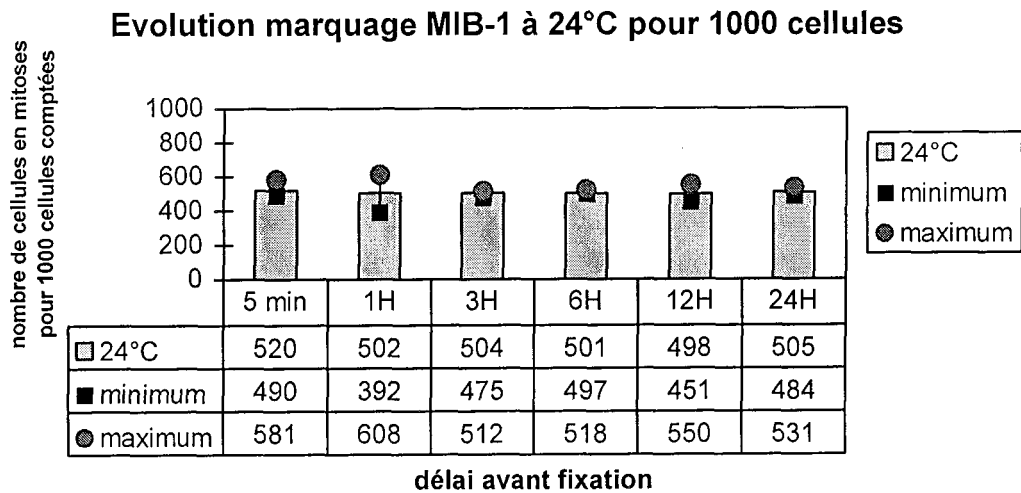
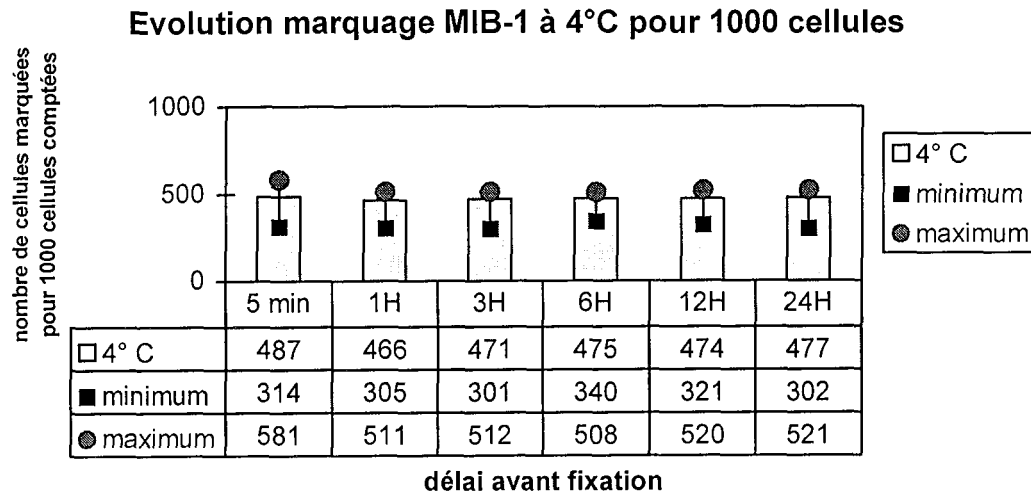
## 3.2 Les indices de prolifération

**Evolution marquage histone H3 phosphorylée à 4°C  
pour 1000 cellules**



**Evolution marquage histone H3 phosphorylée à 24°C pour  
1000 cellules**





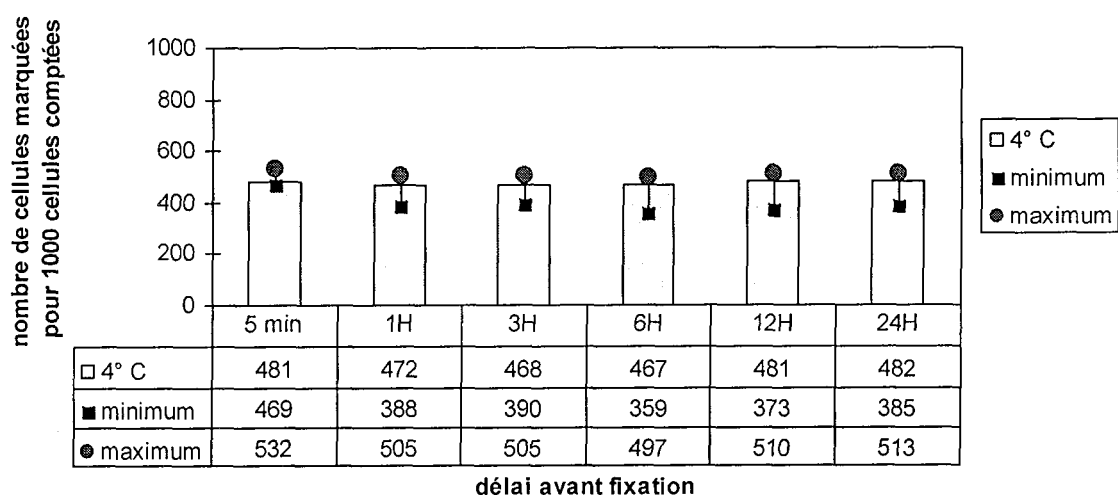
Le Ki-67 clone MIB-1 est un anticorps spécifique d'espèce qui reconnaît les cellules en cycle humaine mais ne croise pas avec le tissu murin. Ainsi, dans les tumeurs greffées, les tissus environnant et les cellules du stroma murin d'accompagnement (vaisseaux par exemple) ne sont pas marqués. Le marquage est réparti de façon homogène au sein des tissus tumoraux viables. Dans les plages de nécrose sont retrouvées quelques cellules marquées. Ces cellules tumorales sont probablement entrées en cycle cellulaire, puis se sont nécrosées suite à des phénomènes hypoxiques. Les cellules contenaient la protéine Ki-67 qui ne s'est pas dégradée.

Avec le retard de fixation, aussi bien pour les tissus conservés à 4° C que pour les ceux laissés à la température du laboratoire, nous avons remarqué une stabilité remarquable du marquage des cellules en cycle. Même dans la situation la plus délabrante pour les tissus, c'est-à-

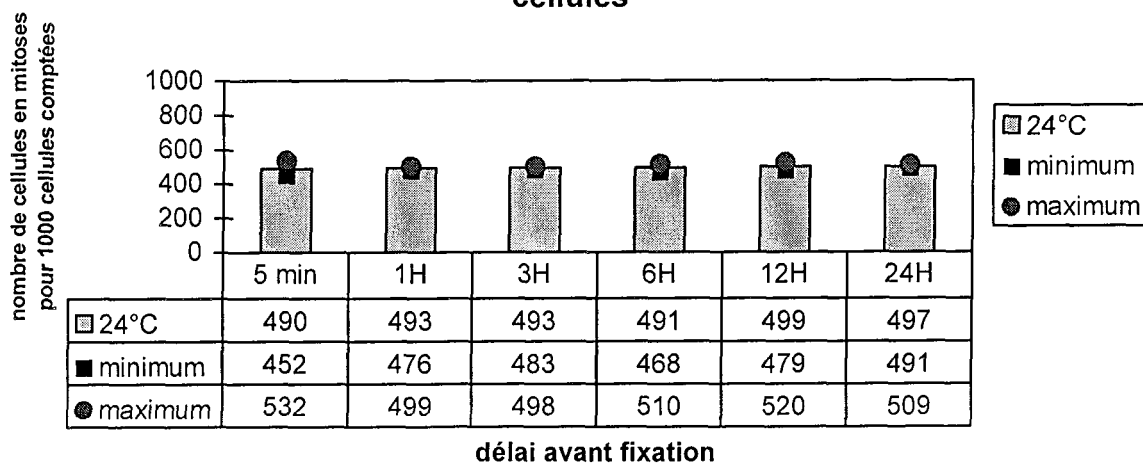
dire avec un retard de fixation de 24 heures pour une pièce laissée à température ambiante, le nombre de cellules marquées par le MIB-1 reste stable. Après un retard à la fixation, le signal est légèrement modifié, toujours nucléaire, mais hétérogène au sein du noyau avec des renforcements ponctiformes, restant cependant facilement interprétables.

L'antigène recherché, la protéine Ki-67, est donc épitope stable et résistant aux phénomènes précoces d'autolyse.

**Evolution du marquage Ki-67 de lapin à 4°C pour 1000 cellules**



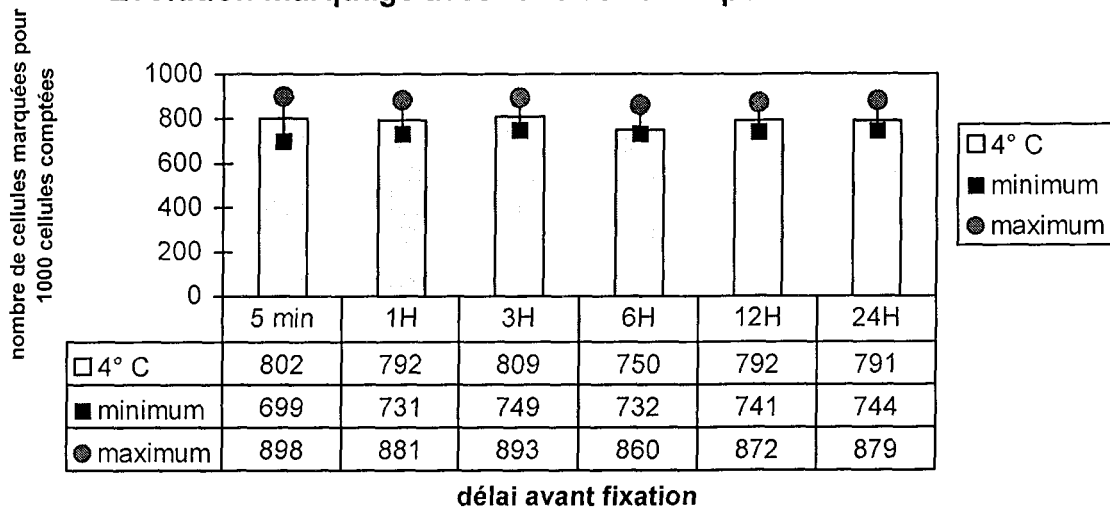
**Evolution marquage avec Ki-67 de lapin 24°C pour 1000 cellules**



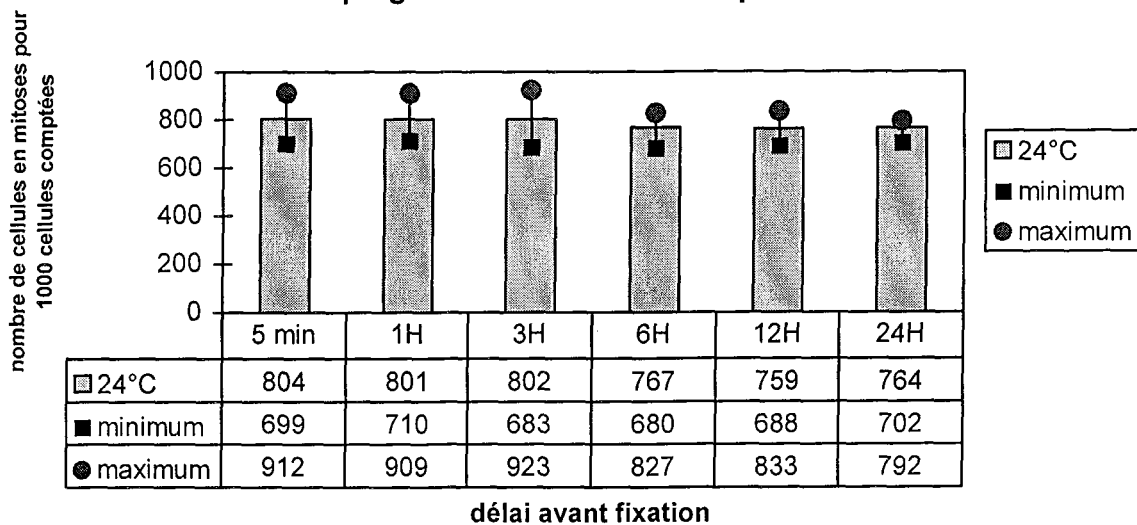
De même, le marquage par l'anticorps Ki-67 monoclonal de lapin est d'une remarquable stabilité malgré un retard à la fixation. Du fait de sa fabrication chez le lapin, il donne un marquage précis, sans accrochage sur la nécrose ni sur les immunoglobulines tissulaires. Le signal nucléaire est constant et marque également des cellules au sein des plages de nécrose.

Il a l'avantage, par rapport au MIB-1, de reconnaître les tissus murins. Ainsi, les cellules endothéliales en cycle sont également marquées.

### Evolution marquage avec ICBP90 à 4°C pour 1000 cellules



### Evolution marquage avec ICBP90 à 24°C pour 1000 cellules



L'ICBP90 reconnaît les cellules en cycle humaines et murines. Grâce à l'utilisation de l'anticorps IgG1 comme anticorps secondaire, le bruit de fond est peu présent.

Cet anticorps donne un marquage nucléaire homogène, vaporeux du noyau, inhomogène d'une cellule à l'autre. L'antigène est exprimé en quantité variable pendant le cycle, d'où un marquage plus ou moins prononcé en fonction de sa quantité.

Il reconnaît bien plus de cellules en cycle que le Ki-67. Le pourcentage de cellules marquées pour une même tumeur est beaucoup plus élevé (estimé à 70 % dans les tumeurs de notre travail). A sein des plages de nécrose, il existe un faible marquage dans les tissus avec très peu de retard de fixation (1 heure et 3 heures à 4° C). Au-delà de ce retard, il n'existe plus de signal dans les plages de nécrose. Il semble donc que l'antigène recherché soit dégradé précocement dans les plages de nécrose.

Le retard de fixation des tissus influence peu le signal qui reste stable mais parfois plus délicat à interpréter car plus ou moins prononcé et donc difficile à distinguer d'un accrochage non spécifique. En revanche, pour les tissus conservés à 4° C, le marquage est de bonne qualité.

L'anticorps anti phosphohistone H3 donne un signal au niveau marquage de l'ADN nucléaire des cellules en mitoses. Des cellules en prophase précoce ont un signal ponctiforme nucléaire correspondant vraisemblablement à une phosphorylation débutante des histones.

Cet anticorps, non spécifique d'espèce, reconnaît les cellules en mitoses humaines et murines. Il donne un marquage net et dépourvu de phénomène d'accrochage. La contre coloration légère permet de distinguer les cellules tumorales humaines des cellules murines de petite taille. Il peut parfois sembler manquer un signal sur des cellules en télophase ou en anaphase tardive. Cependant, après une observation en immersion et en faisant varier la mise au point, il s'avère toujours exister un signal de faible intensité.

Les plages de nécrose sont totalement dépourvues de marquage. Il s'agit donc véritablement d'un marquage des cellules viables en mitose.

Dans certains tissus fixés précocement, on retrouve un signal plus important que le comptage des mitoses en HES. Certaines cellules en phase précoce de mitose (début de prophase) ne sont donc pas reconnaissables en HES mais déjà repérables en immunohistochimie.

Le retard de fixation a une influence sur ce signal. Pour les tissus conservés à 4° C comme à température ambiante, on retrouve une diminution nette du signal après 24 heures de retard de fixation. Cette diminution est parallèle à la diminution du comptage des mitoses en HES. La phosphorylation des histones semble donc un phénomène biochimique fragile, sensible aux phénomènes précoces de dégradation tissulaire dus au retard de fixation. Il est probable que

les histones H3 se déphosphorylent et que par conséquent, l'épitope est modifié et le signal disparaît.

## **Planche n°4**

**Photo n°1** : glioblastome humain greffé chez une souris nude. Coloration en HES (x400).

**Photo n°2** : Etude IHC avec l'anticorps ICBP90 sur tissu fixé après 1 heure (x400)

**Photo n°3** : Etude IHC avec l'anticorps MIB-1 sur tissu fixé immédiatement (x400)

**Photo n°4** : Etude IHC avec l'anticorps histone H3 phosphorylée sur tissu fixé immédiatement (x400).

**Photo n°5** : Etude IHC avec l'anticorps MIB-1 sur tissu fixé après 24 heures, laissé à température ambiante (x400)

**Photo n°6** : Etude IHC avec l'anticorps histone H3 phosphorylée sur tissu fixé après 24 heures, laissé à température ambiante (x400)

**Photo n°7** : Etude IHC avec l'anticorps MIB-1 dans les zones nécrosées (x400)  
Détection de la protéine dans les cellules hypoxiques et dans les plages de nécrose.

**Photo n°8** : Etude IHC avec l'anticorps histone H3 phosphorylée dans les zones nécrosées (x400)

Absence de détection dans les cellules hypoxiques et dans les plages de nécrose.

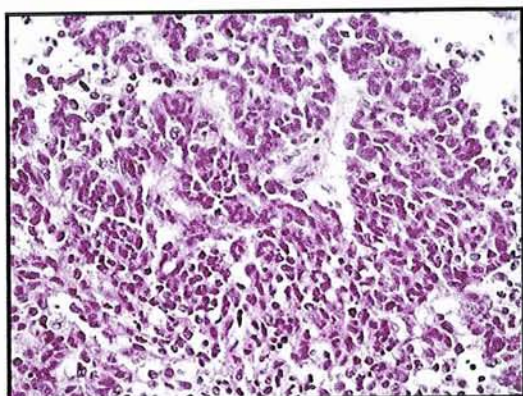


Photo n°1

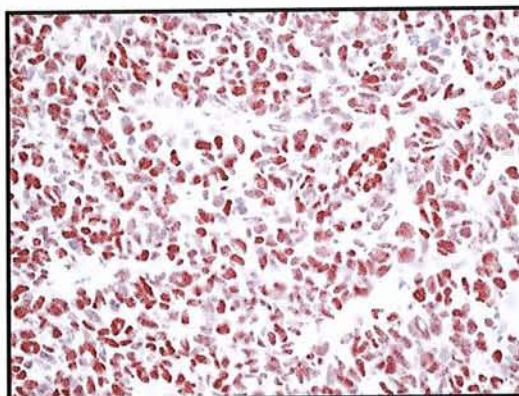


Photo n°2

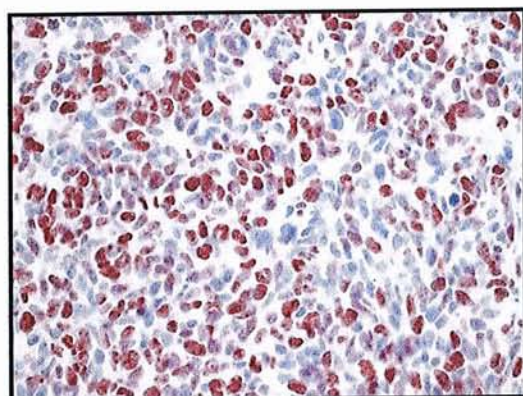


Photo n°3

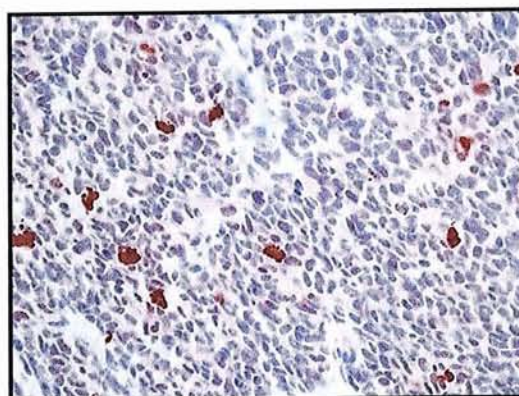


Photo n°4

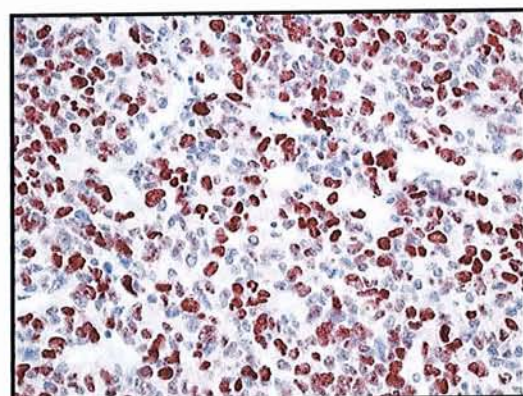


Photo n°5

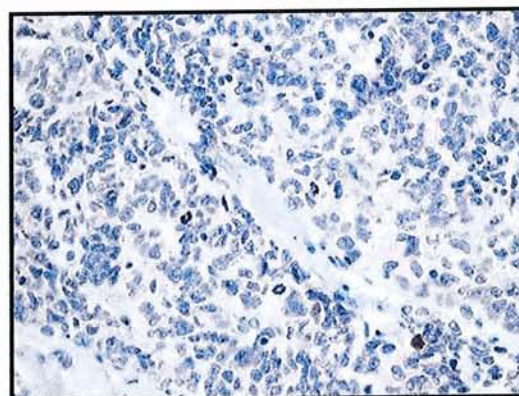


Photo n°6



Photo n°7

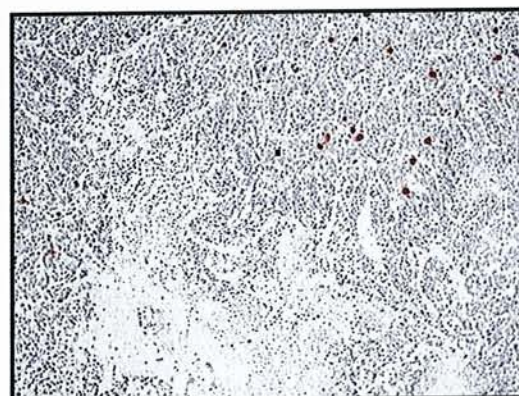


Photo n°8

## **DISCUSSION**

## **1. Les signaux non souhaités en immunohistochimie après utilisation d'anticorps monoclonaux sur des coupes de tissus de souris**

La signification des colorations non souhaitées, retrouvées dans notre travail, n'est pas univoque. Pour certaines d'entre elles, il s'agit d'un « bruit de fond » identique dans ses modes de production à ceux observés en pathologie humaine. Ces derniers résultent : 1) de l'accrochage « non spécifique » de réactifs lorsque ces derniers sont utilisés à des concentrations trop élevées, 2) d'une activité peroxydasique (ou pseudoactivité peroxydasique lorsque l'oxydation du substrat n'est pas d'origine enzymatique comme c'est le cas par exemple des globules rouges), non ou imparfaitement bloquée, 3) d'une réaction spécifique développée entre la biotine endogène et la streptavidine, un des constituant du système de révélation, 4) de réactions croisées. Les activités peroxydasique et pseudoperoxydasique sont bloquées, dans le cas des coupes de tissus inclus dans de la paraffine par une incubation des sections de 15 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6 % dans de l'eau distillée. La répartition de la biotine endogène dans les tissus de souris est identique à celle des tissus humains. Cette vitamine, du fait de sa localisation préférentiellement mitochondriale, est plus abondante dans les cellules riches en cet organe, à savoir le sébocyte, l'adipocyte multivacuolaire de la graisse brune, l'hépatocyte, les cellules épithéliales du tube contourné rénal, etc. Le contenu en biotine des deux derniers types cellulaires est curieusement très inférieur à celui des mêmes types cellulaires chez l'homme. Nous n'avons pas d'explication à proposer à ce fait d'observation. Enfin, la seule réaction croisée que nous ayons observé est un marquage de l'acrosome des cellules de la lignée spermatocytaire après utilisation de l'antisérum anti IgG (H+L) de souris préparé chez le lapin. Les différents contrôles pratiqués démontrent que ce signal n'est pas lié à la biotine ou à une activité oxydasique. Il ne peut s'agir d'immunoglobulines, la barrière hémato testiculaire ne permettant pas la diffusion de ces protéines dans la lumière des tubes. La nature de l'antigène détecté est inconnue.

Dans notre travail, le signal non souhaité le plus gênant est lié à la présence d'immunoglobulines dans la lumière des vaisseaux, la matrice extracellulaire, le cytoplasme des plasmocytes, celui des macrophages et des cellules des épithéliums muqueux et, enfin, au niveau de la membrane plasmique des lymphocytes B.

Les localisations plasmocytaires et intra vasculaires sont attendues. En revanche, de nombreux contrôles ont été nécessaires avant d'admettre que la coloration des cytoplasmes des macrophages alvéolaires est liée à l'internalisation d'immunoglobulines exsudées dans les lumières alvéolaires.

La concentration des immunoglobulines interstitielles varie d'un tissu à l'autre, les concentrations les plus élevées étant observées au niveau du derme, de la lamina propria intestinale et de l'interstitium rénal. A l'opposé, et ce n'est pas une surprise, nous n'avons pas détecté d'immunoglobulines extravasculaires au niveau du neuropile encéphalique.

En pathologie humaine, en dehors des réactions inflammatoires, la présence d'immunoglobulines dans les espaces interstitiels, est rarement décrite. Il est probable que les signaux résultant de leur présence sont interprétés comme provenant d'un accrochage non spécifique, secondaire à l'emploi de concentrations trop élevées d'un ou de plusieurs éléments de la réaction immuno histologique. La perméabilité de la paroi de petits vaisseaux aux protéines et, de ce fait, aux immunoglobulines est un fait connu des physiologistes. La quantité et la nature des protéines qui diffusent à travers les parois sont variables d'un territoire à l'autre en fonction des caractéristiques structurales de ces dernières (capillaires continus, fenêtrés, etc) mais également en fonction des caractéristiques fonctionnelles de la micro circulation. La diffusion dépend également de la masse moléculaire des protéines, l'albumine diffusant plus aisément que les IgG et ces dernières que le fibrinogène.

La quantité totale des protéines présentes dans les 12 litres de liquide de l'ensemble du secteur interstitiel chez l'homme serait supérieure à celle des protéines totales du sang. Les IgG seraient distribuées de façon égale entre les secteurs intra- et extra-vasculaire, les IgM principalement dans le secteur vasculaire. L'adsorption des immunoglobulines à la surface des cellules sanguines circulantes, des cellules endothéliales ou épithéliales peut gêner considérablement la détection des antigènes de membrane.

Dans notre travail, nous avons démontré la diffusion des immunoglobulines dans le cytoplasme des cellules tumorales ischémiques. La coloration des cellules en souffrance peut être faussement interprétée comme spécifique lors de la détection d'antigènes cytoplasmiques. Les marquages, cependant, sont diffus, non granulaires, ce qui doit attirer l'attention. La diffusion des immunoglobulines à travers la membrane plasmique est probablement passive. De tels faits sont connus en pathologie humaine et notamment dans les lymphomes. Ils peuvent

conduire à des erreurs de diagnostic, par exemple, à considérer faussement, sur l'observation du caractère polytypique d'un infiltrat, des lymphomes malins comme des pseudo lymphomes.

Comme attendu, les marquages non souhaités sont moins intenses après fixation au formol et inclusion dans de la paraffine que pour les coupes de tissus congelés, post fixées ou non, à l'exception toutefois de celles traitées par les vapeurs de formaldéhyde.

Dans ce dernier cas, il est probable que la faible intensité du signal n'est pas liée à une perte des immunoglobulines pendant la technique mais à un masquage des sites antigéniques par une fixation formolique comparativement plus intense que celle obtenue en milieu liquide. Les différences d'intensité de coloration en fonction du mode de prise en charge des coupes de tissus congelés, la post fixation en vapeur de formaldéhyde étant exclue, sont, en revanche, attendues.

En effet, le séchage des coupes induit une coagulation des protéines entraînant 1) une perte moindre par diffusion de ces dernières au cours des étapes suivantes de la technique, réalisées en milieu liquide, 2) l'observation de colorations grossièrement granulaires correspondant à la formation d'agrégats d'immunoglobulines lors du séchage. Enfin, les coupes de tissus séchés adhèrent mieux au verre que celles directement fixées en milieu liquide. Dans ces cas, la fraction de la surface des cellules ou des fibres conjonctives au contact des réactifs immunologiques est proportionnellement moindre qu'après fixation immédiate en milieu liquide. La quantité d'immunoglobulines adsorbées accessibles aux réactifs immunologiques est donc plus faible. Il convient enfin de remarquer que le mode de post fixation peut apparemment influencer sur la localisation des antigènes. Ainsi, les immunoglobulines sont observées dans le mésangium des glomérules dans les coupes séchées puis fixées dans le formol, alors qu'elles sont adsorbées à la surface des cellules endothéliales après fixation immédiate dans le formol.

Les signaux liés aux activités peroxydasique et pseudo peroxydasique sont inhibés en grande partie ou totalement grâce à l'eau oxygénée, pour les coupes en paraffine. Pour la biotine endogène, les méthodes faisant appel au micro polymère de peroxydase lié à l'anticorps secondaire ont démontré de bons résultats, la détection de l'anticorps primaire étant sensiblement identique à celle obtenue lors d'un montage classique.

Les signaux non voulus, liés à la présence d'immunoglobulines, ne sont observés que lorsque la deuxième étape du montage immunohistochimique comporte un anticorps dirigé contre les immunoglobulines de souris. Ils ne sont donc pas rencontrés avec les anticorps polyclonaux ou monoclonaux fabriqués chez le lapin. Au laboratoire, des anticorps polyclonaux de lapins, spécifiques d'espèce, dirigés contre les collagènes I, III et IV murins et d'autres non

spécifiques d'espèce dirigés contre des marqueurs tumoraux telles que la protéine S100 et la protéine gliale fibrillaire sont utilisés avec succès sans bruit de fond. Les anticorps polyclonaux commercialisés pouvant reconnaître les antigènes des tissus humains greffés chez la souris nude ou spécifiquement dirigés contre des antigènes murins ne sont pas nombreux.

Les anticorps monoclonaux de lapin constituent, pour l'immunohistochimie chez la souris, une révolution, mais peu sont encore commercialisés. Dans ce travail, les immunomarquages obtenus avec l'anticorps monoclonal de lapin dirigé contre la protéine Ki-67 humaine sont excellents, sans le moindre bruit de fond.

Des résultats de même qualité peuvent être obtenus avec des anticorps monoclonaux porteurs d'une marque, telle la fluorescéine, détectable par voie immunologique. Les anticorps primaires ainsi modifiés sont commercialisés pour la cytométrie de flux et utilisés dans des techniques ne comportant habituellement qu'une seule étape. Nous avons utilisé, au laboratoire, un anticorps monoclonal dirigé contre la bromodésoxyrudine, un analogue nucléosidique incorporé dans les cellules en voie de synthèse d'ADN, pour apprécier la fraction de croissance de tumeurs greffées chez la souris athymique. Les résultats obtenus étaient également excellents. Les anticorps primaires marqués commercialisés ne sont cependant pas légion et le marquage par voie chimique de ces derniers n'est pas aisé lorsque l'on n'en dispose que de petites quantités.

Dans de nombreux cas, l'utilisation d'anticorps monoclonaux de souris comme anticorps primaire ne peut donc être évitée. Différents procédés pour limiter le bruit de fond peuvent être utilisés.

Quelque temps avant la réalisation de notre travail avait été testée au laboratoire une méthode basée sur l'hydrolyse enzymatique différentielle des immunoglobulines, respectant les antigènes cibles. Cette technique fait appel à des enzymes, telles la pepsine ou la papaïne, pour fragmenter les immunoglobulines *in vitro*. Plusieurs tentatives ont ainsi été réalisées sur des coupes de tissus fixés au formol et inclus dans de la paraffine. La réduction du bruit de fond obtenue n'a jamais été satisfaisante, que les coupes aient ou non fait l'objet d'une inversion de la fixation formolique. Ce procédé a donc été abandonné. Il ne peut, par ailleurs, être pratiqué sur les coupes à congélation, ces dernières étant rapidement détruites par l'hydrolyse enzymatique.

Dans notre travail, nous avons tout d'abord tenter de bloquer les sites de liaisons des immunoglobulines extra vasculaires aux anticorps secondaires par une pré-incubation des coupes dans une solution de fragments Fab et Fc d'un anticorps anti Ig (H+L) de souris non marqué. Dès 1987, Nielsen et al (27)avaient rapporté, lors de l'utilisation sur des tissus humains d'IgM humaines comme anticorps primaire, une réduction du bruit de fond lié aux immunoglobulines par une pré incubation des coupes avec des fragments Fab d'un anticorps de lapin anti IgM humain non marqué. Pour ces auteurs, le gain serait moins net dans le cas d'un blocage du bruit de fond avec le couple fragments Fab d'un anticorps anti IgG humaines /anticorps primaire de classe IgG, fabriqué chez l'homme. La différence de bruit de fond entre ces deux situations pourrait s'expliquer par une concentration beaucoup plus élevée des IgG que des IgM dans la matrice extracellulaire. La méthode a récemment été reprise par Qi L Lu et al en 1998 (24) pour la détection de la dystrophine une protéine membranaire, par un anticorps monoclonal de souris, dans un modèle murin de maladie de Duchenne. Ces auteurs rapportent des résultats satisfaisants et suggèrent d'ajouter, à la solution de fragments Fab, une petite quantité de fragments Fc pour limiter les bruits de fond sur les coupes à congélation, souvent associés, liés à la présence des récepteurs Fc à la surface des macrophages. Dans notre travail, nous avons utilisé les fragments Fab et Fc non purifiés d'un antiserum de lapin dirigé contre les immunoglobulines IgG (H+L) de souris, complètement digéré par la papaïne. La diminution du bruit de fond lié aux immunoglobulines s'est révélée nette mais incomplète.

Entre nos mains, l'utilisation de complexes solubles formés *in vitro* entre l'anticorps primaire monoclonal de souris d'intérêt et un anticorps secondaire modifié par ajout d'une marque fluorescente de biotine ou d'une enzyme, s'est révélée la méthode la plus efficace. L'anticorps secondaire utilisé dans ce cas peut être :1) un anti IgG (H+L) ou un anti IgG1 complet, 2) les fragments Fab, purifiés par affinité, d'un antiserum dirigé contre l'extrémité Fc des IgG1. Cette dernière solution est théoriquement la meilleure du fait de la monovalence des réactifs. Dans notre travail, nous avons testé les deux méthodes avec des résultats sensiblement équivalents et dans l'ensemble excellents, le bruit de fond lié aux immunoglobulines étant totalement éliminé. Les seuls inconvénients sont une certaine variabilité des résultats et la durée de vie limitée des complexes qui doivent être utilisés aussi rapidement que possible après leur formation.

La dernière méthode consiste à utiliser un anticorps secondaire spécifique d'une sous classe d'immunoglobuline qui ne contribue qu'à une fraction des immunoglobulines circulantes et interstitielles totales. Les anticorps monoclonaux de souris sont, dans leur très grande majorité, des IgG1. Ces dernières ne contribuent, chez la souris normale, que pour un cinquième au total des immunoglobulines circulantes. Ces valeurs sont encore plus basses chez la souris athymique qui est connue pour avoir des taux sériques d'IgM relativement élevés, les autres classes et sous classes d'immunoglobulines étant présentes à des concentrations anormalement basses. L'anticorps anti IgG1 est préparé de sorte à être spécifique de la chaîne lourde  $\gamma$  1, ce qui élimine toute réaction croisée avec les chaînes légères des autres immunoglobulines. Avec ce montage, les signaux liés à la présence d'immunoglobulines intra vasculaires, interstitielles, membranaires ou cytoplasmiques, ne sont pas totalement éliminés. Cependant, l'intensité des colorations parasites est suffisamment faible pour ne pas interférer, dans l'immense majorité des cas, avec l'interprétation des colorations spécifiques.

Au total, nous utilisons en routine cette dernière méthode et réservons celle fondée sur la formation de complexes *in vitro* à des cas particuliers.

## **2. Effet du délai de fixation sur les indices mitotiques et de prolifération**

De nombreuses méthodes sont utilisées en pathologie humaine pour estimer la fraction des cellules en cycle, qu'ils s'agissent des très discutés comptes et indices mitotiques, ou des indices de prolifération mesurés par mise en évidence de protéines exprimées par les seules cellules en voie de division. Dans la mesure où l'appréciation des effets sur la cinétique cellulaire est essentielle à la compréhension des mécanismes d'action de différents schémas thérapeutiques, et parce que l'axe de recherche du laboratoire a trait au développement de modèles animaux pré cliniques de cancers et à leur exploitation pour tester de nouveaux schémas thérapeutiques, nous avons cherché à déterminer la méthode la plus aisée et la plus reproductible pour estimer ce paramètre dans le cas des modèles de cancers obtenus par greffe de tumeurs humaines chez la souris athymique. Dans ce domaine, il convient de préciser que les résultats acquis chez l'homme ne sont pas forcément applicables aux modèles expérimentaux notamment du fait d'importantes différences de la valeur des indices de prolifération, ces

derniers étant en règle beaucoup plus élevés dans les tumeurs des modèles animaux que dans les tumeurs d'origine chez l'homme.

Des discussions existent depuis longtemps sur les facteurs de variations de l'indice mitotique et des indices de prolifération. Quels sont les facteurs pouvant influencer l'indice mitotique ou les marqueurs immunohistochimiques de prolifération ?

Pour de nombreux auteurs (10)(15)(37), la diminution de l'indice mitotique suite à un retard de fixation est un fait indéniable. Pour d'autres,(3)(4),il ne s'agit que d'une mauvaise reconnaissance des cellules en division du fait de l'autolyse débutante, l'analyse par cytométrie de flux retrouvant une quantité de cellules en phase M identique, quel que soit le retard de fixation.

Selon Donjuisen (10), le type de tumeur de départ ainsi que l'indice mitotique de départ sont des facteurs influençant les répercussions d'un retard de fixation. S'il s'agit d'un tissu pauvre en mitoses, la diminution de celles-ci, suite au retard de fixation, sera moins importante que pour une tumeur riche en mitoses. Cependant, au sein d'une tumeur, il existe une grande hétérogénéité des zones proliférantes. Les mitoses sont plus nombreuses en périphérie des tumeurs et à distance des plages de nécrose. Certains auteurs considèrent l'indice mitotique comme difficilement reproductible (30)(40). Les difficultés principales résultent 1) de la tumeur, du fait de son hétérogénéité, de son aspect, des variations de densité cellulaire pour un champ donné 2) de l'observateur pour qui une image douteuse sera interprétée comme une mitose dans un cas ou comme une cellule apoptotique par un autre. Les phases précoces de la mitose sont également difficiles à discerner.

Dans ce travail, en plus de l'indice mitotique, quatre autres indices de prolifération, fondés sur la détection de protéines associées au cycle cellulaire, ont été comparés.

Celui obtenu après mise en évidence de l'ICBP 90, une protéine impliquée dans la régulation du gène de la topoisomérase II a (38), s'est révélé le moins intéressant. Le pourcentage des cellules en cycle détectées avec cet anticorps est, en effet, très élevé, ce qui ne facilite pas le comptage. Ce fait, négatif dans les modèles animaux, constituerait un avantage en pathologie humaine dans le cas de tumeurs dont l'indice serait peu élevé et de variations de faible amplitude de ce dernier avec le grade tumoral, comme les tumeurs musculaires lisses utérines par exemple. Le fait, par ailleurs que le niveau d'expression de la molécule puisse être anormalement élevé dans certains cancers (sein, prostate, colon), a constitué un autre argument

pour ne pas le retenir. Ce dernier argument joue également pour PCNA que nous n'avons pas testé.

L'histone H3 constitue une des protéines nucléosomales. Son extrémité N terminale est sujette à de nombreuses modifications (acétylation, phosphorylation, méthylation et ubiquitinylation) nécessaires au maintien de plusieurs structures et fonctions chromatinienne. La phosphorylation de l'histone H3, qui se réalise sur les résidus sérine 10 et 28, est intimement liée à la mitose. Pour Hirata et al (18), la réactivité de l'anticorps HTA28 que nous avons utilisé dans notre travail est maintenue tout au long de la mitose, de la prophase à la télophase. Les résultats de Goto et al (14) en culture de cellules ne concordent pas avec ces données, l'immunoréactivité de cet anticorps pour ces auteurs diminue au début de l'anaphase pour disparaître totalement à la fin de l'anaphase. Ces divergences proviennent probablement de différences dans les techniques de mise en évidence de la protéine (fixation, montage immunohistochimique, etc). Cet anticorps a l'avantage de reconnaître les histones H3 phosphorylées de tous les tissus de mammifères. Son implication dans le diagnostic fait l'objet d'études récentes : Ribalta (32) décrit son utilité 2004 dans le grading des méningiomes. Dans notre travail, le comptage des cellules en mitose, dans ces conditions, est plus aisé qu'après une simple coloration à l'hématoxyline éosine. Dans la mesure où un plus grand nombre de phases de la mitose sont comptés, les indices obtenus par cette méthode sont un peu supérieurs aux indices mitotiques classiques. Cependant, dans la mesure où cet indice est sensible à l'ischémie (voir ci-dessous), nous ne l'avons pas retenu pour son utilisation en routine dans la mesure où nous ne sommes pas maître du délai de fixation des tissus. En revanche, son utilisation sur des tissus murins dans le domaine de la recherche est intéressante.

De nombreux facteurs peuvent influencer les résultats des études de cinétique tumorale, que cette dernière soit appréciée par la mesure de l'indice mitotique ou de ceux établis après mise en évidence immunohistochimique de protéines exprimées spécifiquement par les cellules en cycle. Citons, par exemple, l'influence possible sur ces mesures du délai de fixation et la durée de cette dernière. Ce dernier paramètre est aisé à expliquer, tout au moins dans le cas de la fixation formolique puisque la formation de conjugués du formaldéhyde aux protéines et la réticulation de ces dernières ne se développent que progressivement. La standardisation des conditions de fixation est essentielle à la validité de l'interprétation des résultats des études cinétiques réalisées à partir de tissus fixés. L'appréciation des

conséquences du délai de fixation sur les différents indices comporte des divergences. Idéalement, les tissus devraient être fixés, *in situ*, chez l'individu vivant, par congélation ou injection intravasculaire d'un fixateur liquide. Ceci n'est bien sûr possible que dans le cadre de l'expérimentation animale. Dans toutes les autres circonstances, une ischémie se développe dès les premières secondes après le prélèvement, voire même pendant l'intervention chirurgicale elle-même. L'ischémie et ses conséquences sont à l'origine de modifications complexes de la composition des tissus associant des variations du métabolisme cellulaire, la dénaturation et la dégradation des macromolécules, des variations d'expression du génome (réaction de stress cellulaire, activation des cascades moléculaires conduisant à l'apoptose, variations d'expression des antigènes de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité, etc). C'est ainsi qu'il a été observé que 30 minutes d'ischémie sont suffisantes pour fragmenter l'ADN et que des variations significatives de concentration de certains ARNm sont observées dès la 20<sup>ème</sup> minute. Dans notre travail, la diminution de l'indice mitotique est un fait indéniable. En cela nos résultats sont en accord avec ceux de Donjhuigen (10), Graem (15) et Start (37). Il est difficile de dire si cette diminution résulte de l'achèvement de la mitose des cellules en cycle sans entrée de nouvelles cellules en division, ou n'est qu'apparente du fait de la reconnaissance plus difficile de figures de mitose partiellement autolysées. Les données acquises dans notre travail ne permettent pas de trancher.

L'indice de prolifération calculé après mise en évidence de l'histone H3 phosphorylée chute également de façon très nette quand la fixation est retardée et la baisse de l'indice est d'autant plus importante que le délai est plus long. Il convient également de remarquer que peu de mitoses sont détectables immunohistochimiquement dans les territoires tumoraux apoptiques à l'aide de cet anticorps, alors que dans ces mêmes territoires, les cellules colorées avec les anticorps dirigés contre la protéine nucléaire Ki-67 sont beaucoup plus nombreuses. Cette sensibilité épitopique à l'ischémie pourrait s'expliquer par la facilité avec laquelle la protéine est déphosphorylée.

La protéine Ki-67 est, aujourd'hui, le marqueur de prolifération le plus utilisé en pathologie humaine. Il s'agit d'une protéine nucléaire, non histone, exprimée par les cellules pendant les phases G1, S et G2 dont la ou les fonctions sont, à ce jour, inconnues. Dans notre travail, nous avons utilisé deux anticorps pour sa mise en évidence, à savoir le très classique MIB-1, un anticorps spécifique d'espèce, permettant donc la détection spécifique des cellules tumorales humaines en cycle dans les greffons et d'autre part, un anticorps monoclonal de lapin, non spécifique d'espèce, permettant, en plus des cellules tumorales en cycle,

d'objectiver celles du stroma en division. Dans notre travail, la détection de cette protéine s'est révélée être un indice de prolifération aisé à mesurer, stable à l'ischémie et indépendant du délai de fixation. La qualité des immunomarquages est indépendante de l'anticorps utilisé.

L'anticorps monoclonal de lapin, outre sa facilité d'utilisation, permet l'étude de la cinétique de prolifération du stroma murin ce qui n'est pas possible avec l'anticorps MIB-1. Au terme de ce travail, ce sont ces deux anticorps que nous avons choisis d'utiliser pour l'analyse de nos modèles.

## **CONCLUSION**

Les signaux non désirés en immunohistochimie sur les tissus de souris sont variables selon les techniques immunohistochimiques utilisées. Lorsque l'anticorps primaire est un anticorps monoclonal de souris, les signaux les plus gênant sont liés aux immunoglobulines endogènes, reconnues par l'anticorps secondaire. Ces dernières peuvent gêner la détection d'antigènes de membrane lorsqu'elles sont adsorbées aux surfaces cellulaires. Leur diffusion à travers les membranes plasmiques de cellules en souffrance peut conduire à un marquage artéfactuel cytoplasmique et /ou nucléaire.

La méthode la plus simple pour limiter le bruit de fond lié aux immunoglobulines endogènes consiste, dans le cas où l'anticorps primaire est une IgG1 de souris, à utiliser une anti IgG1 spécifique de l'extrémité Fc de la chaîne  $\gamma$  1. Avec cette méthode, le signal spécifique est le plus souvent intense et le bruit de fond discret. Les étapes de la technique sont identiques à celles utilisées en routine. Une absence complète de bruit de fond, sans diminution d'intensité du signal spécifique, peut être obtenue avec les complexes anticorps primaire/anticorps secondaire préformés. La technique est plus consommatrice de temps que la précédente et les complexes instables doivent être utilisés rapidement après leur formation. Il pourrait être intéressant de tester des complexes formés entre un anticorps monoclonal de souris et un anticorps secondaire conjugué à un micropolymère de peroxydase. Dans ce cas, le signal spécifique devrait être plus intense qu'avec les techniques précédentes et, dans le même temps, le bruit de fond lié à la présence de biotine endogène absent.

Lors de l'application de ces méthodes sur des tumeurs greffées chez l'animal pour l'étude des indices de prolifération, et grâce à l'absence d'accrochage nucléaire avec les techniques précédemment décrites, il résulte de notre travail que les marqueurs les plus facilement interprétables et ne subissant pas les effets de l'ischémie tissulaire sont les anticorps MIB-1 et Ki-67 monoclonal de lapin. La détection de cette protéine est indépendante du retard de fixation. Ces résultats sont sans conséquence pratique dans le domaine de l'expérimentation animale, mais d'une grande importance en pratique courante où les délais de prise en charge des tumeurs sont souvent incontrôlables.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



[1]Baak, J. P. (1990). "Mitosis counting in tumors." Hum Pathol 21(7): 683-5.

[2]Baak, J. P., P. J. van Diest, et al. (1989). "The Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project (MMMCP). A nationwide prospective study on reproducibility and prognostic power of routine quantitative assessments in The Netherlands." Pathol Res Pract 185(5): 664-70.

[3]Bergers, E., I. Jannink, et al. (1997). "The influence of fixation delay on mitotic activity and flow cytometric cell cycle variables." Hum Pathol 28(1): 95-100.

[4]Bergers, E., R. Montironi, et al. (1996). "Interlaboratory reproducibility of semiautomated cell cycle analysis of flow cytometry DNA-histograms obtained from fresh material of 1,295 breast cancer cases." Hum Pathol 27(6): 553-60.

[5]Birner, P., M. Ritzl, et al. (2001). "Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue." Am J Pathol 158(6): 1991-6.

[6] Brenner R.M., Slayden O.D., Rodgers W.H., Mah K.(2003)  
"Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium. Hum Reprod. Jun ; 18 (6) : 1185-93.

[7]Cross, S. S. (2002). "Detection of the Ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody MIB1. D. McCormick H. Chong, C. Hobbs, C. Datta & P. A. Hall. *Histopathology* 1993; 22; 355-360." Histopathology 41(3A): 172.

[8]Cross, S. S. and R. D. Start (1996). "Estimating mitotic activity in tumours." Histopathology 29(5): 485-8.

[9]Cross, S. S., R. D. Start, et al. (1990). "Does delay in fixation affect the number of mitotic figures in processed tissue?" J Clin Pathol 43(7): 597-9.

[10]Donhuijsen, K., U. Schmidt, et al. (1990). "Changes in mitotic rate and cell cycle fractions caused by delayed fixation." Hum Pathol 21(7): 709-14.

[11]Fung, K. M., A. Messing, et al. (1992). "A novel modification of the avidin-biotin complex method for immunohistochemical studies of transgenic mice with murine monoclonal antibodies." J Histochem Cytochem 40(9): 1319-28.

[12]Gerdes, J., L. Li, et al. (1991). "Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67." Am J Pathol 138(4): 867-73.

[13]Gerlach, C., M. Golding, et al. (1997). "Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat." Lab Invest 77(6): 697-8.

[14]Goto, H., Y. Tomono, et al. (1999). "Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation." J Biol Chem 274(36): 25543-9.

[15] Graem, N. and K. Helweg-Larsen (1979). "Mitotic activity and delay in fixation of tumour tissue. The influence of delay in fixation on mitotic activity of a human osteogenic sarcoma grown in athymic nude mice." Acta Pathol Microbiol Scand [A] 87A(5): 375-8.

[16] Hendricks, J. B. and E. J. Wilkinson (1994). "Quality control considerations for Ki-67 detection and quantitation in paraffin-embedded tissue." J Cell Biochem Suppl 19: 105-10.

[17] Hierck, B. P., L. V. Iperen, et al. (1994). "Modified indirect immunodetection allows study of murine tissue with mouse monoclonal antibodies." J Histochem Cytochem 42(11): 1499-502.

[18] Hirata, A., K. Inada, et al. (2004). "Characterization of a monoclonal antibody, HTA28, recognizing a histone H3 phosphorylation site as a useful marker of M-phase cells." J Histochem Cytochem 52(11): 1503-9.

[19] Hopfner, R., M. Mousli, et al. (2001). "Genomic structure and chromosomal mapping of the gene coding for ICBP90, a protein involved in the regulation of the topoisomerase IIalpha gene expression." Gene 266(1-2): 15-23.

[20] Hopfner, R., M. Mousli, et al. (2000). "ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase IIalpha expression." Cancer Res 60(1): 121-8.

[21] Hopfner, R., M. Mousli, et al. (2002). "Overexpression of ICBP90, a novel CCAAT-binding protein, overcomes cell contact inhibition by forcing topoisomerase II alpha expression." Anticancer Res 22(6A): 3165-70.

[22] Jannink, I., B. Risberg, et al. (1996). "Heterogeneity of mitotic activity in breast cancer." Histopathology 29(5): 421-8.

[23] Juan, G., F. Traganos, et al. (1998). "Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis." Cytometry 32(2): 71-7.

[24] Lu, Q. L. and T. A. Partridge (1998). "A new blocking method for application of murine monoclonal antibody to mouse tissue sections." J Histochem Cytochem 46(8): 977-84.

[25] Mousli, M., R. Hopfner, et al. (2003). "ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells." Br J Cancer 89(1): 120-7.

[26] Muskhelishvili, L., J. R. Latendresse, et al. (2003). "Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA." J Histochem Cytochem 51(12): 1681-8.

[27] Nielsen B., Borup P., Husby s. (1987). "A method for the blocking of endogenous immunoglobulin on frozen tissus sections in the screening of human hybridoma antibody in culture supernatants. Hybridoma. Feb; 6(1) : 103-109.

[28] Nowak, S. J. and V. G. Corces (2000). "Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci." Genes Dev 14(23): 3003-13.

[29] Nowak, S. J. and V. G. Corces (2004). "Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation." Trends Genet 20(4): 214-20.

[30] O'Leary, T. J. and M. W. Steffes (1996). "Can you count on the mitotic index?" Hum Pathol 27(2): 147-51.

[31] Pelstring, R. J., D. C. Allred, et al. (1991). "Differential antigen preservation during tissue autolysis." Hum Pathol 22(3): 237-41.

[32] Ribalta, T., I. E. McCutcheon, et al. (2004). "The mitosis-specific antibody anti-phosphohistone-H3 (PHH3) facilitates rapid reliable grading of meningiomas according to WHO 2000 criteria." Am J Surg Pathol 28(11): 1532-6.

[33] Sauve, D. M., H. J. Anderson, et al. (1999). "Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH<sub>2</sub>-terminal domain during mitotic chromosome condensation." J Cell Biol 145(2): 225-35.

[34] Scholzen, T., E. Endl, et al. (2002). "The Ki-67 protein interacts with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family: a potential role in the regulation of higher-order chromatin structure." J Pathol 196(2): 135-44.

[35] Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol 182(3): 311-22.

[36] Spyrtos, F., M. Ferrero-Pous, et al. (2002). "Correlation between MIB-1 and other proliferation markers: clinical implications of the MIB-1 cutoff value." Cancer 94(8): 2151-9.

[37] Start, R. D., M. S. Flynn, et al. (1991). "Is the grading of breast carcinomas affected by a delay in fixation?" Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 419(6): 475-7.

[38] Trotzier, M. A., C. Bronner, et al. (2004). "Phosphorylation of ICBP90 by protein kinase A enhances topoisomerase IIalpha expression." Biochem Biophys Res Commun 319(2): 590-5.

[39 ] van Dierendonck, J. H., R. Keijzer, et al. (1989). "Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells." Cancer Res 49(11): 2999-3006.

[40] van Diest, P. J., J. P. Baak, et al. (1992). "Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project." Hum Pathol 23(6): 603-7.

[41] Zwanenburg, T. S., L. H. Mullenders, et al. (1984). "Induction of DNA lesions, chromosomal aberrations, and G2 delay by bromo- and chlorodeoxyuridine." Basic Life Sci 29 Pt A: 69-82.



# ANNEXES

## HISTOCHIMIE



\*HEMATOXYLINE – EOSINE – SAFRAN

- solutions

### -Hématoxyline :

Hématoxyline stabilisée SPECI (réf 00911) diluée au 1/3 dans une solution diluante (eau distillée 1000mL, Alun potassique 100g, PROLABO ref 21 110 296)

|                                 |                     |         |
|---------------------------------|---------------------|---------|
| - <u>Alcool chlorhydrique</u> : | Ethanol 100°        | 2000 mL |
|                                 | Eau distillée       | 2000 mL |
|                                 | Acide chlorhydrique | 10 mL   |

### -Eosine :

Solution aqueuse d'érythrosine à 1% (erythrosine B réf. 1.15936, Merck).

Acidifier par quelques gouttes d'acide acétique avant utilisation.

### -Safran :

Solution alcoolique de safran à 1%

Faire sécher 10g de safran à 56° pendant 24 heures (Safran, ref. 11507736, Labonord).

Réduire le safran en poudre et ajouter 1000 mL d'éthanol absolu.

Laisser infuser à l'étuve plusieurs jours.

- Protocole :

|                      |            |
|----------------------|------------|
| Hématoxyline         | 6 minutes  |
| Eau distillée        |            |
| Alcool chlorhydrique | 3 secondes |
| Eau distillée        |            |
| Eosine               | 5 minutes  |
| Eau distillée        | 3 minutes  |
| Alcool 95°           | 3 minutes  |
| Alcool absolu        | 3 minutes  |
| Safran               | 5 minutes  |
| Alcool absolu        | 5 minutes  |
| Toluène              | 5 minutes  |
| Monter à l'Eukitt    |            |

## IMMUNOHISTOCHIMIE

### \*Diluants pour anticorps primaires

0,30 g d'azide de sodium

0,18 g de N-ethyl-maléimide

60 mL de glycérol

9,9 mL de sérum albumine bovine à 30% non cristallisée

tampon PBS sans tween QSP 300 mL

### \*Tampon citrate pH 6,0

36 mL d'acide citrique à 21,01g/L

164 mL de citrate de sodium à 29,41g/L

eau distillée QSP 2 L

### \*Tampon PBS-Tween

Tampon phosphate 100mM pH 7,4

NaCl 150 mM

Tween 20 0,1% (v/v)

### \*Tampon d'équilibration pH 9,4

Tris-HCl 1M pH 7,6 (100 mL)

NaCl 5M (20 mL)

MgCl<sub>2</sub> 1M (50 mL) (Laboratoire de Mr Nabet)

Eau biologie moléculaire (50 mL)

Ajuster le pH à 9,4

### \*tampon d'électrophorèse

Tris 6,06g (0,05 M)

Glycine 28,85g (0,384 M)

SDS 20% 5ml (0,1%)

Eau QSP 1l

\*tampon de transfert

Tris 6,06g (25mM)  
Glycine 28,85g (192 mM)  
Méthanol 400mL (20%)  
Eau QSP 2L

\*rouge Ponceau

Ponceau S 2g  
Acide trichloroacétique 30g  
Eau distillée QSP 1L

\*solution de saturation

Dans 1L de TBST 1X, ajouter 50g de lait écrémé en poudre  
Faire des aliquots de 40 mL et congeler à -20°C.

\* Kit de coloration NovaRED (Vector, Burlingame, CA, USA)

La solution est préparée extemporanément et comprend :

5 mL d'eau distillée  
3 gouttes de réactif 1 ; bien mélanger  
2 gouttes de réactif 2 ; bien mélanger  
2 gouttes de réactif 3 ; bien mélanger  
2 gouttes de la solution de peroxyde d'hydrogène

La solution est déposée sur la lame. Attendre 4 à 5 minutes puis rincer à l'eau courante

\*Kit Zénon (Z 25052, Molecular Probes, commercialisé par Interchim, Montluçon, France)

- La solution est préparée extemporanément et comprend

Une solution A : constituée de fragments Fab biotinylés d'IgG1 anti souris

Une solution B : constituée d'IgG de souris non spécifique

- Protocole

Mélanger 5µL de la solution A avec 1 µg d'anticorps primaire

Laisser 5 minutes à la température du laboratoire

Ajouter ensuite 5 µL de la solution B

Bien mélanger et laisser 5 minutes à la température du laboratoire

Utiliser la solution finale dans les 30 minutes suivantes pour incuber les coupes

Poursuivre avec les étapes faisant suite à l'anticorps secondaire.

| ANTICORPS PRIMAIRES                                                                                     | ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Ki-67 clone MIB-1 (Dako)<br>Anticorps monoclonal de souris isotype IgG1<br>1/400 <sup>e</sup>           | Anticorps anti souris biotinylé de chèvre<br>Dako E433<br>1/200 <sup>e</sup>        |
| ICBP 90 (Protéogénix)<br>Anticorps monoclonal de souris isotype IgG1<br>1/50 <sup>e</sup>               | Anticorps anti souris biotinylé de chèvre<br>Dako E433<br>1/200 <sup>e</sup>        |
| Ki-67 monoclonal de lapin (Neomarkers)<br>Anticorps monoclonal de lapin<br>1/300 <sup>e</sup>           | Anticorps anti lapin biotinylé de chèvre<br>Dako E432<br>1/200 <sup>e</sup>         |
| Histone phosphorylée H3<br>Anticorps polyclonal de lapin<br>1/3000 <sup>e</sup>                         | Anticorps anti lapin biotinylé de chèvre<br>Dako E432<br>1/200 <sup>e</sup>         |
| MAB-1 (Hydroxyprobe)<br>Anticorps monoclonal de souris isotype IgG1<br>1/50 <sup>e</sup> si sur 1 heure | Anticorps anti IgG1 de souris biotinylé de lapin<br>Rockland<br>1/1000 <sup>e</sup> |
| Tout anticorps monoclonal de souris isotype IgG1                                                        | Anticorps anti IgG1 de souris biotinylé de lapin<br>Rockland<br>1/1000 <sup>e</sup> |

**Tableau n° 14 : résumé des différents anticorps primaires utilisés et des anticorps secondaires appropriés.**

VU

NANCY, le **18 mars 2005**

Le Président de Thèse

NANCY, le **18 mars 2005**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur **F. PLENAT**

Professeur **P. NETTER**

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le **24 mars 2005**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1

Professeur **J.P. FINANCE**

## **RESUME DE LA THESE**

---

L'application des techniques immunohistochimiques de routine sur des tissus de souris donne lieu à des signaux non désirés résultant pour une grande partie de la reconnaissance des immunoglobulines endogènes par le système de révélation. Dans notre travail, nous avons précisé la localisation et la quantité d'immunoglobulines endogènes au sein de différents tissus murins et selon le mode de fixation employé. Plusieurs méthodes de diminution de ces signaux ont été testés faisant appel soit à une pré incubation de la lame avec des fragments d'immunoglobulines anti souris, soit à une modification du système de révélation par une pré incubation de l'anticorps primaire avec l'anticorps secondaire, ou par l'utilisation d'un anticorps secondaire dirigé contre la chaîne lourde des IgG1. Ensuite, le meilleur système de révélation a été appliqué dans une étude immunohistochimique comparative de plusieurs marqueurs de prolifération (Mib-1, Ki-67 monoclonal de lapin, ICBP90 et histone H3 phosphorylée) sur des glioblastomes humains greffés chez des souris athymiques. Enfin, les effets d'un retard de fixation sur ces marqueurs ont été comparés aux effets observés sur l'indice mitotique en HES.

---

### **TITRE EN ANGLAIS**

Non expected signals in immunohistochemistry on mouse tissues. Comparative studies of revelation systems. Application in studying influence of fixation delay on tumor proliferation index.

---

### **THESE :**

MEDECINE SPECIALISEE – ANNEE 2005

---

### **MOTS CLEFS :**

MODELE ANIMAL – IMMUNOHISTOCHIMIE – INDICE DE PROLIFERATION – ANTICORPS MONOCLONAUX-

---

### **INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :**

Faculté de Médecine de Nancy  
9, avenue de la Forêt de Haye  
54505-VANDOEUVRE LES NANCY Cedex