



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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

pour obtenir le grade de
Docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Nathalie GEHIN épouse MARCON

le 13 juin 2008

LE GLYOXAL : UN POSSIBLE SUBSTITUT DU FORMALDEHYDE EN ANATOMIE PATHOLOGIQUE ?

Examineurs de la thèse :

M. F. PLENAT	Professeur	}	Président
M. J-M. VIGNAUD	Professeur	}	
Mme E. ALBUISSON	Professeur	}	Juges
M. C. PARIS	Professeur	}	
Mme J. CHAMPIGNEULLE	Docteur	}	

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^{er} Cycle :

du 2^{ème} Cycle :

du 3^{ème} Cycle :

de la Vie Facultaire :

M. le Professeur François ALLA

M. le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

M. le Professeur Marc BRAUN

M. le Professeur Bruno LEHEUP

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND

=====
PROFESSEURS HONORAIRES

Jean LOCHARD – Gabriel FAIVRE – Jean-Marie FOLIGUET

Guy RAUBER – Paul SADOUL – Raoul SENAULT

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-Marie GILGENKRANTZ – Simone GILGENKRANTZ

Pierre ALEXANDRE – Robert FRISCH – Michel PIERSON – Jacques ROBERT

Gérard DEBRY – 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 –

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

Michel WEBER – Gérard FIEVE – Daniel SCHMITT – Colette VIDAILHET – Alain BERTRAND – Hubert GERARD

Jean-Pierre NICOLAS – Francis PENIN – Michel STRICKER – Daniel BURNEL – Michel VIDAILHET – Claude BURLET –

Jean-Pierre DELAGOUTTE – Jean-Pierre MALLIÉ – Danièle SOMMELET – Professeur Luc PICARD

Professeur Guy PETIET

=====
PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} 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^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur Jean-Pierre CRANCE

Professeur François MARCHAL – Professeur Philippe HAOUZI

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire (type mixte : biologique))

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Olivier ZIEGLER

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LOZNIEWSKI

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)

Professeur Bernard FORTIER

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (Médecine et santé au travail)

Professeur Guy PETIET – Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUSSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Christian JANOT – Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Pierre LEDERLIN – Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Pierre BEY – Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Dan LONGROIS – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES

2^{ème} sous-section : (Réanimation médicale)

Professeur Henri LAMBERT – Professeur Alain GERARD

Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT – Professeur Bruno LÉVY

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique)

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI

Professeur Xavier DUCROCQ

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE

Professeur Thierry CIVIT

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean-Marie ANDRE – Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeur Jacques POUREL – Professeur Isabelle VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE

Professeur Didier MAINARD – Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique)

Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL

Professeur Christian de CHILLOU

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACE

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie)

Professeur Marc-André BIGARD

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

2^{ème} sous-section : (Chirurgie digestive)

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

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

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Luc CORMIER

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne)

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^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Pierre MONIN

Professeur Jean-Michel HASCOET – Professeur Pascal CHASTAGNER – Professeur François FEILLET –

Professeur Cyril SCHWEITZER

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO – Professeur Bruno DEVAL

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie et maladies métaboliques)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

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

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeur Jean-François CHASSAGNE

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT

Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteur Béatrice MARIE

Docteur Laurent ANTUNES

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} 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^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

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

Docteur Bruno CHENUUEL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Docteur Didier QUILLIOT – Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteur Francine MORY – Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX – Docteur Véronique VENARD

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)

Docteur Marie-France BIAVA – Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Docteur Marie MACHOUART

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Docteur Pierre GILLOIS

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Docteur François SCHOONEMAN

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique))

Docteur Lina BEZDETNYA épouse BOLOTINE

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Docteur Anne KENNEL – Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteur Christophe PHILIPPE

**48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)

Docteur Jacqueline HELMER – Docteur Gérard AUDIBERT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

50^{ème} Section : RHUMATOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteur Anne-Christine RAT

**54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE,
ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE

Monsieur Vincent LHUILLIER

40^{ème} section : SCIENCES DU MÉDICAMENT

Monsieur Jean-François COLLIN

60^{ème} section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

64^{ème} section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

Monsieur Franck DALIGAULT

65^{ème} section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Pierre TANKOSIC – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS

Madame Natalia DE ISLA

66^{ème} section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

67^{ème} section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE

Madame Nadine MUSSE

68^{ème} section : BIOLOGIE DES ORGANISMES

Madame Tao XU-JIANG

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Professeur associé Alain AUBREGE

Docteur Francis RAPHAEL

Docteur Jean-Marc BOIVIN

Docteur Jean-Louis ADAM

Docteur Elisabeth STEYER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Michel BOULANGE – Professeur Alain LARCAN - Professeur Daniel ANTHOINE

Professeur Paul VERT - Professeur Pierre MATHIEU - Professeur Gilbert THIBAUT

Mme le Professeur Colette VIDAILHET – Professeur Alain BERTRAND - Professeur Jean-Pierre NICOLAS

Professeur Michel VIDAILHET – Professeur Marie-Claire LAXENAIRE - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ

Mme le Professeur Simone GILGENKRANTZ - Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Danièle SOMMELET

Professeur Luc PICARD - Professeur Guy PETIET – Professeur Pierre BEY – Professeur Jean FLOQUET

Professeur Michel PIERSON – Professeur Michel STRICKER -

=====

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)
Vanderbilt 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 Cytologie pathologiques (option biologie)

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail et d'accepter la présidence du jury de cette thèse,

Pour votre disponibilité, vos précieux conseils qui nous ont permis de mener à bien ce travail

Veillez trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et de notre profond respect.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur J.M. VIGNAUD
Professeur d'Anatomie et Cytologie pathologiques

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

Vos connaissances scientifiques et médicales ainsi que votre riche enseignement ont contribué à nos progrès durant ces années,

Veillez trouver ici la manifestation de notre profonde estime et de notre vive reconnaissance.

A nos Juges,

Madame le Professeur E. ALBUISSON

Professeur de Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de communication

Pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger à notre jury de thèse,

Pour votre grande disponibilité, votre soutien et vos précieux conseils,

Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre profonde gratitude et de notre sincère reconnaissance.

Monsieur le Professeur C. PARIS

Professeur de Médecine et Santé au travail

Pour l'intérêt que vous avez porté à notre thèse et la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger celle-ci,

Veillez accepter l'expression de notre respect et nos sincères remerciements pour votre participation.

A notre Maître et Juge,

Madame le Docteur J. CHAMPIGNEULLE
Docteur en Anatomie et Cytologie Pathologiques

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse,

*Nous vous remercions très sincèrement pour votre grande disponibilité,
votre enseignement riche et rigoureux tout au long de notre internat, ainsi
que pour la confiance que vous nous accordez,*

*Veillez trouver dans ce travail la manifestation de notre profond
respect et sincère reconnaissance.*

A nos Maîtres successifs,

Monsieur le Docteur A. COURRIER

Monsieur le Professeur M.A. BIGARD

Monsieur le Professeur J.M. VIGNAUD

Monsieur le Professeur P. JONVEAUX

Monsieur le Professeur F. PLENAT

Madame le Docteur A. LEROUX

Nous remercions tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

Madame Denise THIEBAULT, Madame Sylviane PIZZAGALLI, Madame le Docteur Nathalie MONHOVEN, Madame Corinne BONNET,

Pour votre précieuse aide et efficace collaboration à la réalisation technique de ce travail de thèse.

Mesdames les Docteurs Karine Montagne et Aude Bressenot, ainsi que Claire Bastien,

Un grand merci pour votre collaboration et participation active à ce travail.

Mesdames les techniciennes et secrétaires du laboratoire d'Anatomie Pathologique des Hôpitaux de Brabois,

Merci pour votre collaboration à la bonne réalisation de ce travail.

A Amandine, Aude, Claire, Karine, Olivia, Virginie, collègues et amies,

Pour tous les bons moments passés ensemble,

Pour votre aide et soutien toutes ces dernières années.

A tous les médecins et à tous les membres des laboratoires d'Anatomie et de Cytologie pathologiques des Hôpitaux de Brabois, de l'Hôpital Central et du Centre de Lutte contre le Cancer Alexis Vautrin.

A mon mari, Philippe,

Pour tout ce qu'il me donne sans compter,

A mes filles adorées, Manon et Maélys,

Pour leurs sourires et rires quotidiens, indispensables

Avec tout mon amour...

A mes parents, tout particulièrement,

Pour leur dévouement, leur soutien constant et leurs encouragements sans réserve au cours de mes années d'études,

Avec toute mon affection et ma profonde reconnaissance

A mes sœurs, Pascale et Christine, et mes beaux-frères, Olivier et Stéphane,

Avec toute mon affection

A mes neveux et nièces, Frédéric, Théo, Nicolas, Marion, Lou-Anne,

Avec toute ma tendresse

A ma grand-mère, Suzanne,

Avec tout mon attachement

A mes beaux-parents, à Isabelle et Stéphane,

Pour leur gentillesse et leur soutien

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 ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou 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 sont 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 ».

Table de matières

Remerciements	9
Serment	18
Table de matières	20
Liste des abréviations utilisées	25
Liste des tableaux	27
Liste des figures	28
Introduction	29
Première partie : Constats préliminaires sur le formaldéhyde en Anatomie Pathologique en 2008	32
1. Propriétés physico-chimiques	33
1.1. Propriétés physiques	33
1.2. Propriétés chimiques	34
2. Sources et fabrication industrielle	35
3. Utilisations	36
4. Risques et Toxicité	37
4.1. Risques d'incendie	37
4.2. Toxicité sur l'homme	37
4.2.1. Toxicité aiguë et chronique	37
4.2.2. Effets sur la reproduction	38
4.2.3. Risque de cancer	39
4.2.3.1. Mécanismes d'action	39
4.2.3.2. Classifications actuelles du formaldéhyde	41
4.2.3.3. Etudes épidémiologiques	41
4.2.3.3.1. Cancer du nasopharynx	42
4.2.3.3.2. Leucémies	43
4.2.3.3.3. Cancers naso-sinusiens	44
4.3. Evaluation des risques sanitaires liés aux expositions au formaldéhyde dans l'air	45
5. Place du formaldéhyde en Anatomie pathologique	47
5.1. Le formaldéhyde, base de nos référentiels	47
5.2. Données sur l'exposition professionnelle au formaldéhyde en Anatomie Pathologique	47
5.2.1. Quantification de l'exposition professionnelle au risque chimique	48
5.2.1.1. Valeurs limites d'exposition professionnelle	48
5.2.1.1.1. Valeurs limites françaises	48
5.2.1.1.2. Valeurs limites indicatives étrangères	48
5.2.1.2. Techniques de mesurage de l'exposition professionnelle	50

5.2.1.2.1. Support réactif + HPLC	50
5.2.1.2.2. Support réactif + GC	51
5.2.1.2.3. Badges réactifs ou colorimétriques	51
5.2.1.2.4. Autres méthodes	51
5.2.2. Estimation des populations professionnelles exposées au formaldéhyde	51
5.2.3. Evaluation des niveaux d'exposition	52
5.2.3.1. Base de données COLCHIC	52
5.2.3.2. Recherche bibliographique sur Medline	54
5.2.3.3. Relevés de concentrations maximales mesurées au Québec	57
5.2.3.4. Etude des niveaux d'exposition au CHU de Nancy	58
5.2.4. Conséquences réglementaires liées à l'utilisation du formaldéhyde	58
Deuxième partie : le glyoxal	61
1. Historique	62
2. Fabrication industrielle	62
3. Propriétés physico-chimiques	63
3.1. Propriétés physiques	63
3.2. Propriétés chimiques	64
4. Utilisations	64
5. Métabolisme du glyoxal	64
6. Risques et Toxicité	65
6.1. Risques	65
6.2. Toxicité expérimentale	65
6.3. Toxicité sur l'homme	66
6.3.1. Toxicité aiguë	66
6.3.2. Toxicité chronique	66
7. Valeurs limites d'exposition professionnelle	67
8. Intérêt du glyoxal en Anatomie Pathologique	67
Troisième partie : Matériels et méthodes	69
1. Les fixateurs testés	70
1.1. Le formol à 10% (v/v) pH 7,4	70
1.2. Le glyoxal	70
1.2.1. Solutions préparées au laboratoire	70
1.2.2. Glyo-fixx™	70
1.3. Le glutaraldéhyde	71
1.4. Autres fixateurs	71
2. Fixation de gélatine en solution	71
3. Recherche d'une auto-fluorescence des coupes déparaffinées	71
4. Fixation de pièces opératoires ou de biopsies	71

4.1. Etude de la diffusion	72
4.1.1. Etude macroscopique	72
4.1.2. Etude microscopique	72
4.2. Histologie traditionnelle et histochimie	73
4.2.1. Appréciation de la qualité micro-anatomique des préparations après coloration de routine	74
4.2.2. Colorations histochimiques spéciales	75
4.2.3. Evaluation des effets du pH sur la micro-anatomie	76
4.2.4. Evaluation des effets d'une fixation à long terme sur la micro-anatomie.....	76
5. Immunohistochimie	76
5.1. Les antigènes étudiés.....	76
5.2. Les différents pré-traitements testés.....	78
5.2.1. Pré-traitement par la chaleur humide dans un autoclave.....	78
5.2.2. Pré-traitement par la chaleur humide en autocuiseur dans un tampon Tris Citrate 2mM pH 9.....	78
5.2.3. Pré-traitement par la chaleur humide en autoclave et par digestion enzymatique à la collagénase	79
5.3. Etapes suivantes de la technique immunohistochimique après pré-traitement	81
5.4. Stabilité antigénique des tissus dans les blocs	81
5.5. Interprétation des résultats	81
6. Techniques d'hybridation in situ	82
6.1. Réalisation technique des sondes d'ADN génomique humain total	82
6.2. Protocole d'hybridation.....	82
6.3. Révélation des hybrides.....	83
7. Les études ultrastructurales	83
7.1. Microscopie électronique à transmission	84
7.2. Microscopie électronique à balayage	85
8. Etude moléculaire	85
8.1. Analyse de l'ADN par technique de Polymérisation en chaîne (PCR).....	85
8.1.1. Extraction de l'ADN	85
8.1.2. Dosage de l'ADN des échantillons.....	86
8.1.3. Protocole de vérification de la qualité de l'ADN.....	86
8.2. Analyse de l'ARN	87
8.2.1. Extraction de l'ARN	88
8.2.2. Dosage de l'ARN des échantillons.....	88
8.2.3. Analyse de l'ARN par utilisation des puces AGILENT RNA 6000 NANO série II 88	
Quatrième partie : Résultats	90
1. Paramètres physiques de la fixation	91

1.1. Correspondance entre remaniements macroscopiques et espace de diffusion des fixateurs	91
1.2. Comparaison des espaces de diffusion : étape macroscopique. Variation de consistance	91
1.3. Comparaison microscopique de la distribution des groupements aldéhydiques libres	93
1.4. Rétraction tissulaire	94
2. Etude de la fixation d'une solution de gélatine	94
3. Recherche d'une auto-fluorescence des coupes tissulaires déparaffinées	94
4. Etude morphologique	96
4.1. Coloration Hématoxyline-éosine-safran (HES)	96
4.1.1. Choix de la solution de glyoxal-éthanol	96
4.1.2. Résultats de l'étude morphologique sur les colorations HES	96
4.2. Colorations histochimiques spéciales	113
4.3. Effets du pH sur la micro-anatomie	116
4.4. Conséquences d'une fixation prolongée sur la micro-anatomie	117
5. Etude immunohistochimique	118
6. Hybridation in situ	128
7. Microscopie électronique	129
8. Biologie moléculaire	132
8.1. Analyse de l'ADN	132
8.2. Analyse de l'ARN	135
Cinquième partie : Discussion	139
Conclusion	152
Références bibliographiques	155
Annexes	164

Liste des abréviations utilisées

ACD : Agent Chimique Dangereux
ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AFFSET : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail
ANPE : Agence Nationale Pour l'Emploi
ARN : Acide RiboNucléique
ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CISH : Hybridation *in situ* à sonde chromogène
CMR : Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques
CNAMTS : Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés
COSHH-HSE/C : Control of Substances Hazardous to Health-Health and Safety Commission/Executive
CRAM : Caisse Régionale d'Assurance Maladie
DECOS : Dutch Expert Committee on Occupational Standards'
DFG : Deutsche Forschungsgemeinschaft
DRT : Direction des Relations du Travail
EC-SCOEL : European Commission-Scientific Committee on Occupational Exposure Limits
EEC : European Economic Community
FDA : Food and Drug Administration
FISH : Hybridation *in situ* à sonde fluorescente
HCN-DECOS : Health Council of the Netherlands-Dutch Expert Committee on Occupational Standards
HES : Hématoxyline Eosine Safran
IARC : International Agency for Research on Cancer
IHC : Immunohistochimie
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité
IRSST : Institut de Recherche Robert-Sauvé en Santé et en Sécurité du Travail
LIC : Laboratoires Interrégionaux de Chimie
MAC : Maximal Aanvaarde Concentraties
MAK : Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MRL : Minimal Risk Level
NIOSH : National Institute for Occupational Safety and Health
OEHHA : Office of Environmental Health Hazard Assessment

OEL : Occupational Exposure limits
OSHA : Occupational Safety & Health Administration
PAS : Periodic Acid Schiff
PCR : Polymerase Chain reaction
PEL : Permissible Exposure Limits
Ppm : Partie par million
REL : Reference Exposure Level
RIN : RNA Integrity Number
SCOEL : Scientific Committee on Occupational Exposure Limits
SMR : Standardized Mortality Ratio
STEL : Short Exposure Limit
TLV : Threshold Limit Value
TWA : Time-Weighted Average
VGAI : Valeur Guide de qualité de l'Air Intérieur
VLE : Valeur d'Exposition Limite (ou VLEP court terme)
VLEP : Valeur Limite d'Exposition Professionnelle
VME : Valeur Moyenne d'Exposition (ou VLEP 8 heures)
WEL : Workplace Exposure Limits

Liste des tableaux

Tableau 1	Principales propriétés physiques du formaldéhyde.....	34
Tableau 2	Valeurs toxiques de référence (VTR) de l'OEHHA et de l'ATSDR	46
Tableau 3	Niveaux d'exposition professionnelle selon différents organismes	49
Tableau 4	Estimations SUMER, CAREX et INRS-CMR du nombre de salariés potentiellement exposés au formaldéhyde dans le secteur d'activité 'Santé'	52
Tableau 5	Statistiques sur les niveaux d'exposition	53
Tableau 6	Liste des articles recensés dans la littérature concernant l'exposition professionnelle au formaldéhyde entre 1997 et 2007 dans des laboratoires d'Anatomie Pathologique, des salles d'anatomie ou d'embaumeurs.....	56
Tableau 7	Sources d'exposition au formaldéhyde et concentrations maximales mesurées en ppm dans 10 laboratoires de pathologie québécois.....	57
Tableau 8	Plage de concentrations mesurées sur les travailleurs de 10 laboratoires de pathologie.....	58
Tableau 9	Tableau n°43 des maladies professionnelles du régime général : affections provoquées par l'aldéhyde formique et ses polymères.....	60
Tableau 10	Principales propriétés physiques du glyoxal en comparaison avec celles du formaldéhyde.....	63
Tableau 11	Comparaison des VLEP et des tensions de vapeur du glyoxal et du formol	67
Tableau 12	Les différentes colorations histochimiques réalisées en fonction des tissus prélevés	75
Tableau 13	Anticorps testés avec leurs principales caractéristiques.....	77
Tableau 14	Les différents pré-traitements testés en fonction des anticorps	80
Tableau 15	Tailles des prélèvements de parenchyme hépatique avant fixation et après 24h de fixation et mesures du liseré périphérique en fonction du fixateur utilisé (Formol versus Glyo-fixx TM)	92
Tableau 16	Degré d'accord et valeur de Kappa.....	97
Tableau 17	Comparaison des tests de Fleiss et de Cohen.....	97
Tableau 18	Etude de concordance entre lecteurs : kappa multi juges de Fleiss.....	98
Tableau 19	Tableaux récapitulatifs des résidus (A) et des contributions au Khi- deux en % (B).....	100
Tableau 20	Khi-deux par organes en fonction des fixateurs, tous paramètres confondus.....	108
Tableau 21	Résultats de l'étude immunohistochimique : anticorps testés en fonction de différents pré-traitements et des fixateurs.....	121
Tableau 22	Résultats de l'étude immunohistochimique sur les prélèvements de rate : CD3, CD20 et bcl2.....	123
Tableau 23	Les différents pré-traitements et dilutions testés pour l'anticorps TTF1 sur les prélèvements pulmonaires	125
Tableau 24	Concentrations ADN en µg/ µL pour chacun des 4 prélèvements de cœur, poumon, ganglion et rein selon leur fixation.....	133
Tableau 25	ADN : quantité totale extraite, tous organes confondus (en µg)	133
Tableau 26	Concentrations ARN en µg/ µL pour chacun des 4 prélèvements de cœur, poumon, ganglion et rein selon leur fixation.....	136
Tableau 27	ARN : quantité totale extraite, tous organes confondus (en µg)	136

Liste des figures

Figure 1	Métabolisme du formaldéhyde	40
Figure 2	Amorces utilisées dans le protocole de vérification de la qualité de l'ADN extrait par PCR BIOMED-2.....	87
Figure 3	Aspect macroscopique des tranches de section du parenchyme hépatique (cas n°1)	92
Figure 4	Argentation : formol/glyoxal.....	93
Figure 5	Fixation d'une solution de gélatine en tubes à essai	95
Figure 6	Auto-fluorescence des coupes déparaffinées d'échantillons tissulaires fixés dans différents fixateurs	95
Figure 7	Etude morphologique : exemple du poumon.....	105
Figure 8	Etude morphologique : exemple du ganglion - maladie de Hodgkin -	106
Figure 9	Etude morphologique : estomac.....	110
Figure 10	Etude morphologique : prostate.....	111
Figure 11	Coloration par le Bleu de Toluidine : colon.....	115
Figure 12	Coloration de Fontana : colon	115
Figure 13	Coloration de Giemsa : ganglion (maladie de Hodgkin)	115
Figure 14	Coloration de Perls : foie	115
Figure 15	Effets du pH de la solution glyoxal 4%-éthanol 10% sur des échantillons de colon.....	116
Figure 16	Mise en évidence des hématies par la Glycophorine en immunohistochimie	117
Figure 17	Aspect histologique d'un prélèvement hépatique fixé dans le glyoxal pendant 4 semaines	118
Figure 18	Immunohistochimie sur la rate : exemple de l'anticorps anti-CD20	126
Figure 19	Immunohistochimie sur le poumon : exemple du TTF1.....	126
Figure 20	Hybridation in situ : exemple du rein	129
Figure 21	Microscopie électronique à balayage : aspect des lymphocytes d'un parenchyme ganglionnaire avec différents fixateurs.....	130
Figure 22	Microscopie électronique à transmission : aspect des lymphocytes d'un parenchyme ganglionnaire avec différents fixateurs.....	131
Figure 23	PCR Biomed 2 – ganglion -	134
Figure 24	Migration ADN total - ganglion -	135
Figure 25	Analyse sur Agilent de l'ARN extrait de prélèvements de cœur et de poumon : gel d'électrophorèse.....	137
Figure 26	Analyse sur Agilent de l'ARN : électrophorégrammes des échantillons de cœur et poumon	138

Introduction

La préservation des aspects macroscopiques et microscopiques des tissus et des cellules a dominé les préoccupations techniques des morphologistes pendant de nombreuses décennies et demeure une exigence essentielle pour la pratique d'une anatomie pathologique de qualité. La conservation de la forme passe par une nécessaire étape de fixation permettant la stabilisation des dispositions spatiales existantes mais labiles pour que ces dernières supportent les pré-traitements auxquels les cellules et tissus doivent être soumis avant de procurer des préparations microscopiques utilisables. Sur le plan histochimique, la qualité d'un bon fixateur dépend non seulement de sa capacité à immobiliser la substance recherchée mais également de son aptitude à préserver la constitution chimique et l'architecture tridimensionnelle des molécules dont la mise en évidence est souhaitée, permettant ainsi les analyses moléculaires *in situ* (histochimie, histoenzymologie, immunohistochimie, hybridation *in situ*, etc) et *ex situ* après extraction de macromolécules à partir d'échantillons fixés et inclus dans de la paraffine.

Depuis son introduction en 1893, le formaldéhyde, sous la forme d'une solution de formol diluée au 1/10ème ou de celles de fixateurs composés de formules variées, est de très loin l'agent fixant le plus utilisé en pathologie. C'est à partir de prélèvements fixés par des liquides à base de formaldéhyde qu'ont été établies les sémiologies macroscopiques et microscopiques d'une majorité de maladies et définis le plus grand nombre des paramètres pronostiques et prédictifs de la réponse thérapeutique. Le formol n'est, cependant, pas un fixateur idéal. Il présente notamment des risques pour la santé et a récemment été classé par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme cancérigène pour l'homme (catégorie 1), plaçant ainsi nos structures dans le champ d'application du décret n°2001-97 de février 2001 relatif à la prévention des risques CMR, du décret n°2003-1254 relatif à la prévention du risque chimique, de l'article R 231-56 du code du travail et de la circulaire DRT 12 du 24 mai 2006 relative aux règles générales de prévention du risque chimique et aux règles particulières à prendre contre les risques d'exposition aux produits cancérigènes, mutagènes et toxiques chez l'homme. Cette réglementation impose la substitution du formaldéhyde, si la mesure est techniquement possible. Ceci a conduit de nombreux fabricants à commercialiser des substituts qui, tout en étant « inoffensifs », présenteraient les qualités attendues d'un fixateur polyvalent pour l'histologie. Il s'agit, le plus souvent, de fixateurs composés à base de glyoxal (éthane dial), un dialdéhyde bicarboné.

Avant d'abandonner le formol, il convient de vérifier que le substitut proposé n'est pas aussi, voire plus dangereux que celui-ci et que son utilisation ne bouleverse pas les référentiels sur lesquels est fondé le diagnostic des maladies. Les connaissances sur le

glyoxal en tant que fixateur sont très limitées. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude comparative des propriétés fixatrices du formol et du glyoxal en pratique anatomopathologique, dont nous rapportons les résultats dans les pages suivantes.

**Première partie : Constats préliminaires sur le
formaldéhyde en Anatomie Pathologique en 2008**

Après la présentation des principales propriétés physico-chimiques du formaldéhyde, des procédés utilisés pour sa fabrication industrielle, de ses diverses utilisations ainsi que ses effets toxiques, nous aborderons sa place prépondérante en Anatomie et Cytologie Pathologiques et les problèmes soulevés par son éventuelle substitution, depuis son classement comme agent cancérogène avéré par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 2004.

1. Propriétés physico-chimiques

Le formaldéhyde est connu sous diverses dénominations : aldéhyde formique, méthanal, oxométhane. A la fin du XIX siècle, des solutions industrielles de formaldéhyde étaient commercialisées sous les noms de formol (fabrique de teinture Meister, Lucius et Bruning à Höchst sur le Main) et de formaline (Schering). Ces dénominations sont toujours utilisées pour désigner les solutions aqueuses commerciales non purifiées respectivement dans les pays de langue française et anglaise. Le paraformaldéhyde étant un polymère libérateur de formaldéhyde, utilisé pour préparer des solutions pures de cet aldéhyde, il est donc tout à fait incorrect de parler de fixation au paraformaldéhyde.

1.1. Propriétés physiques

A température ambiante, le formaldéhyde est un gaz incolore, d'odeur piquante et suffocante. Il est très soluble dans l'eau et dans les solvants polaires tels que l'éthanol, l'acétone et l'oxyde de diéthyle [1].

Ses principales caractéristiques physiques sont résumées dans le tableau 1.

	FORMALDEHYDE
Formule	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \text{H} \end{array} > \text{C} = \text{O}$
Synonymes	Méthanal, oxométhane, aldéhyde formique, formol, formaline
Masse Molaire	30,03
Point de fusion	-92°C; -118°C
Point d'ébullition	-20 à -19°C
Densité (g/cm ³)	0,816
Densité de vapeur (air = 1)	1,04-1,06
Tension de vapeur	517-519 kPa à 25°C
Point d'éclair	85°C
Température d'auto inflammation	424°C

Tableau 1 : Principales propriétés physiques du formaldéhyde

1.2. Propriétés chimiques

Le formaldéhyde est un des composés organiques les plus réactifs. Il polymérise très facilement, en particulier à froid ou en présence d'impuretés polaires (acides, alcalins) ou d'eau. Dans l'eau, à température ambiante, le formaldéhyde est présent sous forme d'hydrate et de poly(oxyméthylène)glycols, oligomères qui troublent les solutions aqueuses. Le méthanol et certains stabilisants, tels que des dérivés de la cellulose, permettent de ralentir ou d'inhiber la polymérisation.

Le formaldéhyde n'est donc pas facilement isolé ou manipulé à l'état pur. Il n'est pas commercialisé sous forme gazeuse, mais sous celle de solutions aqueuses à des concentrations de 30 à 55 % en poids (formol ou formalin) ou sous ses formes polymérisées : le paraformaldéhyde (polymère), présenté sous forme de poudre ou de cristaux blancs et le trioxane (trimère), qui est un solide cristallin.

En anatomie pathologique, les solutions aqueuses à 40% (m/v), c'est-à-dire contenant 40g de paraformaldéhyde pour 100mL de solution, sont les plus utilisées. Ces mêmes solutions sont dites à 37% (m/m) quand leur concentration est exprimée en masse de formaldéhyde pour 100 mg de solution. Pour les techniques de routine, ces solutions à

40% sont diluées au 1/10^{ème} dans un solvant approprié, permettant l'obtention d'une solution renfermant 4 % (m/v) ou 3,7 % (m/m) de formaldéhyde.

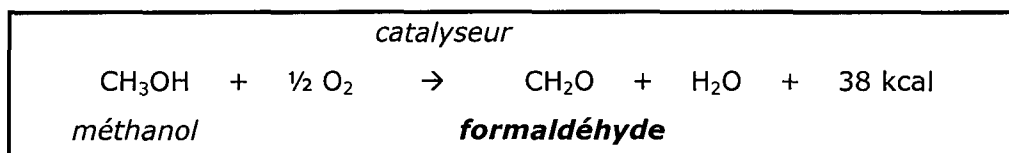
2. Sources et fabrication industrielle

Le formaldéhyde est retrouvé de façon ubiquitaire dans l'environnement, provenant de processus naturels et artificiels.

Parmi les sources naturelles, sont identifiés l'oxydation photochimique des composés organiques volatils d'origine naturelle (méthane, isoprène...), le métabolisme de la majorité des organismes vivants, l'émission par les bactéries, les algues, le plancton et la végétation, l'irradiation solaire des substances humiques présentes dans l'eau, la combustion de la biomasse (feux de forêt...) et les premiers stades de décomposition des résidus végétaux dans le sol.

Les sources artificielles regroupent toutes les formes de combustion (incinérateurs de déchets, centrales énergétiques, chauffage des bâtiments, tabagisme...), la combustion incomplète des carburants par les véhicules non équipés de pot catalytique, la production, utilisation, stockage, transport et élimination de la substance ou préparations en contenant, le relargage des produits tels que les panneaux de bois, peintures, tapis, matériaux d'isolation..., les libérateurs de formaldéhyde contenus dans certains médicaments, produits cosmétiques, peintures..., l'oxydation photochimique des composés organiques volatils d'origine non naturelle.

La fabrication industrielle s'effectue par oxydation du méthanol par l'oxygène de l'air, en phase de vapeur, en présence d'un catalyseur (procédés à l'argent ou faisant appel à un oxyde de fer ou de molybdène).



La production globale de formaldéhyde en 1999 est estimée à 5-6 millions de tonnes (Asie : 1-1,5 ; Amérique du Nord : 1-1,5 ; Europe de l'ouest : 2-2,5 millions de tonnes).

3. Utilisations

En dehors de l'utilisation dans les laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques pour la fixation des tissus, le formaldéhyde est employé dans de nombreux autres domaines professionnels.

Il est, en effet, principalement utilisé comme intermédiaire de synthèse pour la fabrication de résines urée-formol, phénol-formol, mélamines-formol, polyacétals (industrie du bois, du papier, les matériaux d'isolation, l'industrie des matières plastiques, l'industrie textile...) et de nombreux produits chimiques.

Il est également employé comme agent désinfectant et biocide (fongicide, bactéricide, insecticide). De ces propriétés découlent des applications nombreuses et diverses : produits d'entretien ménagers et industriels, industrie agroalimentaire, industrie des cosmétiques, industrie pharmaceutique, médecine humaine et animale (désinfectant, embaumage...)...

Enfin, il est utilisé comme agent de coagulation et de conservation du latex, durcisseur de films dans l'industrie photographique, inhibiteur de corrosion dans l'industrie mécanique et métallurgique....

La production et la consommation de formaldéhyde en France peuvent être estimées à partir de plusieurs sources différentes [2] :

- ✓ Selon les enquêtes statistiques du ministère de l'industrie, la production annuelle pour l'année 2002 s'élevait à 79 200 tonnes.
- ✓ Selon les flux du commerce extérieur collectés par l'administration des douanes, les importations de formaldéhyde sont estimées, pour la période de juin 2006 à mai 2007, à 73 216 tonnes, provenant essentiellement des Pays-Bas, de Belgique, d'Espagne et d'Allemagne.
- ✓ L'étude réalisée en 2005 par l'Union des Industries Chimiques évalue la consommation annuelle de formaldéhyde à 280 000 tonnes, dont 235 000 tonnes pour la fabrication de résines aminoplastes ou phénoplastes.
- ✓ L'inventaire des agents chimiques CMR (Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques), réalisé en 2005 à la demande du ministère du travail, estimait la consommation de formaldéhyde en France à 125 000 tonnes par an [3]. Cette

enquête fournit également une évaluation de la consommation annuelle par secteur d'activités et par type d'utilisation : environ la moitié du tonnage apparaît destiné à la fabrication des résines aminoplastes ou phénoplastes ; 1 000 tonnes pour les activités hospitalières (agent désinfectant), 935 tonnes pour la fabrication de savons, détergents et produits d'entretien (désinfectant) et 24 tonnes pour l'utilisation en laboratoires (autopsies et conservation d'organes).

4. Risques et Toxicité

4.1. Risques d'incendie

Le formaldéhyde est un gaz très inflammable, pouvant former des mélanges explosifs avec l'air. Ses solutions aqueuses, stabilisées avec du méthanol, peuvent s'enflammer et leurs vapeurs peuvent former des mélanges explosifs avec l'air. Sa température d'auto-inflammation est de 424°C et son point d'éclair de 85°C. A titre d'exemple, le point d'éclair d'une solution aqueuse à 37% de formaldéhyde, stabilisée par 15% de méthanol, est d'environ 50°C.

4.2. Toxicité sur l'homme

4.2.1. Toxicité aiguë et chronique

Comme pour de nombreuses autres substances chimiques ayant des conséquences sur la santé humaine, le degré des effets pour une concentration donnée varie d'une personne à l'autre (variabilité inter-individuelle) et chez un individu donné au cours du temps (variabilité intra-individuelle). Les effets attribués à l'exposition au formaldéhyde ne sont pas spécifiques et de nombreux autres facteurs sont capables d'induire les mêmes malaises (autres substances chimiques, particules et poussières, air sec, tabac...).

Dans le cas d'un contact direct avec la peau, le formaldéhyde peut entraîner des lésions cutanées telles que des irritations, des dermites de contact irritatives et des dermites de contact allergiques. Les symptômes se traduisent par des démangeaisons, des picotements et des rougeurs. Une sensibilisation est susceptible d'apparaître après un contact avec des solutions aqueuses de formaldéhyde de concentration égale ou supérieure à 2% ou des solides ou résines contenant du formaldéhyde libre. Lorsqu'une

personne est sensibilisée, les manifestations de l'allergie cutanée risquent de se produire à chaque contact avec des solutions de concentrations de plus en plus faibles (à partir de 0,5% de formaldéhyde). Ces effets sont facilement évitables par protection de la peau exposée (par exemple, port de gants).

La perception olfactive et la sensibilité aux effets irritants du formaldéhyde varient d'un individu à l'autre. L'odeur est perçue à des concentrations comprises entre 0,1 et 1 ppm. Dans le cas d'une exposition à l'air contaminé, le premier effet consiste en une irritation des yeux et des muqueuses aériennes supérieures. Les symptômes associés sont des picotements, rougeurs ou brûlures du nez et de la gorge, des écoulements nasaux et des yeux larmoyants. Ces symptômes sont généralement de degré négligeable à léger lorsque les concentrations de formaldéhyde sont inférieures à 1 ppm. Ils peuvent devenir gênants voire intolérables à des concentrations plus élevées, notamment si elles excèdent 2 à 3 ppm [4].

Dans de rares cas, le formaldéhyde peut entraîner des altérations de la fonction pulmonaire de type sensibilisant ou allergique, se traduisant par une diminution de la capacité pulmonaire et le déclenchement de crises d'asthme. Ces effets ont été observés chez des sujets, asthmatiques ou non, exposés à plus de 2 ppm. L'effet allergène du formaldéhyde peut être aggravé par la présence de particules ou de poussières, qui provoquent des réactions bronchiques, même à des concentrations inférieures à 2 ppm. Le formaldéhyde est donc considéré comme un agent causal d'asthme professionnel. Cependant, les concentrations documentées occasionnant de telles pathologies dépassent souvent la concentration de 2 ppm et le formaldéhyde n'est généralement pas le seul déclencheur.

Dans des situations extrêmes comme des accidents, il est possible que le formaldéhyde soit présent dans l'air en fortes concentrations, représentant un danger immédiat considérable. Des concentrations égales ou supérieures à 50 ppm peuvent induire un bronchospasme sévère et des lésions caustiques graves de l'arbre respiratoire (oedème pulmonaire aigu, ulcérations trachéales et bronchiques).

4.2.2. Effets sur la reproduction

Les effets des expositions au formaldéhyde sur les différents paramètres de la reproduction (fertilité, avortement, poids de naissance, malformations...) ont été évalués dans onze études épidémiologiques. Les seuls effets inconstamment rapportés sont une

augmentation des avortements spontanés et une diminution du poids de naissance, chez des femmes exposées au formaldéhyde [5]. Ces résultats ne peuvent toutefois être rattachés de façon certaine au formaldéhyde, le rôle d'autres facteurs de risque ne pouvant être totalement exclu.

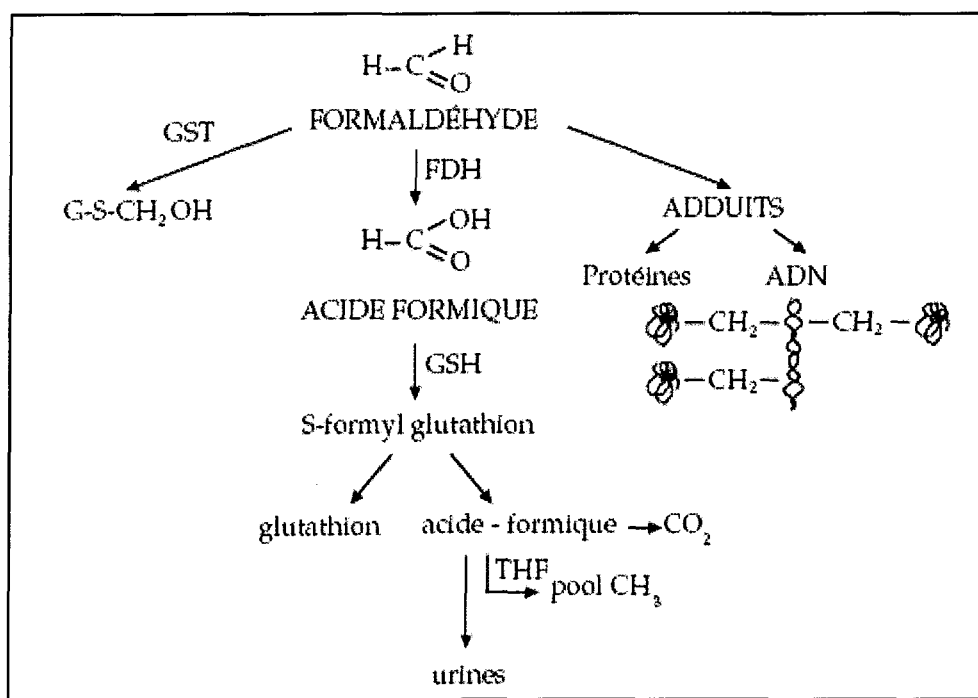
4.2.3. Risque de cancer

4.2.3.1. Mécanismes d'action

Le formaldéhyde réagit principalement avec les groupements NH_2 terminaux et les fonctions polaires des chaînes latérales des acides aminés, c'est-à-dire les groupements amine, guanidyle, hydroxyle, thiol et les noyaux indole, imidazole et phénol des protéines et des peptides. Les mécanismes réactionnels sont gouvernés par la réactivité relative de ces différents groupements et les conditions du milieu. L'ensemble des résultats acquis indique l'intervention prédominante des résidus lysine. Les groupements thiol, facilement oxydés, ne jouent probablement qu'un rôle limité *in vivo*. La réaction est équilibrée et donc potentiellement réversible. Le taux de conversion des fonctions amine primaire *in vitro* varie de 3 à 22 % en fonction de la séquence de la protéine. Le formaldéhyde est connu pour pouvoir également réagir avec les groupes amine primaire exocycliques des bases des acides nucléiques d'une part, ainsi qu'avec les groupes imine endocycliques de celles ne comportant pas de fonction amine primaire d'autre part, pour donner également des adduits hydroxyméthyle. Un petit nombre de groupements hydroxyméthyle subissent une déshydratation conduisant à la formation de groupements imine très réactifs (bases de Schiff). Si les conditions stériques sont favorables (la longueur de la liaison est de 2 Å), les groupes imine sont le sujet d'une attaque par un autre nucléophile avec formation de ponts intra ou intermoléculaires. Les plus fréquents sont les ponts méthyléniques $\text{R-CH}_2\text{-R'}$. Ces derniers se développent toujours aux dépens de chaînes latérales de nature chimique différente (groupement amine primaire dans un premier temps, puis interaction avec d'autres résidus d'acide aminé tel que l'arginine, l'asparagine, la glutamine, l'histidine et le tryptophane dans un deuxième temps). Elles peuvent également impliquer des groupes amine primaire de macromolécules non protéiques comme les acides nucléiques. Le développement de ponts intercaténaires avec l'ADN ne peut se développer que si ce dernier est dénaturé. Les réactions d'addition sur les bases font, en effet, intervenir les groupements fonctionnels amine primaire ou imine qui participent, par ailleurs, à la formation des liaisons hydrogène stabilisant la double hélice. Ces liaisons doivent être rompues pour que les réactions d'addition puissent se développer.

Par ailleurs, l'attaque des nucléophiles sur le carbonyle du formaldéhyde se fait selon un angle optimum de 107°. Ceci n'est possible qu'après dénaturation.

Inhalé à l'état de vapeur, le formaldéhyde se dépose essentiellement au niveau des voies respiratoires supérieures (nez et rhinopharynx). A ce niveau, la toxicité est limitée par le système de clairance des conduits aériens. Le formaldéhyde qui interagit avec les protéines du mucus est éliminé avec ce dernier par l'escalator muco-ciliaire. A forte concentration, cependant, ce dernier est inhibé. Le formaldéhyde est par ailleurs pour partie métabolisé dans la cellule. Il s'agit, en effet, d'un intermédiaire normal du métabolisme cellulaire. L'aldéhyde est ainsi soit éliminé dans les urines, soit métabolisé dans le pool CH₃ via une voie dépendante du tétrahydrofolate (figure 1). Une exacerbation des effets mutagènes peut se produire en cas de déplétion en glutathion.



FDH formaldéhyde déshydrogénase ; **GST** glutathion S-transférase ; **THF** tétrahydrofolate

Figure 1 : Métabolisme du formaldéhyde

Le formol est donc un carcinogène à seuil, direct par action sur l'ADN avec une cinétique non linéaire de liaison à l'ADN et indirect par action sur la prolifération cellulaire [6]. Il induit en effet des réponses non néoplasiques à type d'inhibition des fonctions muco-ciliaires, de dégénérescence épithéliale, d'inflammation et de lésions de métaplasie. Il provoque des mutations ponctuelles du gène p53 dans les cellules nasales de rat [7]. L'effet toxique du formaldéhyde est dû à sa forte réactivité chimique plus qu'à une transformation métabolique.

4.2.3.2. Classifications actuelles du formaldéhyde

Le potentiel carcinogène du formaldéhyde a été évalué par de nombreuses agences ou organisations. Les classifications ont changé à plusieurs reprises, évoluant en fonction des données actualisées et des ré-analyses des études épidémiologiques existantes [8].

Actuellement, le formaldéhyde est considéré comme :

- ✓ un carcinogène potentiel (catégorie 3) selon le National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH 'potential occupational carcinogen (nasal cancer)' 2005).
- ✓ une substance avec un potentiel carcinogène pour lequel le mode d'action principal est non-génotoxique (catégorie 4) pour la Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG 'substance with carcinogenic potential for which a non-genotoxic mode of action is of prime importance' 2006).
- ✓ un carcinogène suspecté pour l'homme (catégorie A2) pour l'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH 'suspected human carcinogen' 2006).
- ✓ une substance de catégorie 3 pour l'European Economic Community (EEC 'substance which causes concern for man owing to possible carcinogenic effects but in respect of which the available information is not adequate for making a satisfactory assessment' 2004).
- ✓ un carcinogène chez l'homme (groupe 1) selon l'International Agency for Research on Cancer (IARC 'carcinogenic to humans' 2006).

En effet, en juin 2004, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a réévalué le formaldéhyde et l'a classé en 'carcinogenic for human' (groupe 1) [5], auparavant dans le groupe 2A 'probably carcinogenic to humans' [9].

Les indications de cancérogénicité chez l'homme ont été considérées comme suffisantes pour le cancer du nasopharynx, fortes mais non suffisantes pour les leucémies et limitées pour les cancers naso-sinusiens. Bien que plusieurs études aient mis en évidence des associations entre exposition au formaldéhyde et d'autres localisations de cancer (notamment cavité buccale, oropharynx, hypopharynx, larynx, poumon, pancréas et cerveau), les résultats ne sont pas, dans l'ensemble, suffisamment cohérents pour étayer l'hypothèse d'une relation causale pour ces cancers.

4.2.3.3. Etudes épidémiologiques

Les trois principales études de cohorte, concernant des travailleurs exposés au formaldéhyde sont :

- ✓ La cohorte du National Cancer Institute des USA (NCI), qui concerne les travailleurs exposés de 10 usines produisant ou utilisant du formaldéhyde [10].
- ✓ La cohorte du National Institute for Occupational Safety and Health des USA, qui porte sur des travailleurs du textile exposés au formaldéhyde [11].
- ✓ La cohorte des travailleurs britanniques de l'industrie chimique [12].

Plusieurs études cas-témoins ont également étudié la relation entre formaldéhyde et différents cancers, notamment du nasopharynx et des cavités naso-sinusiennes, avec l'avantage d'avoir, pour ces cancers rares, une puissance statistique supérieure à celle des études de cohorte.

4.2.3.3.1. Cancer du nasopharynx

Le nasopharynx est la localisation pour laquelle il existe le plus d'arguments en faveur d'une relation entre exposition au formaldéhyde et cancer.

Un excès de décès significatif par cancer du nasopharynx est observé dans la cohorte du NCI [10], la plus importante cohorte de travailleurs de l'industrie du formaldéhyde. Le 'Standardized Mortality ratio' (SMR), basé sur 8 cas observés, est de 2,1 (IC 95% : 1,05 – 4,21) chez les sujets exposés. Dans une analyse interne des résultats, le risque relatif de décès par cancer du nasopharynx augmente significativement en fonction des pics d'exposition ($p < 0,001$) et de l'exposition cumulée ($p = 0,025$), et de façon moins nette avec l'intensité moyenne d'exposition ($p = 0,066$), la relation avec la durée d'exposition n'étant pas significative ($p = 0,147$).

En revanche, dans les deux autres études de cohorte de travailleurs industriels, le nombre de cancers du nasopharynx est inférieur au nombre attendu. Cependant, le déficit est faible, comme le nombre attendu de cancer : 1 cas observé pour 2 attendus dans la cohorte des travailleurs britanniques [12] et aucun cas pour 0,96 attendu dans la cohorte de travailleurs du textile [11].

Au total, sur l'ensemble des cohortes présentant des résultats sur le cancer du nasopharynx, 18 cas sont rapportés contre 13 attendus, soit environ 30% de plus.

Sur sept études cas-témoins, ayant évalué la relation entre exposition au formaldéhyde et cancer du nasopharynx, 2 ne mettent pas en évidence d'association significative, alors

que 5 d'entre elles révèlent un risque élevé de cancer du nasopharynx en cas d'exposition au formaldéhyde, avec pour certaines des indications d'une relation dose-effet [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19].

Dans une méta-analyse de Collins en 1997 [20], évaluant le risque de cancers du poumon, des cavités nasales et du nasopharynx avec l'exposition au formaldéhyde, l'ensemble des études combinées donnait un excès statistiquement significatif de cancer nasopharyngé. Cet excès n'est pas retrouvé lorsque les analyses sont réalisées séparément, ne permettant pas de conclure à une relation causale entre exposition au formaldéhyde et cancer du nasopharynx.

Ainsi, l'IARC, sur la base de l'observation d'un excès de décès et d'une relation exposition-effet dans l'étude de cohorte du NCI [10], confirmé par plusieurs études cas-témoins, a classé le formaldéhyde, anciennement dans le groupe 'carcinogène probable pour l'homme' [9], dans le groupe 'carcinogène avéré pour l'homme' [5], en concluant à l'existence d'une association causale entre exposition au formaldéhyde et cancer du nasopharynx [21].

Cependant, plusieurs publications sont parues après la dernière évaluation de l'IARC et semblent suggérer la nécessité de reconsidérer l'actuelle classification établie par cette organisation. Les études menées ultérieurement indiquent en effet que l'association causale, mise en évidence dans la cohorte du NCI [10] est très discutable [22], [23] et que l'affirmation 'le formol est cancérigène pour l'homme' est probablement trop forte. Ces études minimisent le risque de cancer nasopharyngé dû à une exposition professionnelle au formaldéhyde. Elles reprennent, de plus, les données des études animales, qui révèlent qu'un niveau d'exposition suffisamment bas pour protéger le tractus respiratoire contre une hyper-prolifération 'cytotoxique-induite' de l'épithélium, devrait être associé à un risque négligeable de cancer. Ainsi, selon ces dernières études, comme la plupart des taux d'exposition sont basés sur le seuil irritatif, qui produit une marge de sécurité vis à vis des manifestations cytotoxiques, il ne semble pas nécessaire d'adapter et de revoir à la baisse les niveaux d'exposition actuels [24], [4].

4.2.3.3.2. Leucémies

Dans la plupart des cohortes d'embaumeurs, des travailleurs de services funéraires et d'anatomopathologistes, des excès de décès par leucémie, principalement myéloïde, sont

observés, toujours basés sur un faible nombre de cas et statistiquement significatifs dans une seule étude [25].

Cependant, une méta-analyse récente [26] montre un risque relatif de leucémie significativement augmenté pour les embaumeurs (mRR=1,6 ; IC 95% : 1,2 – 6) et pour les anatomopathologistes (mRR=1,4 ; IC 95% : 1 – 1,9), alors que le RR combiné est de 0,9 (IC 95% : 0,8 – 1) pour les travailleurs industriels et que sur l'ensemble des études, il est de 1,1 (IC 95% : 1 – 1,2).

Concernant les trois principales cohortes industrielles, deux donnent des éléments en faveur d'une association entre exposition au formaldéhyde et leucémie :

- ✓ Dans la cohorte du NCI, la mortalité par leucémie chez les exposés n'excède pas celle de la population générale, mais des relations dose-effet significatives sont observées, notamment une augmentation significative du risque de leucémie avec les pics d'exposition au formaldéhyde et avec l'intensité moyenne d'exposition. [10]
- ✓ Dans la cohorte du NIOSH, un excès de décès par leucémie, particulièrement myéloïde, est également observé. Les SMR augmentent avec la durée d'exposition et avec le temps écoulé depuis le début de l'exposition [11].
- ✓ Dans la cohorte des travailleurs britanniques, l'étude de bonne qualité, avec une puissance statistique suffisante, ne constate aucun excès de décès par leucémie. [12]

Une étude cas-témoin en population a été réalisée, donnant, pour l'ensemble des leucémies, un odds ratio (OR) de 1 pour une exposition faible (IC 95% : 0,7 – 1,4) et de 0,7 pour une exposition élevée (IC 95% : 0,2 – 2,6).

Par ailleurs, les données disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas d'identifier quel mécanisme pourrait induire des leucémies chez l'homme [21].

Sur ces données, l'IARC a donc conclu qu'une relation causale entre exposition au formaldéhyde et leucémie ne peut être établie avec suffisamment de certitude.

4.2.3.3.3. Cancers naso-sinusiens

Dans les trois principales études de cohorte de travailleurs de l'industrie, aucun excès de cancer naso-sinusal n'est mis en évidence (5 cas observés au total contre 5 attendus). Cependant, ces études manquent de puissance pour mettre en évidence un excès pour un cancer aussi rare. Une étude de cohorte danoise [13] met, quant à elle, en évidence

un excès significatif de cancers naso-sinusiens, plus marqué chez les ouvriers, qu'ils aient ou non une exposition concomitante aux poussières de bois.

Dans leur ensemble, les études cas-témoins suggèrent l'existence d'une association entre formaldéhyde et cancer naso-sinusien. L'association est plus marquée pour les adénocarcinomes naso-sinusiens que pour les carcinomes épidermoïdes. En raison de la très forte association entre l'exposition aux poussières de bois et l'augmentation du risque d'adénocarcinome, il est difficile d'évaluer un effet propre du formaldéhyde sur ce cancer, la plupart des cas étant soumis par ailleurs à une exposition au bois.

Ainsi, en raison de la discordance entre les résultats des études de cohorte et des études cas-témoins et l'impossibilité d'exclure l'existence d'un effet de confusion lié à l'exposition concomitante aux poussières de bois dans les études positives, l'association causale entre exposition au formaldéhyde et cancer naso-sinusien ne peut être affirmée.

4.3. Evaluation des risques sanitaires liés aux expositions au formaldéhyde dans l'air

Suite à la révision de la classification du formaldéhyde par le CIRC, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail [27] a été saisie en 2004 par les Ministères chargés de la santé, de l'écologie et de l'emploi, afin d'évaluer les risques sanitaires liés au formaldéhyde. L'instruction de cette saisine a été confié au Comité d'Experts Spécialisés 'Evaluation des risques liés aux milieux aériens', qui a mandaté un groupe de travail « formaldéhyde ». Leurs missions sont d'analyser les données toxicologiques, d'identifier précisément les produits concernés par la présence de formaldéhyde, d'analyser et quantifier les voies d'exposition, de procéder à une évaluation globale des risques sanitaires et d'indiquer l'existence de produits de substitution.

Concernant l'exposition professionnelle, particulièrement dans notre domaine d'activités, les données actuelles sont présentées dans le paragraphe suivant.

Concernant l'évaluation des risques sanitaires liés aux expositions de la population française au formaldéhyde dans l'air, hors exposition spécifique en milieu professionnel, nous ne citerons que les points importants mis en évidence lors de cette évaluation, rapportée dans le rapport d'expertise collective.

- ✓ Des Valeurs Toxiques de Référence (VTR) à seuil pour des durées d'exposition aiguë, intermédiaire et chronique, pour la voie aérienne, construites sur la base

des effets critiques (irritations oculaires et des voies respiratoires), précurseurs de l'induction des tumeurs du nasopharynx, ont été proposées. Le tableau n°2 présente les différentes valeurs retenues par l'AFFSET, qui correspondent aux VTR de l'OEHHA (REL) [28, 29] et de l'ATSDR (MRL) [30].

Exposition	Organisme	VTR
Exposition aiguë	OEHHA (1999)	REL = 94 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (1h)
	ATSDR (1999)	MRL = 50 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (<14 jours)
Exposition intermédiaire	ATSDR (1999)	MRL = 30 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (15-365 jours)
Exposition chronique	OEHHA (1999)	REL = 3 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (>1 an, moy 36 ans)
	ATSDR (1999)	MRL = 10 $\mu\text{g.m}^{-3}$ (>1 an)

OEHHA Office of Environmental Health Hazard Assessment ; **ATSDR** Agency for Toxic Substances and Disease Registry ; **REL** Reference Exposure Level ; **MRL** Minimal Risk Level

Tableau 2 : Valeurs toxiques de référence (VTR) de l'OEHHA et de l'ATSDR

- ✓ En l'état actuel des connaissances, suite à ces évaluations, le rapport précise que, *a priori*, une partie de la population pourrait ressentir des irritations oculaires et nasales causées par la présence de formaldéhyde dans les logements, et qu'il n'est pas exclu à ces niveaux, que le formaldéhyde soit responsable de phénomènes de sensibilisation allergique chez les plus jeunes individus, bien que pour ces effets, la relation causale ne soit pas clairement déterminée.
- ✓ Par ailleurs, des Valeurs Guides de qualité d'Air Intérieur (VGAI) ont été proposées dans le cadre de l'auto-saisine de l'AFFSET [27]. Ces valeurs, spécifiques de l'air intérieur et construites exclusivement sur des critères sanitaires, sont exprimées sous forme de concentration dans l'air, associée à un temps d'exposition, d'une substance chimique, en dessous de laquelle aucun effet sanitaire, aucune nuisance ou aucun effet indirect important sur la santé n'est en principe attendu pour la population générale. Ainsi, compte tenu des connaissances actuelles, l'Agence propose une valeur guide de qualité d'air intérieur court terme (applicable sur 2 heures) de 50 $\mu\text{g.m}^{-3}$ et une valeur guide de qualité d'air intérieur long terme de 10 $\mu\text{g.m}^{-3}$.

5. Place du formaldéhyde en Anatomie pathologique

5.1. Le formaldéhyde, base de nos référentiels

Depuis son introduction en 1893, le formaldéhyde, sous la forme d'une solution de formol diluée au 1/10ème ou de celles de fixateurs composés de formules variées (plus de 200 formules publiées [31]), est de très loin l'agent fixant le plus utilisé en anatomie pathologique. C'est ainsi qu'une étude (N Marcon, non publiée, cf Annexe 1), portant sur plus de 3000 articles publiés de 2000 à 2007 dans 20 revues (19 revues de langue anglaise et à comité de lecture) dont 15 de pathologie, montre que le liquide fixateur utilisé pour les travaux est dans 99% des cas une solution à base de formol. C'est à partir de prélèvements fixés avec de telles solutions qu'ont été établies les sémiologies macroscopiques et microscopiques d'une majorité de maladies et définis le plus grand nombre des paramètres morphologiques pronostiques et prédictifs de la réponse thérapeutique. En pathologie tumorale, nous n'avons pas trouvé de recommandations de sociétés savantes prônant l'utilisation de fixateurs non formoliques pour les études en microscopie optique. La chimie des interactions qui se développent entre le formaldéhyde et les molécules tissulaires lors de la fixation a fait l'objet de très nombreux travaux. De nombreuses techniques d'analyse moléculaire *in situ* sur coupes histologiques (histochimie, histoenzymologie, immunohistochimie, hybridation *in situ*) ou *ex situ* après extraction de macromolécules à partir d'échantillons fixés au formol et inclus dans de la paraffine ont été développées. Elles permettent l'étude de molécules spécifiques ou portent sur la composition globale des tissus (établissement de profils moléculaires). La fixation formolique est au moins pour partie réversible. De nombreux réactifs, notamment immunohistochimiques, ont été sélectionnés par l'industrie pour fonctionner sur des tissus fixés au formol. Les macromolécules dans les blocs de tissus fixés sont stables. La séquence du virus de la grippe espagnole de 1918 a été pour partie établie à partir d'acides nucléiques extraits de blocs de paraffine de fragments de poumons fixés au formol conservés dans les laboratoires de l'institut américain des forces armées. Enfin, le formaldéhyde est un puissant biocide dont l'emploi limite le risque infectieux au laboratoire, hormis le prion et éventuellement le bacille de Koch [32].

5.2. Données sur l'exposition professionnelle au formaldéhyde en Anatomie Pathologique

5.2.1. Quantification de l'exposition professionnelle au risque chimique

5.2.1.1. Valeurs limites d'exposition professionnelle

5.2.1.1.1. Valeurs limites françaises

En France, le ministère du travail a fixé des valeurs limites d'exposition professionnelle indicatives qui définissent les niveaux de concentrations à ne pas dépasser dans l'air des lieux de travail.

La définition réglementaire de la valeur d'exposition professionnelle (VLEP) est donnée par les articles R.231-54-1 et R.231-56 du code du travail. Il s'agit de la limite de la moyenne pondérée en fonction du temps de la concentration d'un agent chimique dangereux (ACD) ou d'un agent cancérogène, mutagène ou toxique pour la reproduction (CMR), dans l'air de la zone de respiration d'un travailleur au cours d'une période de référence déterminée. Au niveau réglementaire, la période est soit de 8 heures, correspondant à la VLEP 8 heures (anciennement VME pour Valeur Moyenne d'Exposition), soit de 15 minutes, correspondant à la VLEP court terme (anciennement VLE pour Valeur d'Exposition Limite).

Pour le formaldéhyde, les valeurs limites françaises indicatives sont les suivantes :

- **VLEP – 8h (VME) : 0,5 ppm ou 0,61 mg/m³** (moyenne d'exposition pondérée, 8h/jour, 40h/semaine).
- **VLEP – court terme (VLE) : 1 ppm ou 1,23 mg/m³** (mesurée sur une période de 15 minutes au maximum).

5.2.1.1.2. Valeurs limites indicatives étrangères

Les niveaux d'exposition professionnelle établis pour le formaldéhyde varient considérablement d'une agence à une autre, d'un pays à un autre (tableau 3).

			8-heures (ppm)	Court-terme (ppm)
Etats-Unis	ACGIH	2006	-	0,3 (TLV-C)
	OSHA	2006	0,75 (PEL)	2 (PEL-STEL)
Europe	EC-SCOEL	2006	0,2 (OEL)	0,4 (OEL-STEL)
Pays-Bas	HCN-DECOS	2003	0,12 (MAC)	0,42 (MAC-STEL)
Allemagne	DFG	2006	0,3 (MAK)	-
Royaume-Uni	COSHH-HSC/E	2006	2 (WEL)	2 (WEL)

ACGIH American Conference of Industrial Hygienists; **OSHA** Occupational Safety & Health Administration; **EC-SCOEL** European Commission-Scientific Committee on Occupational Exposure Limits; **HCN-DECOS** Health Council of the Netherlands-Dutch Expert Committee on occupational Standards; **DFG** Deutsche Forschungsgemeinschaft; **COSHH-HSC/E** Control of substances hazardous to Health-Health and Safety Commission/Executive.

TLV-C Threshold limit value-ceiling; **PEL** permissible exposure limits; **STEL** short exposure limit; **OEL** occupational exposure limit; **MAC** maximal aanvaarde concentraties; **MAK** maximale Arbeitsplatz-Konzentration; **WEL** workplace exposure limit.

Tableau 3 : Niveaux d'exposition professionnelle selon différents organismes

- ✓ Aux USA, l'ACGIH recommande 0,3 ppm comme valeur seuil limite (ceiling-TLV), basée sur les effets irritatifs. L'OSHA a établi des limites d'exposition (PEL) de 0,75 ppm pour une exposition moyenne de 8 heures et de 2 ppm pour une durée de 15 minutes, en reconnaissant au formaldéhyde un effet carcinogène potentiel, en plus de ses effets irritants et sensibilisants.
- ✓ Au niveau européen, aucun seuil d'exposition au formaldéhyde n'a été établi, mais des recommandations provisoires, provenant du SCOEL, ont été suggérées en 2006 : 0,2 ppm (8 heures = OEL-TWA) et 0,4 ppm (15 minutes = OEL-STEL), basées sur la valeur de 0,3 ppm, valeur à laquelle apparaissent les irritations locales. Le SCOEL considère en effet que le début de l'irritation oculaire est un paramètre très sensible, qui apporte une marge de sécurité vis à vis de l'irritation et de la prolifération cellulaire 'cytotoxique-induite'.
- ✓ Aux Pays-Bas, les valeurs (MAC) sont de 1,25 et 2,5 ppm, pour des expositions respectivement de 8 heures et de 15 minutes. Cependant, en 2003, le DECOS recommandait une diminution de ces valeurs, respectivement à 0,12 et 0,42 ppm. La valeur de 0,12 ppm est suggérée, en estimant que 0,25 ppm représente le niveau d'exposition le plus bas, à partir duquel l'irritation sensorielle peut survenir chez un pourcentage faible mais significatif de travailleurs exposés. Il considère également que ce niveau est suffisamment bas pour protéger les personnels exposés contre les dommages tissulaires notamment naso-pharyngés et en

conséquence du risque potentiel de cancer. Il recommande par ailleurs la valeur de 0,42 ppm pour une exposition court terme, suite à une étude sur des volontaires ayant présenté une discrète irritation oculaire à partir de niveaux d'exposition supérieurs à 0,84 ppm après 6 minutes d'exposition.

- ✓ En Allemagne, la DFG propose une valeur maximale (MAK) de 0,3 ppm, sur la base des effets irritatifs oculaires. Cette valeur est définie comme le niveau auquel aucune relation significative avec le risque de cancer chez les travailleurs exposés n'est attendue.
- ✓ En Angleterre, les valeurs pour le formaldéhyde (WEL) sont de 2 ppm quel que soit le temps d'exposition. Ces seuils dérivent de valeurs plus anciennes, appelées alors OEL, établies dans les années 1980, converties en WEL en 2005.

Il est à noter enfin, qu'aux USA, ces valeurs sont actuellement revues à la baisse. Les nouveaux seuils proposés par le National Institute for Occupational Safety and Health (N.I.O.S.H) seraient de 0,016 ppm pour la VME (ou VLEP 8h) et de 0,1 ppm pour la VLE (VLEP court terme).

5.2.1.2. Techniques de mesurage de l'exposition professionnelle

La mesure de l'exposition professionnelle au formaldéhyde concerne actuellement uniquement sa pénétration par les voies respiratoires. La voie d'exposition cutanée est rarement prise en compte.

Plusieurs techniques de mesurage de l'exposition professionnelle existent :

5.2.1.2.1. Support réactif + HPLC

Les méthodes de mesure de l'exposition professionnelle aux aldéhydes, dont le formaldéhyde, validées, consistent à prélever l'air des lieux de travail, par pompage, à un débit régulé, sur un support de prélèvement généralement constitué de gel de silice imprégné de 2,4-dinitrophényl hydrazine (DNPH). En présence d'aldéhydes, il se forme des hydrazones qui seront ensuite quantifiées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détection par spectrophotométrie UV.

Ce type de méthode est actuellement le plus utilisé et le plus fiable [33].

5.2.1.2.2. Support réactif + GC

Des méthodes similaires, basées sur l'utilisation d'un support de résine XAD 2 imprégnée de 2-hydroxyméthylpiperidine, existent. Les oxazolidines résultantes sont quantifiées par chromatographie en phase gazeuse (GC), couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Cette méthode est peu utilisée en France.[34]

5.2.1.2.3. Badges réactifs ou colorimétriques

Les badges correspondent à des dispositifs de prélèvements passifs, constitués d'un support imprégné de réactif, de type DNPH ou autre.

Ces dispositifs fournissent des mesures plus ou moins fiables de l'exposition aux aldéhydes selon les badges, en raison de coefficients de diffusion variables et d'interférences possibles dans le cas de badges colorimétriques [35].

5.2.1.2.4. Autres méthodes

Il s'agit de la spectroscopie infra-rouge (analyseurs photo-acoustiques), dont la fiabilité est conditionnée essentiellement par l'étalonnage des appareils, des méthodes colorimétriques, dont l'inconvénient principal est leur sensibilité à la présence d'agents chimiques interférents (alcools, cyclohexanone) et des barboteurs, dont l'utilisation est peu pratiques pour des prélèvements individuels.

5.2.2. Estimation des populations professionnelles exposées au formaldéhyde

Trois sources de données sont disponibles pour estimer le nombre de salariés exposés au formaldéhyde :

- ✓ Selon l'étude CAREX, il y avait en France, durant la période 1990-1993, 307 000 travailleurs potentiellement exposés au formaldéhyde. Cette étude a montré que la moitié des travailleurs exposés appartenait au secteur des activités de soins (hôpitaux, laboratoires d'anatomie pathologique...) [36].
- ✓ Selon l'enquête SUMER 2003 [37], le nombre de travailleurs exposés est de 193 000. Comme dans l'étude CAREX, la plus grande partie des travailleurs exposés appartiennent aux secteurs de la santé et des activités de soins (62 423 salariés),

suivi du secteur de fabrication de résines phénoplastes et/ou aminoplastes (39 400).

- ✓ L'inventaire des agents chimiques CMR utilisés en France en 2005 [3], ciblé sur 30 secteurs d'activités, estime à 42 000 le nombre de salariés exposés au formaldéhyde, dans les secteurs des résines, des désinfectants..., hors secteur santé (hôpitaux, laboratoires d'anatomopathologie...), dont plus de 12 000 dans le secteur de l'industrie pharmaceutique.

Secteur d'activités	SUMER 2003	CAREX (1990-93)	INRS CMR 2005
Santé	62 423	150 330	-
Total	193 076	307 025	41 874

Tableau 4 : Estimations SUMER, CAREX et INRS-CMR du nombre de salariés potentiellement exposés au formaldéhyde dans le secteur d'activité 'Santé'

5.2.3. Evaluation des niveaux d'exposition

5.2.3.1. Base de données COLCHIC

En 1987, à l'instigation de la Caisse Nationale des Travailleurs Salariés (CNAMTS), une base de données d'exposition aux agents chimiques, COLCHIC, a été créée, regroupant l'ensemble des mesures d'exposition effectuées par prélèvement et analyse de l'air des lieux de travail [38][39]. Ces mesures sont réalisées par huit Laboratoires Interrégionaux de Chimie (LIC) des Caisses Régionales d'Assurance Maladie (CRAM) et les laboratoires spécialisés de l'INRS. Concernant le formaldéhyde, 8 811 prélèvements d'air des lieux de travail en vue de quantifier l'exposition professionnelle au formaldéhyde ont été réalisés de 1987 à 2005, lors de 1178 interventions menées dans 793 établissements.

De cette base de données, découlent des statistiques concernant les valeurs limites d'exposition dans les différentes branches d'activité, avec notamment la probabilité de dépassement des VLEP pour chaque branche.

Plus récemment, la nouvelle codification COLCHIC permet de renseigner le métier exercé par le travailleur, ayant fait l'objet d'une mesure d'exposition à un agent chimique, à l'aide de la classification ROME de l'Agence Nationale Pour l'Emploi. Ainsi, depuis 2002, 65 métiers ont été identifiés. Le personnel de laboratoire d'analyses médicales représente 19,5% : technicien de laboratoire d'analyses médicales (code ROME 24212) 12,9 % et anatomocytopathologiques (code ROME 31211) 6,6 %.

Enfin, l'analyse la plus détaillée des données archivées dans COLCHIC concerne le type de tâche réalisée lors des mesures. Pour le formaldéhyde, 209 tâches ont été caractérisées, dont une correspond à la réalisation des examens anatomopathologiques.

Les statistiques sur les niveaux d'exposition (VLEP-court terme et VLEP-8h) pour le groupement d'activité « activités pour la santé humaine » et pour la tâche « réalisation d'examens anatomopathologiques », en rapport avec notre spécialité, déterminées à partir des données de la base COLCHIC, sont présentées dans le tableau 5.

Groupement d'activités	Durée de prélèvement										
	VLEP-Court terme					VLEP-8 heures					
	N	Moy	Méd	Ampli	P1	N	Moy	Méd	Ampli	P90	P2
Activités pour la santé humaine	164	1,64	0,71	0,02-51	31,8	416	0,65	0,19	0,001-14,2	1,69	23,6

A : par groupements d'activité : activités pour la santé humaine

Tâche	Durée de prélèvement										
	VLEP-Court terme					VLEP-8 heures					
	N	Moy	Méd	Ampli	P1	N	Moy	Méd	Ampli	P90	P2
Réalisation d'examens anatomo-pathologiques	116	1,33	0,66	0,005-8,34	31,4	272	0,40	0,19	0,001-8,6	0,97	1,2

B : par tâche : réalisation d'examens anatomopathologiques

N : nombre de mesures ; **Moy** : moyenne ; **Méd** : médiane ; **Ampli** : amplitude.

P1 : probabilité (en %) de dépassement de la VLEP-Court terme (1,23 mg/m³) **P90** : percentile 90 : 90 % des résultats sont inférieurs à cette valeur

P2 : probabilité (en %) de dépassement de la VLEP-8 heures (0,61/m³)

Tableau 5 : Statistiques sur les niveaux d'exposition

L'exploitation de la base de données met donc en exergue le nombre important de secteurs d'activité concernés par l'exposition professionnelle au formaldéhyde et notamment dans le secteur de soins. Malgré une baisse significative des expositions au formaldéhyde depuis 1997, les situations d'exposition, analysées en terme de dépassement des VLEP recommandées, restent préoccupantes dans pratiquement tous les secteurs d'activités.

Par ailleurs, il ressort de cette base de données, la présence d'une co-exposition à d'autres aldéhydes dans un grand nombre de secteurs d'activités, particulièrement dans le secteur des activités de soins. Dans ce secteur, les probabilités de co-exposition les plus fortes correspondent au glutaraldéhyde (4%), à l'acétaldéhyde (1,1 %) et au glyoxal (0,9 %). L'exposition associée à d'autres agents chimiques, tels que le toluène, les xylènes, l'alcool éthylique, est également importante.

5.2.3.2. Recherche bibliographique sur Medline

Les résultats d'une recherche bibliographique de la littérature, menée sur Medline, de 1997 à 2007 traitant de l'exposition professionnelle au formaldéhyde avec des niveaux documentés, sont présentés dans le rapport de l'INRS intitulé « caractérisation de l'exposition professionnelle au formaldéhyde en France » [2]. Les critères de recherche utilisés étaient *formaldéhyde & occupational & exposure*.

Au total, 75 articles ont été recensés et analysés, dont près de la moitié concernent l'exposition au formaldéhyde dans le secteur de la santé et de soins aux personnes. Le tableau suivant (tableau 6) présente les 17 publications relatives aux niveaux d'exposition recensés dans des laboratoires d'anatomopathologie, salles d'anatomie, salles de chirurgie et d'endoscopie et embaumeurs. Dans ces activités, les niveaux d'exposition relevés sont souvent importants et peuvent dépasser les 10 mg/m³ pendant de courtes périodes.

Etudes	Année	Pays	Situation d'exposition	Technique de mesure	Type, nbr mesure	Niveaux d'exposition
Ying <i>et al</i> [40]	1997	Chine	Laboratoire d'anatomopathologie	NIOSH 1977 ?	ns	0,016 – 1,28 mg/m ³
Koda <i>et al</i> [41]	1999	Japon	Laboratoire d'anatomopathologie	Analyseur infrarouge	A, 62	0,8 – 5 ppm; moy 2,3 ppm ('no large specimens') 0,2 – 0,4 ppm; moy 0,3 ppm ('large specimens')
Saternus <i>et al</i> [42]	1999	Allemagne	Laboratoire d'anatomopathologie	Tubes colorimétriques	1, 15	0,5 – 3 ppm
Burgaz <i>et al</i> [43]	2001	Turquie	Laboratoire d'anatomopathologie	Tubes colorimétriques	A, ns	2-4 ppm (2,5 – 5 mg/m ³)
Vaz <i>et al</i> [44]	2001	France	Laboratoire d'anatomopathologie	Support réactif + HPLC	P, 26	Avec ventilation : 0,05 – 1,03 mg/m ³ Sans ventilation : 0,44 – 4,3 mg/m ³
Sari-Minodier <i>et al</i> [45]	2001	France	Laboratoire d'anatomopathologie	Analyseur infrarouge	A, ns	Moy : 1,2 ppm ; Max : 15,1 ppm
Shaham <i>et al</i> [46]	2002	Israël	Laboratoire d'anatomopathologie	ns	A, ns	0,04 – 0,7 ppm ; moy: 0,4 ppm (expo faible) 0,72 – 5,6 ppm ; moy : 2,24 ppm (expo élevée)
Shaham <i>et al</i> [47]	2003	Israël	Laboratoire d'anatomopathologie	ns	A, ns	0,04 – 0,7 ppm ; moy: 0,4 ppm (expo faible) 0,72 – 5,6 ppm ; moy : 2,24 ppm (expo élevée)
Proietti <i>et al</i> [48]	2002	Italie	Laboratoire d'anatomopathologie	Analyseur infrarouge	A, continu	0,2 – 8,07 ppm, moy: 1,8 – 3,78 ppm
Wegscheider <i>et al</i>	2003	Allemagne	Laboratoire d'anatomopathologie	Support réactif + HPLC Analyseur infrarouge	A, continu P, ns	0,2 – 1,8 ppm Percentile 95 : 1,2 – 1,6 mg/m ³

Etudes	Année	Pays	Situation d'exposition	Technique de mesure	Type, nbr mesure	Niveaux d'exposition
Perdelli <i>et al</i> [49]	2006	Italie	Laboratoire d'anatomopathologie	Support réactif + HPLC	A, 106	0,02 – 2,05 mg/m ³ ; Moy: 0,24 mg/m ³
Kellner <i>et al</i>	2003	Allemagne	Laboratoire d'anatomopathologie et salle d'anatomie	Support réactif + HPLC	A,P, ns	1,62 mg/m ³ (VME), >17,9 mg/m ³ (VLE)
Ghasemkhani <i>et al</i> [50]	2005	Iran	Laboratoire d'anatomopathologie Salle de chirurgie Salle d'endoscopie	Spectroscopie	P, 42 P, 42 P, 15	0,03 – 4 ppm ; moy : 0,96 ppm (VME) 0,01 – 0,84 ppm; moy: 0,25 ppm (VME) 0,01 – 0,66 ppm; moy: 0,13 ppm (VME)
Yousefi <i>et al</i> [51]	1998	Afrique du sud	Laboratoire d'anatomopathologie Embaumeurs	Badges colorimétriques	P, 32	3 – 9,6 ppm 1,87 – 4 ppm
Shaham <i>et al</i> [52]	1997	Israël	Laboratoire d'anatomopathologie et salle d'anatomie	ns	P, ns	Moy: 2,8 – 3,2 ppm
Orsière <i>et al</i> [53]	2006	France	Laboratoire d'anatomopathologie et salle d'anatomie	Badge passif avec réactif + HPLC	P, ns	VLE : <0,1 – 20,1 ppm; Moy: 2 ppm VME : <0,1 – 0,7 ppm; Moy: 0,1 ppm
Orsière <i>et al</i> [54]	2006	France	Laboratoire d'anatomopathologie et salle d'anatomie	Badge passif avec réactif + HPLC	P, ns	VLE : <0,1 – 20,4 ppm; Moy: 2 ppm VME : <0,1 – 0,7 ppm; Moy: 0,1 ppm

ns: non spécifié dans l'article; P : prélèvement personnel (individuel) ; A : prélèvement d'ambiance

Tableau 6 : Liste des articles recensés dans la littérature concernant l'exposition professionnelle au formaldéhyde entre 1997 et 2007 dans des laboratoires d'Anatomie Pathologique, des salles d'anatomie ou d'embaumeurs

5.2.3.3. Relevés de concentrations maximales mesurées au Québec

Dans la fiche de prévention de l'IRSST, intitulée « exposition au formaldéhyde en milieu de travail-la pathologie » [55], les différentes sources d'exposition au formaldéhyde, ainsi que les concentrations maximales mesurées en ppm dans 10 laboratoires de pathologie du Québec sont présentées. Le formaldéhyde retrouvé dans l'air provient essentiellement de la manipulation des solutions de formol, des spécimens et des déchets. Les travailleurs présents dans cet environnement peuvent alors être exposés à des concentrations élevées lors de courtes périodes.

Sources d'exposition		Concentrations maximales mesurées (ppm)
Manipulation du formaldéhyde	Préparation des solutions	1,0 - 2,0
	Remplissage des pots	1,0 - 2,0
	Transvasement du formaldéhyde utilisé dans l'appareil de recyclage	0,3 - 0,75
	Neutralisation du formaldéhyde	Non mesurée
Manipulation des spécimens anatomiques	Mise en pots des spécimens	Non mesurée
	Manipulation pendant la macroscopie	<0,3 → 2,0
	Tâches non effectuées sous hotte (lavage des spécimens...)	0,7 → 2,0
	Insertion des cassettes dans le préparateur de tissus	1,0-2,0
	Utilisation du colorant mercurique	Non mesurée
Manipulation des déchets	Vidange des spécimens et solutions usées	0,3 → 2,0
	Manipulation des sacs de déchets médicaux	Non mesurée
	Manipulation et rinçage des pots usagés	Non mesurée
Entretien des équipements	Préparateur de tissus	1,1 → 2,0
	Appareil de recyclage	0,3 - 0,75
Sources d'émission/équipements	Préparateurs de tissus (fuites)	Non mesurée
	Appareil de recyclage (fuites)	Non mesurée
	Entreposage des spécimens	0,3 - 0,75
	Entreposage des solutions neuves et usées	Non mesurée
	Poubelle de pots vidés, gants, papiers souillés	Non mesurée
	Poubelle de déchets biomédicaux	>2,0

Tableau 7 : Sources d'exposition au formaldéhyde et concentrations maximales mesurées en ppm dans 10 laboratoires de pathologie québécois

Profession	Plage d'exposition (ppm)	
	Moyenne pondérée-8 heures	Plafond
Pathologiste	< 0,3 à 0,92	0,5 à > 2,0
Technicien	< 0,3 à 0,76	< 0,3 à > 2,0
Assistant technique	< 0,3 à 0,81	< 0,3 à > 2,0
Secrétaire	< 0,3	< 0,3

Tableau 8 : Plage de concentrations mesurées sur les travailleurs de 10 laboratoires de pathologie

5.2.3.4. Etude des niveaux d'exposition au CHU de Nancy

Deux séries de mesures ont été réalisées au Centre Hospitalier et Universitaire de Nancy en 1990 et en 2003, à partir de badges analysés par la méthode HPLC (Badges Aircheck Formaldéhyde, Surgipath, Courtaboeuf), dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de Brabois.

En 1990, les mesures avaient été effectuées au niveau du poste de recoupe : celles-ci s'élevaient jusqu'à 1,6 ppm, conforme à l'époque à la VLE en vigueur fixée à 2 ppm.

En 2003, des mesures ont été effectuées à nouveau par badges dosimètres, portés pendant 8 heures et sur 5 jours, au niveau du poste de macroscopie.

Tous les résultats se sont révélés être inférieurs à 0,13 ppm donc conformes aux normes préconisées.

5.2.4. Conséquences réglementaires liées à l'utilisation du formaldéhyde

L'utilisation du formaldéhyde en Anatomie pathologique place nos structures dans le champ d'application du décret n°2001-97 de février 2001 relatif à la prévention des risques CMR [56], du décret n°2003-1254 relatif à la prévention du risque chimique [57], de l'article R 231-56 du code du travail et de la circulaire DRT 12 du 24 mai 2006 relative aux règles générales de prévention du risque chimique et aux règles particulières à prendre contre les risques d'exposition aux agents CMR [58].

La réglementation impose donc :

- ✓ Une substitution du formaldéhyde , si la mesure est techniquement possible.

- ✓ Des mesures techniques de réduction du risque chimique à mettre en œuvre, si l'utilisation du formaldéhyde doit être maintenue. Les solutions sont alors classées par ordre d'efficacité décroissante :
 - Travail en vase clos ou système clos
 - Autres mesures de protection collective : sorbonnes, captage à la source, mécanisation de certaines opérations.
- ✓ Utilisation d'équipements de protection individuelle indispensable, mais qui ne doit en aucun cas se substituer aux équipements de protection collective.

Doivent également être associés des contrôles des ambiances de travail par dosage aériens, une surveillance spécifique du personnel exposé par le service de médecine du travail et une formation adaptée pour l'ensemble du personnel.

Les affections provoquées par le formaldéhyde et ses polymères sont prises en charge au titre du tableau 43 des maladies professionnelles du régime général de la Sécurité Sociale et au titre du tableau 28 du Régime Agricole (tableau 9).

Désignation des maladies	Délai de prise en charge	Liste limitative des travaux susceptibles de provoquer ces maladies
Ulcérations cutanées.	7 jours	Préparation, emploi et manipulation de l'aldéhyde formique, de ses solutions (formol) et de ses polymères, notamment : - Fabrication de substances chimiques à partir de l'aldéhyde formique ; - Fabrication de matières plastiques à base de formol ; - Travaux de collage exécutés avec des matières plastiques renfermant un excès de formol ; - Opérations de désinfection ; - Apprêtage des peaux ou des tissus.
Lésions eczématiformes récidivant en cas de nouvelle exposition au risque ou confirmées par un test épicutané.	15 jours	
Rhinite récidivant en cas de nouvelle exposition au risque ou confirmée par un test.	7 jours	
Asthme objectivé par explorations fonctionnelles respiratoires récidivant en cas de nouvelle exposition au risque ou confirmé par test.	7 jours	

Tableau 9 : Tableau n°43 des maladies professionnelles du régime général : affections provoquées par l'aldéhyde formique et ses polymères

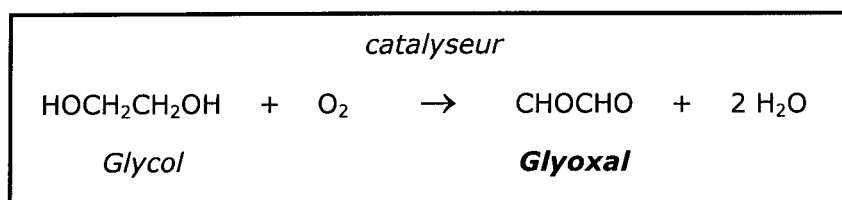
Deuxième partie : le glyoxal

1. Historique

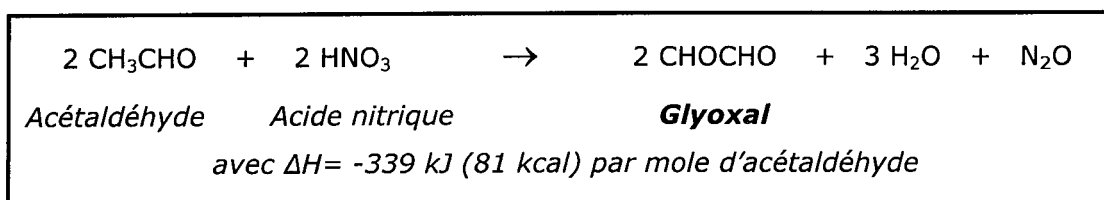
Le glyoxal ou éthanedial est le plus simple des dialdéhydes aliphatiques. Il a été obtenu pour la première fois en 1856 par oxydation nitrique de l'éthanol et a fait l'objet de nombreux travaux mais son utilisation n'a connu un développement appréciable en chimie organique industrielle qu'à partir de 1940.

2. Fabrication industrielle

Le glyoxal peut être fabriqué à partir du glycol par oxydation à l'air en phase gazeuse avec des rendements de 70 à 80%. La réaction est conduite à 300°C sur des catalyseurs à l'argent ou au cuivre.



Cependant, le principal procédé de fabrication consiste à faire réagir l'acide nitrique sur l'acétaldéhyde en solution aqueuse sous pression et à température modérée, par voie directe ou avec des catalyseurs, avec un rendement maximal de 70%. Il en résulte une oxydation de l'acétaldéhyde en glyoxal, très exothermique, selon l'équation globale principale :



L'acétaldéhyde et le glyoxal étant des espèces oxydables, la réaction principale est accompagnée de nombreuses réactions secondaires conduisant à la formation de sous-produits, tels que les acides formique, acétique, glyoxylique et oxalique et même le dioxyde de carbone.

La solution aqueuse de glyoxal est purifiée sur résine échangeuse d'ions. Le glyoxal pur étant très instable, il est utilisé soit en solutions aqueuses à 30-40%, soit sous forme d'hydrate solide contenant 80% de glyoxal.

La production annuelle mondiale de glyoxal est estimée entre 120 000 et 170 000 tonnes. Les principaux producteurs sont la France, les Etats-Unis, l'Allemagne et le Japon.

3. Propriétés physico-chimiques

3.1. Propriétés physiques

Dans l'industrie, le glyoxal est essentiellement produit et utilisé sous forme de solutions aqueuses, le plus souvent à 40% en poids. Ces solutions, incolores ou jaunes pâle, d'odeur aigre légère, ont un caractère acide avec un pH égal à 2 environ [59].

Ses principales caractéristiques physiques sont résumées dans le tableau 10, en comparaison avec celles du formaldéhyde.

Le glyoxal est parfois commercialisé sous forme de cristaux de dihydrate très hygroscopiques, solubles dans l'eau.

La forme anhydre, quant à elle, n'est pas utilisée dans l'industrie.

	GLYOXAL	FORMALDEHYDE
Formule	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{O} \\ & \diagdown & / \\ & \text{C} - \text{C} & \\ & / & \diagdown \\ \text{O} & & \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ > \\ \text{H} \end{array} \text{C} = \text{O}$
Synonymes	Ethanedial, Ethane-1,2-dione, Oxalaldéhyde, Biformal	Méthanal, oxométhane, aldéhyde formique, formol, formaline
Masse Molaire	58,04 (forme anhydre)	30,03
Point de fusion	-14°C	-92°C; -118°C
Point d'ébullition	104°C	-20 à -19°C
Densité (g/cm³)	1,27	0,816
Densité de vapeur (air = 1)	2 (forme anhydre)	1,04-1,06
Tension de vapeur	2,4 kPa à 20°C	517-519 kPa à 25°C
Point d'éclair	Sup 100°C	85°C
Température d'auto inflammation	285°C	424°C

Tableau 10 : Principales propriétés physiques du glyoxal en comparaison avec celles du formaldéhyde.

3.2. Propriétés chimiques

Le glyoxal est un composé très réactif, qui peut réagir violemment avec les oxydants, les acides et les bases fortes.

En solution aqueuse, le glyoxal hydraté forme divers oligomères dont l'équilibre dépend du pH, de la température et de la concentration. Les solutions aqueuses, dans des conditions normales d'emploi, sont stables.

4. Utilisations

Le glyoxal présente quatre grandes fonctions déterminant ses différentes utilisations :

- ✓ Comme agent de réticulation dans l'industrie du papier, des peintures, des colles et adhésifs.
- ✓ Comme intermédiaire de synthèse pour la fabrication de produits pharmaceutiques, de parfums, pour l'industrie textile et divers produits chimiques.
- ✓ Comme biocide dans les produits désinfectants (stérilisation du matériel médical, traitement des locaux et matériels d'élevage en milieu agricole)
- ✓ Comme désodorisant dans l'industrie pétrolière et du gaz.

Selon l'inventaire des agents chimiques CMR (Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques) réalisé en 2005 par l'INRS, la consommation annuelle de glyoxal en France est estimée à 31 000 tonnes. 6 000 salariés sont potentiellement exposés, notamment dans le secteur des produits agrochimiques. Il apparaît en cours de substitution, notamment dans le secteur de la fabrication des savons, détergents et produits d'entretien [3].

5. Métabolisme du glyoxal

Le métabolisme cellulaire normal entraîne la production de glyoxal endogène par toutes sortes de voies enzymo-dépendantes. Le glyoxal endogène résulte également de la métabolisation et de l'oxydation microsomique d'autres molécules comme le glycolaldéhyde, l'éthylène-glycol et les β -hydroxy-*N*-nitrosamines. La concentration du glyoxal dans le plasma humain serait de 0,1 à 1 $\mu\text{mol/L}$, des concentrations plus élevées étant observées chez les diabétiques et les insuffisants rénaux. Dans les produits biologiques, moins de 10% du glyoxal présent se trouve en solution aqueuse sous forme non liée

(glyoxal libre et hydrates), car la majorité des groupements carbonyles réactifs sont réversiblement liés aux résidus cystéinyle, lysyle et argininyle des protéines.

En effet, *in vivo*, le glyoxal, produit d'oxydation du glucose qui attaque les groupements amine des protéines, des nucléotides et des lipides, est considéré comme un important intermédiaire dans la formation des produits de la glycation avancée (AGE). La glycation avancée altère la fonction des protéines et inactive des enzymes, avec pour conséquence des troubles du métabolisme cellulaire et de la synthèse protéique. De telles réactions, connues aussi sous le nom de réaction de Maillard, sont accélérées au cours du diabète et l'augmentation des modifications des protéines par le glucose ou ses dérivés est impliquée dans le développement des complications au cours de cette maladie [60]. Les effets délétères du glyoxal sont combattus par un système enzymatique ubiquiste, celui de la glyoxalase glutathion (GSH)-dépendante qui transforme le glyoxal en glycolate moins réactif.

6. Risques et Toxicité

6.1. Risques

A l'état solide, le glyoxal est difficilement inflammable. Toutefois, sous forme de vapeurs ou de poussières, il peut former des mélanges explosifs avec l'air.

Les solutions aqueuses de glyoxal ne sont pas inflammables (point d'éclair supérieur à 100°C).

6.2. Toxicité expérimentale

L'ensemble des données présentées ici sur la toxicité expérimentale provient du 'Concise International Chemical Assessment Document (CICAD 57) sur le glyoxal, préparé par l'Institut Fraunhofer de toxicologie et médecine expérimentale de Hanovre (Allemagne) [61].

La toxicité aiguë du glyoxal pour les animaux de laboratoire est faible à modérée selon la concentration effective du composé dans le produit étudié. Après exposition par la voie respiratoire, l'effet prédominant est une irritation des yeux et des voies aériennes, accompagnée d'une hyperémie et d'une sécrétion spumeuse au niveau pulmonaire. Une exposition par voie orale détermine des effets macroscopiques tels qu'une irritation et une congestion des voies digestives, la congestion s'étendant également aux poumons, aux reins et aux surrénales. Dans les principaux organes cibles, à savoir, le pancréas et

le rein, l'action toxique du glyoxal conduit à de graves lésions dégénératives évoquant celles que provoque le diabète. L'expérimentation animale montre que des solutions à 30 et 40% de glyoxal provoquent une irritation cutanée légère à marquée, selon la durée de contact. Le glyoxal est irritant pour les muqueuses et il se comporte comme un sensibilisant cutané chez l'homme et les animaux de laboratoire.

Des effets fœtotoxiques n'ont été observés qu'à des doses qui étaient elles-mêmes toxiques pour la mère. *In vitro*, le glyoxal présente une génotoxicité directe pour les cellules bactériennes et provoque notamment la formation d'adduits avec l'ADN, des mutations, des aberrations chromosomiques, une réparation de l'ADN, des échanges entre chromatides sœurs et des ruptures monocaténares de l'ADN. *In vivo*, l'activité génotoxique du glyoxal a été mise en évidence au niveau de son point d'application sur la muqueuse pylorique du rat, par l'observation d'une synthèse non programmée et de ruptures monocaténares de l'ADN. Après administration de glyoxal à des rats par voie orale, la rupture des brins de l'ADN a été observée dans les hépatocytes. Il n'y a pas eu d'étude de cancérogénicité *in vivo* chez des animaux exposés au glyoxal par la voie respiratoire. Sur un modèle de cancérogénèse gastrique chez le rat en deux étapes, il a été constaté que le glyoxal se comportait comme un promoteur tumoral. En revanche, une étude destinée à mettre en évidence l'activité tumoro-promotrice du glyoxal par des tests de transformation cutanée et cellulaire, a donné des résultats négatifs.

6.3. Toxicité sur l'homme

6.3.1. Toxicité aiguë

Le glyoxal en solutions concentrées est fortement irritant pour la peau et les muqueuses. Ses éventuels effets systémiques sont inconnus.

6.3.2. Toxicité chronique

Le contact cutané répété peut entraîner une sensibilisation. Quelques cas d'eczéma de contact d'origine professionnelle ont été rapportés. Cet eczéma ne présente aucune particularité clinique et guérit facilement avec un traitement adapté et l'éviction du produit allergisant. Après la recherche d'une exposition à cette substance, le diagnostic peut être étayé par des tests cutanés [62].

Aucune donnée concernant l'apparition de rhinite ou d'asthme au décours d'exposition au glyoxal n'a été retrouvée dans la littérature.

A noter que peu de publications concernant la toxicité humaine du glyoxal existent.

Les principales voies d'exposition professionnelle au glyoxal lors de son utilisation comme désinfectant consistent dans l'inhalation d'aérosols ou dans l'absorption transcutanée du produit. Ainsi, comme les autres aldéhydes, formaldéhyde et glutaraldéhyde essentiellement, le glyoxal est connu pour donner notamment des dermatoses professionnelles (irritation, ulcérations, urticaire et eczéma), reconnues comme maladies professionnelles indemnisables en France (tableau n°84 des maladies professionnelles du régime général : affections engendrées par les solvants organiques liquides à usage professionnel dont les aldéhydes).

L'exposition de la population dans son ensemble est principalement due à la consommation de denrées alimentaires contenant du glyoxal, mais elle peut également résulter d'une forte pollution atmosphérique ou de la présence de traces de glyoxal dans l'eau de boisson.

7. Valeurs limites d'exposition professionnelle

La valeur limite indicative de moyenne d'exposition pondérée (8h/jour, 40h/semaine) établie pour le glyoxal aux Etats-Unis est de 0,1 mg/m³ [63]. Il n'est pas déterminé de valeur limite d'exposition au glyoxal en Europe.

Malgré une valeur limite d'exposition inférieure à celle du formol, cette dernière étant de 0,37 mg/m³, le glyoxal devrait être, à concentration aqueuse égale, beaucoup moins toxique car beaucoup moins volatile (tableau 11).

Produit	GLYOXAL	FORMOL
VLEP (USA)	0,1 mg/m ³	0,37 mg/m ³
Tension de vapeur	2,4 kPa à 20°C	517 kPa à 20°C

Tableau 11 : Comparaison des VLEP et des tensions de vapeur du glyoxal et du formol

8. Intérêt du glyoxal en Anatomie Pathologique

Le glyoxal est le principe actif le plus populaire des fixateurs sans formaldéhyde en Amérique du Nord. Il a été testé comme fixateur depuis les années 1960 au moins [64], (Sabatini 1963, Pearse 1968). Il s'est révélé bon dans l'histochimie enzymatique mais un médiocre fixateur histologique dans les formulations employées. Le premier fixateur commercialisé, non pontant et contenant du glyoxal comme unique principe actif, est

apparu en 1993 (Prefer, Anatech Ltd, Battle Creek, MI), suivis dans les années suivantes de plusieurs autres produits de composition similaire (Glyo-Fix, Thermo Electron, Pittsburgh, PA ; GTF, Statlab Medical Products, Lewisville, TX ;...) [65].

Pour les industriels, les fixateurs à base de glyoxal auraient les avantages suivants par rapport au formol : un profil sécuritaire meilleur, un réactivité chimique plus rapide et une tendance moindre à ponter les macromolécules dans certaines conditions, permettant une meilleure conservation de l'immunoréactivité et par conséquent une diminution du besoin de restauration antigénique [66].

Troisième partie : Matériels et méthodes

1. Les fixateurs testés

Pour notre travail, les fixateurs suivants ont été utilisés :

1.1. Le formol à 10% (v/v) pH 7,4

Le formaldéhyde est utilisé sous la forme d'une solution de Formol tamponné à 10% (v/v) dans un tampon phosphate 40 mmol/L, pH 7,2-7,4, commercialisée par LABONORD S.A. (Templemars, France). La concentration en formaldéhyde de cette solution est de 4% (m/v). Le fixateur contient également du méthanol. La solution est conservée à température ambiante.

1.2. Le glyoxal

Le glyoxal est testé sous la forme de solutions préparées au laboratoire ou d'une solution commerciale : le Glyo-FixxTM (Thermo Shandon), dont la composition exacte n'est pas divulguée.

1.2.1. Solutions préparées au laboratoire

Les solutions suivantes sont testées :

- 1) glyoxal à 4% (v/v) pH 4 (Glyoxal 40%, réf 50649, FLUKA)
- 2) glyoxal à 10% (v/v) pH 4
- 3) glyoxal à 4% (v/v) pH 4 additionné de 5% (v/v), 10% (v/v) ou 20% (v/v) d'éthanol absolu.
- 4) glyoxal à 4% (v/v) pH 7 additionné de 10% (v/v) d'éthanol absolu.

Les solutions fixatrices sont conservées à température ambiante.

1.2.2. Glyo-fixxTM

Le principal agent actif de ce fixateur est le glyoxal. Ce dernier représente moins de 5% en masse de la solution. Le Glyo-FixxTM renferme par ailleurs de l'éthanol (10-20% en poids), du méthanol (< 2% en poids) et de l'isopropanol (< 2% en poids). La solution, utilisée pure, est conservée à température ambiante.

1.3. Le glutaraldéhyde

Ce fixateur est utilisé pour les techniques ultrastructurales et pour l'étude de la fixation de la gélatine en solution. Il est préparé par dilution d'une solution mère de glutaraldéhyde purifié à 25% (m/v) (Réf UN2810, VWR) dans un tampon cacodylate de sodium HCl 0,1M pH 7,2. Le fixateur est conservé à 4°C.

1.4. Autres fixateurs

Pour l'étude comparative des mécanismes et de la cinétique de fixation d'une solution de gélatine, sont également utilisés un fixateur à base de sel de zinc (0,1M Tris HCl pH 7,4 ; 3,2 mM $(CH_3COO)_2Ca$; 22,8mM $(CH_3COO)_2Zn$; 36,7 mM $ZnCl_2$) et de l'éthanol absolu.

2. Fixation de gélatine en solution

Dans un tube à essais, à 9 mL d'une solution de gélatine à 5% (m/v) dans l'eau distillée sont ajoutés 5 mL d'un des fixateurs précités. La manœuvre est répétée pour chacun des fixateurs à trois reprises.

La fixation se traduit par la formation soit d'un gel coloré ou non, soit d'un précipité, dont le délai d'apparition est très variable d'un fixateur à un autre. Les tubes sont donc conservés pendant plusieurs semaines.

3. Recherche d'une auto-fluorescence des coupes déparaffinées

Des coupes tissulaires issues de prélèvements fixés au formol, au glutaraldéhyde et au Glyo-fixx™ et inclus en paraffine, sont étalées sur lames de verre et séchées à l'air. Elles sont ensuite déparaffinées puis recouvertes d'une lamelle montée à l'Eukitt®. Les lames sont alors observées sur un microscope à fluorescence, avec des filtres d'émission et d'excitation correspondants à la fluorescéine et à Texas red.

4. Fixation de pièces opératoires ou de biopsies

La nature et les dimensions des échantillons utilisés varient en fonction des caractéristiques de la fixation étudiées.

4.1. Etude de la diffusion

Les paramètres physiques importants à étudier sont la diffusion des agents fixateurs dans les tissus, la rétraction et les durcissements des tissus.

Cette étude est réalisée sur des échantillons de foie. L'homogénéité de cet organe facilite, en effet, l'observation de la pénétration du fixateur qui se traduit par le développement d'une teinte grisâtre dans les territoires fixés tranchant bien avec la rougeur du parenchyme encore non pénétré par le fixateur. Par ailleurs, de par sa structure, le foie permet d'examiner une éventuelle diffusion facilitée par l'intermédiaire de canaux (voies biliaires ou vaisseaux).

Une méthode macroscopique et une méthode microscopique ont été utilisées pour apprécier ces différents paramètres.

4.1.1. Etude macroscopique

Cette première méthode a concrètement été réalisée sur quatre prélèvements de foie non cirrhotique et non tumoral, issus de pièces opératoires parvenues à l'état frais au laboratoire.

A chaque fois, deux échantillons de taille similaire, comportant en partie la capsule de Glisson en périphérie, sont immergés dans le formol et le Glyo-Fixx™. Les mesures de chacun des prélèvements dans les trois dimensions, avant fixation et après 24h de fixation, ainsi que celle du liseré correspondant à la zone de décoloration périphérique sont réalisées. La consistance de l'échantillon après les 24h de fixation est également appréciée.

4.1.2. Etude microscopique

Cette méthode consiste à détecter la présence de groupements aldéhydiques libres. Les groupements aldéhydiques libres correspondent au fixateur n'ayant pas réagi. L'étude est réalisée à partir de prélèvements de foie non cirrhotique et non tumoral, de taille égale à environ 1 cm, fixés pendant 16h respectivement dans le formaldéhyde et dans le glyoxal 4%.

Deux techniques différentes sont réalisées : l'une correspond à une réaction argentique, permettant d'apprécier la diffusion ; l'autre est réalisée à l'aide du réactif de Schiff, pour rechercher la présence de groupements aldéhydiques résiduels après les étapes de déshydratation et d'inclusion en paraffine, ces derniers pouvant engendrer des interférences dans les techniques complémentaires, notamment immunohistochimiques.

Pour la réaction argentique, les prélèvements, après leur fixation, sont congelés par immersion dans de l'azote liquide. Plusieurs coupes épaisses de 6 μm sont réalisées à l'aide d'un cryostat puis déposées sur des lames de verre et séchées à l'air. Les préparations sont alors incubées à 56°C dans une solution de Jones pendant 2 heures, puis rincées à l'eau. Une solution de chlorure d'or est déposée pendant 5 minutes. Après rinçage à l'eau, c'est une solution d'hyposulfite de sodium pendant 5 minutes, qui est déposée (Annexe 2). Après rinçage à l'eau, les coupes sont déshydratées et les lames sont montées à l'Eukitt®.

La recherche de groupements aldéhydiques résiduels par la technique de Schiff est réalisée à partir des mêmes prélèvements fixés puis inclus en paraffine. Elle consiste à immerger les lames où sont déposées les coupes tissulaires déparaffinées dans le réactif de Schiff pendant 3 heures, puis dans une solution de métabisulfite de sodium pendant 5 minutes et enfin dans l'eau courante 15 minutes (Annexe 2). Les coupes sont ensuite déshydratées et montées à l'Eukitt®.

4.2. Histologie traditionnelle et histochimie

La qualité micro anatomique des préparations histologiques obtenues après coloration à l'hématoxyline éosine safran d'échantillons de rein, intestin grêle et foie, fixés avec les différentes solutions de glyoxal préparées au laboratoire, étant apparue la meilleure avec le glyoxal 4% éthanol 10% (v/v) pH4, la suite de l'étude comparative a porté sur des échantillons fixés avec ce fixateur, le Glyo-fixx™ et le formol.

Ces études sont réalisées à l'aide d'échantillons (cœur, colon, estomac, foie, ganglion, grêle, pancréas, peau, poumon, prostate, rate, rein, sein, thyroïde, utérus, vessie) de petite taille (1 x 1 X 0,5 cm) prélevés sur des pièces opératoires parvenues au laboratoire à l'état frais. La fixation est réalisée par immersion, le volume du fixateur étant au minimum 10 fois celui de chaque échantillon. La durée de la fixation est de 72 heures. Cette dernière est réalisée à température ambiante.

4.2.1. Appréciation de la qualité micro-anatomique des préparations après coloration de routine

Dans un premier temps, la qualité micro anatomique des préparations histologiques est appréciée sur des coupes colorées à l'hématoxyline éosine safran (protocoles techniques en Annexes 3 et 4). L'étude comparative est réalisée par cinq observateurs qui, pour chaque préparation histologique, ne connaissent pas le fixateur utilisé. Six paramètres sont principalement étudiés : il s'agit de la morphologie générale (homogénéité d'épaisseur de la coupe, déchirure de cette dernière, etc), de l'aspect général de la coloration (homogénéité, contraste), de la précision des contours cellulaires, des détails cytoplasmiques (rétraction ou gonflement des cellules), des détails nucléaires (rétraction ou gonflement des noyaux, contours nucléaires, aspect de la chromatine) et de l'aspect morphologique des lymphocytes. Une attention particulière est portée à la préservation des hématies et à la visibilité de structures cationiques (grains des éosinophiles et des cellules de Paneth) ou basophiles (grains des mastocytes). Concrètement, chaque observateur a attribué un score histologique global à chaque préparation tissulaire, ainsi qu'un score à chacun des paramètres morphologiques prédéfinis.

Ce score correspond à une échelle de 1 à 5 :

- ✓ 1 : *mauvais*
- ✓ 2 : *moyen*
- ✓ 3 : *bon*
- ✓ 4 : *très bon*
- ✓ 5 : *excellent*

Pour la mise en évidence des éléments cellulaires, tels que les hématies, les polynucléaires neutrophiles, les mastocytes ou autres selon les organes étudiés (cellules de Paneth,...), le score de 1 à 4 appliqué était le suivant :

- ✓ 1 : absence (lyse)
- ✓ 2 : mal visible
- ✓ 3 : visible
- ✓ 4 : bien visible

Les trois coupes réalisées par organe, correspondant aux trois fixateurs testés, sont placées sur une même lame, côte à côte et numérotées de 1 à 3, de façon différente et aléatoire d'une lame à une autre.

Les résultats sont collectés et une étude statistique est réalisée sous la direction de Madame le Professeur Albuisson.

4.2.2. Colorations histochimiques spéciales

Ces colorations ne sont réalisées que sur les coupes des organes où leur mise en œuvre présente un intérêt (tableau 12). La qualité des colorations obtenues (respect de la morphologie, homogénéité et contraste de la coloration, réussite de la recherche du constituant recherché) est également appréciée indépendamment par différents observateurs.

Les protocoles des diverses colorations étudiées sont décrits en annexes (Annexe 4).

Colorations /organes	cœur	colon	grêle	estomac	foie	ganglion	rate	thyroïde	Utérus	sein	rein	prostate	poumon	peau
HES	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Bleu de toluidine	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Rouge sirius		✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Gordon					✓	✓		✓						
Bleu alcian	✓	✓		✓					✓	✓		✓		
Fontana		✓												
Trichrome de Masson											✓		✓	
Giemsa						✓								
Weigert														✓
PAS		✓	✓	✓					✓		✓			
Jones											✓			
Perls					✓		✓							

Tableau 12 : Les différentes colorations histochimiques réalisées en fonction des tissus prélevés

4.2.3. Evaluation des effets du pH sur la micro-anatomie

Les solutions testées dans notre travail (glyoxal 4% éthanol 10% et Glyo-fixx™) sont caractérisées par un pH acide (pH4). Afin d'évaluer les effets du pH, la micro-anatomie obtenue avec les solutions fixatrices acides est comparée à celle résultant d'une fixation dans des solutions de glyoxal 4% éthanol 10% tamponnées avec un pH final de 7. Cette étude est réalisée sur plusieurs échantillons (prostate, rein, foie et colon).

4.2.4. Evaluation des effets d'une fixation à long terme sur la micro-anatomie

Cinq prélèvements ont fait l'objet d'une conservation de quatre semaines dans les fixateurs testés avant inclusion en paraffine. Les résultats sur le plan histologique et cytologique en coloration HES sont appréciés par deux observateurs en comparaison avec les coupes initiales réalisées après une fixation de 72h.

5. Immunohistochimie

5.1. Les antigènes étudiés

Dix huit anticorps primaires, choisis parmi, pour la plupart, les plus utilisés en pratique diagnostique sont testés. Le choix s'est porté sur des anticorps complémentaires d'antigènes de localisation variable dans la cellule (nucléaire, cytosolique, au sein d'un organelle ou situé au niveau de la membrane plasmique) ou appartenant à la matrice extracellulaire. Certains anticorps sont, de plus, connus comme donnant des signaux faibles sur coupes de tissus fixés au formol.

L'ensemble de ces anticorps ainsi que leurs principales caractéristiques techniques sont présentés dans le tableau 13.

Anticorps primaires		Clone	Mono/Poly Clonal	Référence	Dilution habituelle	Pré-traitement habituel	Tissus
Marqueurs nucléaires	TTF1	8G7G3/1	M	Dako	1/1600	EDTA pH8	poumon, thyroïde
	RE	1D5	M	Dako	1/35	Citrate pH6	sein
	RP	PgR636	M	Dako	1/70	Citrate pH6	sein
	Ki67	MIB1	M	Dako	1/400	EDTA pH8	grêle, ganglion
	P63	4A4	M	Dako	1/600	EDTA pH8	prostate
	Bcl2	Bcl2/100/D5	M	Novocastra	1/200	EDTA pH8	ganglion, rate
	Bcl6	BL6-02	M	Néomarkers	1/20	pH9,9	ganglion
Marqueurs cytoplasmiques	Hépatocyte	OCH1E5	M	Dako	1/60	EDTA pH8	foie
	KL1	KL1	M	Immunotech	1/1000	EDTA pH8	grêle
	Ker HMW	34E12	M	Dako	1/80	EDTA pH8	prostate
	PSA	ER-PR8	M	Dako	1/60	EDTA pH8	prostate
	CGA	LK2H10+PE5	M	Néomarkers	1/400	-	grêle
	TG	-	P	Dako	1/4000	-	thyroïde
	NF	2F11	M	Dako	1/150	EDTA pH8	grêle
	NSE	BBS/NC/IV-H14	M	Dako	1/2000	EDTA pH8	grêle
	CD3	F7.2.38	M	Dako	1/160	EDTA pH8	ganglion, rate
Marqueurs membranaires	CD20	L26	M	Dako	1/3000	EDTA pH8	ganglion, rate
Matrice extra-cellulaire	Collagène IV	CIV22	M	Dako	1/80	EDTA pH8 + collagénase	Grêle, prostate

TTF1: Thyroid transcription factor 1

RE/RP : Récepteurs aux oestrogènes/ à la
progestérone

PSA: antigène spécifique de la prostate

Ker HMW: Kératine de haut poids moléculaire

CGA: chromogranine A

TG: thyroglobuline

NF : Neurofilament

NSE : Neuron Specific Enolase

Tableau 13 : Anticorps testés avec leurs principales caractéristiques

5.2. Les différents pré-traitements testés

En l'absence de pré-traitement des coupes en paraffine de tissus fixés au formaldéhyde avant l'incubation avec l'anticorps primaire, la plupart des antigènes ne sont pas détectés. Diverses méthodes sont donc employées pour améliorer la détection des réactions immunohistochimiques. Pour chaque anticorps, les différents pré-traitements testés dans cette étude sont présentés dans le tableau 14. De façon systématique, une technique sans pré-traitement est réalisée.

5.2.1. Pré-traitement par la chaleur humide dans un autoclave

Les coupes tissulaires sont montées à l'eau sur des lames silanisées, séchées et déparaffinées selon les techniques habituelles. Elles sont ensuite placées sur un porte-lames métallique. Ce porte-lames est immergé dans le tampon choisi en fonction de l'anticorps et placé ainsi dans un autoclave (Autoclave 2100 Retriever, Proteogenics, Strasbourg, France).

Les différents tampons de pré-traitement utilisés dans cette étude (formules décrites en Annexe 5) sont :

- ✓ Tampon EDTA 10mM pH 8
- ✓ Tampon Citrate 8mM pH 6
- ✓ Tampon pH 9,9 (DAKO)
- ✓ Tampon Tris HCl 0,01M pH 8,5 $\pm$ 0,2 : ce pré-traitement correspond à celui conseillé par Dapson pour les tissus fixés à partir de glyoxal [66].

Dans l'autoclave, la température est portée à 121°C, suivi d'un refroidissement progressif de 3 heures. Le porte-lames est alors sorti de l'autoclave et les lames sont immergées deux minutes dans un bain d'eau distillée.

Les coupes sont alors cerclées à l'aide d'un crayon hydrophobe avant d'être immergées dans un tampon PBS-tween au minimum 15 minutes.

5.2.2. Pré-traitement par la chaleur humide en autocuiseur dans un tampon Tris Citrate 2mM pH 9

Cette technique est celle appliquée pour la détection des récepteurs hormonaux. Les coupes sont montées sur des lames silanisées et immergées dans un tampon Tris citrate 2mM à pH 9, préalablement porté à ébullition (Annexe 5). L'autocuiseur est alors fermé et le temps d'action est de 7 minutes, décomptées à partir du moment où la vapeur s'échappe de la soupape. La vapeur s'évacue ensuite et, après ouverture, les lames sont plongées dans de l'eau distillée, à température ambiante. Ensuite, les coupes sont délimitées à l'aide d'un crayon hydrophobe.

5.2.3. Pré-traitement par la chaleur humide en autoclave et par digestion enzymatique à la collagénase

Pour la mise en évidence du collagène IV, le pré-traitement habituel associe un pré-traitement par la chaleur humide dans un tampon EDTA 10mM pH 8 suivi d'un pré-traitement par digestion enzymatique à la collagénase IV. Lors de cette étape, les coupes sont immergées 20 minutes dans une solution de collagénase IV (17,8 UI/mL) dans un tampon CaCl_2 (40mM) à 37°C.

Les lames sont ensuite rincées à l'eau et les coupes sont cerclées à l'aide d'un crayon hydrophobe, avant immersion dans un tampon PBS-Tween 15 minutes au minimum.

Anticorps / Pré-traitements		absence	Auto cuiser	Autoclave				Autoclave + traitement enzymatique	
			Tris Citrate pH 9	EDTA pH 8	Tris HCl pH 8,5	Citrate pH 6	pH9,9	EDTA pH 8 + Collagénase	Tris HCl pH 8,5 + Collagénase
Marqueurs nucléaires	TTF1	♦		♦	♦	♦	♦		
	RE	♦	♦						
	RP	♦	♦						
	Ki67	♦		♦	♦				
	P63	♦		♦	♦				
	PSA	♦		♦	♦				
	Bcl2	♦		♦	♦				
	Bcl6	♦		♦	♦				
Marqueurs cytoplasmiques	Hépatocyte	♦		♦	♦				
	KL1	♦		♦	♦				
	Ker HMW	♦		♦	♦				
	CGA	♦			♦				
	TG	♦			♦				
	NF	♦		♦	♦				
	NSE	♦		♦	♦				
	CD3	♦		♦	♦				
Marqueurs membranaires	CD20	♦		♦	♦				
Matrice extra cellulaire	Collagène IV	♦			♦			♦	♦

Tableau 14 : Les différents pré-traitements testés en fonction des anticorps

5.3. Etapes suivantes de la technique immunohistochimique après pré-traitement

Deux techniques différentes sont utilisées. La première fait appel au couple anticorps secondaire biotinylé/streptavidine peroxydase. La seconde correspond à une technique dans laquelle l'anticorps primaire est détecté à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à des micro-polymères de peroxydase (Novolink™ Polymer, Novocastra). Cette technique permet d'éviter l'utilisation du système streptavidine/biotine, source de bruit de fond notamment dans les coupes de tissus riches en mitochondries (foie, rein, glandes sébacées...) et traitées par la chaleur humide. Ce montage est utilisé dans notre travail avec l'anticorps anti hépatocyte humain (Human hepatocyte paraffin 1, Dako). Les protocoles de ces deux techniques sont présentés en annexes (Annexe 5).

5.4. Stabilité antigénique des tissus dans les blocs

Cette étude est réalisée sur les échantillons d'intestin grêle, fixés au glyoxal, à partir des blocs d'inclusion à quatre mois d'intervalle. Pour tenir compte de phénomènes d'auto-oxydation au contact de l'air, la comparaison a porté non seulement sur les premières coupes du bloc, mais également sur des coupes plus en profondeur. Les pré-traitements et les dilutions sont identiques à ceux pratiqués lors de l'étude immunohistochimique initiale. L'étude a porté sur l'expression des antigènes KL1 et Ki67.

5.5. Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats des techniques immunohistochimiques est systématiquement réalisée par deux observateurs.

A chacun des anticorps testés et pour chaque pré-traitement appliqué, les résultats sont appréciés de façon semi-quantitative et qualitative. En effet, le nombre de cellules marquées, le caractère homogène ou hétérogène du marquage ainsi que l'intensité du marquage obtenu et la présence ou non d'un bruit de fond sont recherchés.

Pourcentage de cellules marquées :

- ✓ - absence d'expression
- ✓ + expression faible (1/3 des cellules sont marquées)
- ✓ ++ expression modérée (2/3 des cellules sont marquées)
- ✓ +++ expression forte (toutes les cellules sont marquées)

Intensité du marquage :

- ✓ 1 marquage peu intense
- ✓ 2 marquage modérément intense
- ✓ 3 marquage intense

Bruit de fond (BF) :

- ✓ Pas de BF
- ✓ BF léger
- ✓ BF modéré
- ✓ BF important

6. Techniques d'hybridation in situ

Une étude de faisabilité de technique d'hybridation in situ est réalisée sur des coupes de tissus (ganglion, rein, poumon, cœur) fixés par les fixateurs précités et inclus en paraffine. La technique d'hybridation consiste à détecter l'ADN nucléaire à l'aide de sonde constituée par un ADN génomique humain total marqué à la digoxigénine.

6.1. Réalisation technique des sondes d'ADN génomique humain total

Cette technique utilise de l'ADN humain, extrait de fragments de ganglions par une méthode de type urée SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), purifié, fragmenté puis marqué à la digoxigénine par la méthode de multi amorçage au hasard (Annexe 7).

6.2. Protocole d'hybridation

Des coupes tissulaires de poumon, de rein, de cœur et de ganglion, épaisses de 5 μm , sont déparaffinées, hydratées et déprotéinisées afin de faciliter la diffusion des sondes dans les noyaux. Plusieurs méthodes de déprotéinisation existent. Nous avons opté dans notre travail pour un pré-traitement par la chaleur humide en autocuiseur dans un tampon citrate à pH 6 pendant 7 minutes, suivi d'une immersion des lames dans une solution d'HCl 0,1N pendant 20 minutes puis d'une hydrolyse par la protéinase K (40 μL dans 40 mL de tampon pK) au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes. Après passage dans l'eau distillée puis dans le TBS, les lames sont séchées. Sur chaque coupe, une

chambre d'hybridation est collée et 25 μ L de la solution d'hybridation y est déposée. Cette solution d'hybridation renferme 70 μ L de milieu d'hybridation, 4 μ L d'ADN carrier (Salmon Teste DNA, 9,7 mg/mL, Sigma), 2 μ L de la sonde d'ADN marqué et 24 μ L d'eau milliQ avec Tween à 0,1%.

Les deux étapes suivantes, correspondant à la dénaturation de l'ADN et à l'hybridation, sont réalisées dans un thermocycleur (ThermoBrite, Abbott Molecular, France). La première étape de dénaturation de l'ADN tissulaire et de la sonde marquée se produit *simultanément par chauffage* à 95°C pendant 15 minutes. L'hybridation, deuxième étape, s'effectue ensuite à 37°C pendant une nuit.

Les coupes sont ensuite lavées de façon successive dans une solution de formamide désionisé à 50% dans du SSC 2x pendant 15 minutes, dans une solution de formamide désionisé à 50% dans du SSC x1 pendant 15 minutes et enfin dans du SSC x1 pendant 5 minutes, avant un rinçage final dans du TBST pendant 5 minutes.

6.3. Révélation des hybrides

Après ces lavages, les coupes sont exposées à un rayonnement UV pendant une minute (1200 μ J), suivi d'une incubation dans une solution de caséine (Amersham, France) à 1% (m/v) dans du TBS, afin de bloquer l'accrochage non spécifique des protéines sur les coupes. Après rinçage rapide, les coupes sont incubées avec une solution d'un anticorps d'antidigoxygénine marqué à la phosphatase alcaline (Roche), diluée au 1/200^{ème} dans du tampon TBS, pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après deux lavages successifs dans du tampon TBST puis du tampon à pH 9,4, l'activité phosphatase alcaline est révélée par une solution de NBT-BCIP (Roche), à partir d'une solution stock diluée au 1/50^{ème} dans du tampon à pH 9,4.

La révélation, suivie au microscope, dure environ 30 à 45 minutes et est arrêtée par deux rinçages successifs de 5 minutes dans du tampon à pH 9,4 puis à l'eau courante. Les lames sont alors montées à l'aide d'une solution d'alcool polyvinylique (Sigma, PM 40 000) à 13% (m/v) dans un tampon Tris HCl 0,1 M, pH 8,5.

7. Les études ultrastructurales

Les études ultrastructurales sont réalisées à partir d'échantillons d'un parenchyme ganglionnaire non tumoral fixé dans du glutaraldéhyde à 2,5% (m/v), le formaldéhyde, le glyoxal à 4% et le Glyo-FixxTM (Annexe 6). Dans un second temps, une étude ultrastructurale en microscopie à transmission est effectuée sur des échantillons de ganglion fixé dans des solutions de glyoxal 4% à pH4 et à pH7 et des solutions de glyoxal

4% additionnées d'éthanol 10% à pH 4 et pH7, afin d'apprécier les effets de l'éthanol et du pH acide.

7.1. Microscopie électronique à transmission

Dans un délai le plus bref possible, des échantillons de très petite taille (environ 0,1 cm de grand axe) sont prélevés sur la pièce opératoire parvenue à l'état frais au laboratoire et fixés pendant 16 heures minimum à 4°C respectivement dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (m/v) dans un tampon de cacodylate-HCl 0,1M pH 7,2, dans du formol à 10% (v/v), dans le glyoxal à 4% pH7 et dans le Glyo-Fixx™. Dans un deuxième temps, une étude est réalisée à partir de solutions de glyoxal 4% pH4 et pH7 et de solutions de glyoxal 4%-éthanol 10% pH4 et pH7.

Les échantillons sont ensuite rincés pendant 5 minutes à 4°C dans le tampon cacodylate. La post-fixation des échantillons se fait par une incubation de 90 minutes à température ambiante dans une solution d'acide osmique à 1% (m/v) dans un tampon de cacodylate-HCl 0,1M pH 7,2, sous une hotte aspirante.

La déshydratation s'effectue à température ambiante par passages successifs dans des bains d'éthanol de degrés croissants de 5 minutes chacun (30°, 50°, 70°, 80°, 90°), puis dans un bain d'éthanol à 100° pendant une heure et dans une solution d'époxy 1-2 propane (propylène oxyde) pendant une heure.

L'imprégnation des échantillons est réalisée par passage successifs dans un mélange épon/époxy 1-2 propane (v/v) pendant une heure, puis à température ambiante dans une solution d'Epon pur pendant 2 heures minimum et la polymérisation de la résine est obtenue par une incubation à 56°C pendant 72 heures. Les prélèvements peuvent alors être inclus en gélules.

Une première étape consiste alors à réaliser, à l'aide d'un couteau de verre sur un ultramicrotome (Leica Ultracut UCT), des coupes semi-fines, épaisses de 2 µm, à raison d'une coupe par échantillon. Ces coupes, colorées à chaud (100°C) au bleu de toluidine à 1% (m/v) dans une solution de tétrahydroborate disodique décahydrate à 1% (m/v), permettent de pré-sélectionner les régions d'intérêt à analyser.

L'étape suivante consiste alors en la réalisation de coupes ultra-fines de 75 nm à l'aide d'un couteau de diamant (Drukker, Tech Inter, France) sur l'ultramicrotome Ultracut. Ces coupes ultra-fines sont déposées sur des grilles de cuivre, contrastées à l'acétate d'uranyle à saturation dans l'éthanol 50°, pendant 6 minutes, à température ambiante, dans l'obscurité, puis par la solution de Reynolds (citrate de plomb) pendant 6 minutes, à température ambiante et dans l'obscurité.

La lecture se fait enfin à l'aide d'un microscope électronique Philips CM10 (Limeil-Brevannes, France).

7.2. Microscopie électronique à balayage

Trois échantillons de ganglion de très petite taille (environ 0,1 cm de grand axe) sont prélevés sur une pièce opératoire parvenue à l'état frais au laboratoire et fixés pendant 16 heures à 4°C respectivement dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% (m/v) dans un tampon de cacodylate-HCl 0,1M pH 7,2, dans du formol à 10% (v/v), dans le glyoxal à 4% pH7 et dans le Glyo-Fixx™.

Après rinçage dans le tampon, les échantillons sont déshydratés dans des bains successifs d'alcool éthylique de degré croissant, suivi d'un dernier bain d'hexaméthylidisilozane. Les échantillons sont alors séchés pendant 30 minutes sous une hotte aspirante, puis collés sur un support et métallisés à l'or palladium (SC7640 Sputter Conter Polaron, Angleterre). L'observation est réalisée sur un microscope électronique à balayage Cambridge Stereoscan™ S240 (Boston, USA).

8. Etude moléculaire

8.1. Analyse de l'ADN par technique de Polymérisation en chaîne (PCR)

Les analyses de l'ADN sont réalisées à partir d'échantillons de tissus sains, prélevés sur des pièces opératoires parvenues à l'état frais au laboratoire. Pour chaque pièce, quatre prélèvements sont réalisés, trois fixés respectivement dans le formol, le mélange glyoxal 4%-éthanol 10% pH 4 et le Glyo-fixx™ pendant 72 heures et un congelé. Après extraction, il est vérifié que la qualité de l'ADN obtenu permet une amplification par PCR.

8.1.1. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir d'un kit d'extraction *MagneSil KF, Genomic System – Promega sur KingFisher mL*.

Le méthode repose sur la capacité de la silice à fixer l'ADN en présence de sels chaotropiques. Comme la silice est déposée sur des billes paramagnétiques, les complexes sont aisément séparés en passant l'échantillon dans un champ magnétique.

Les complexes sont ensuite lavés puis l'ADN est relargué dans de l'eau distillée. Le protocole est valable pour des tissus congelés ou fixés. Les différentes étapes techniques de cette extraction d'ADN sont présentées en annexes (Annexe 7).

8.1.2. Dosage de l'ADN des échantillons

Une fois les échantillons récupérés, l'ADN peut être dosé par mesure de l'absorbance de la solution dans l'UV à 260 nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre Beckman DU640B, France).

Le rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm permet d'apprécier la pureté de l'ADN. Un rapport inférieur à 1,80 témoigne de la présence de protéines.

La concentration d'ADN de l'échantillon est estimée à partir de la densité optique mesurée à 260 nm, en utilisant la relation suivante : 1 unité de densité optique égale 50 µg/mL d'ADN.

8.1.3. Protocole de vérification de la qualité de l'ADN

Deux PCR sont réalisées, générant des produits d'amplification de segments de gènes codant les immunoglobulines :

- une PCR avec les amorces AF4/X3U et AF4/X3L à 5 pmol/µL, générant le produit PCR de 600 pb,
- l'autre avec un mix des 4 autres couples d'amorces à 2,5 pmol/µL, permettant d'obtenir des produits PCR de 100, 200, 300 et 400 pb.

Les différentes amorces utilisées sont présentées dans la figure 2 [67].

Le volume réactionnel est de 50 µL :

- ✓ ADN : 100 ng
- ✓ amorces : 2,5 pmol de chaque, sauf le couple AF4/X3U : 5 pmol
- ✓ dNTP : 200 µM en concentration finale
- ✓ MgCl₂ : 2 mM
- ✓ Tampon 10x : 1/10^{ème} du volume réactionnel total
- ✓ Taq polymérase GOLD (Applied Biosystems) : 1U

Le protocole d'amplification est le suivant :

- ✓ Dénaturation à 95°C pendant 7 min

- ✓ 35 cycles comprenant : dénaturation à 90-95°C pendant 45 secondes, hybridation à 60°C pendant 1 minute et élongation à 72°C pendant 90 secondes.
- ✓ Elongation finale à 72°C pendant 10 minutes
- ✓ Puis conservation à 15°C

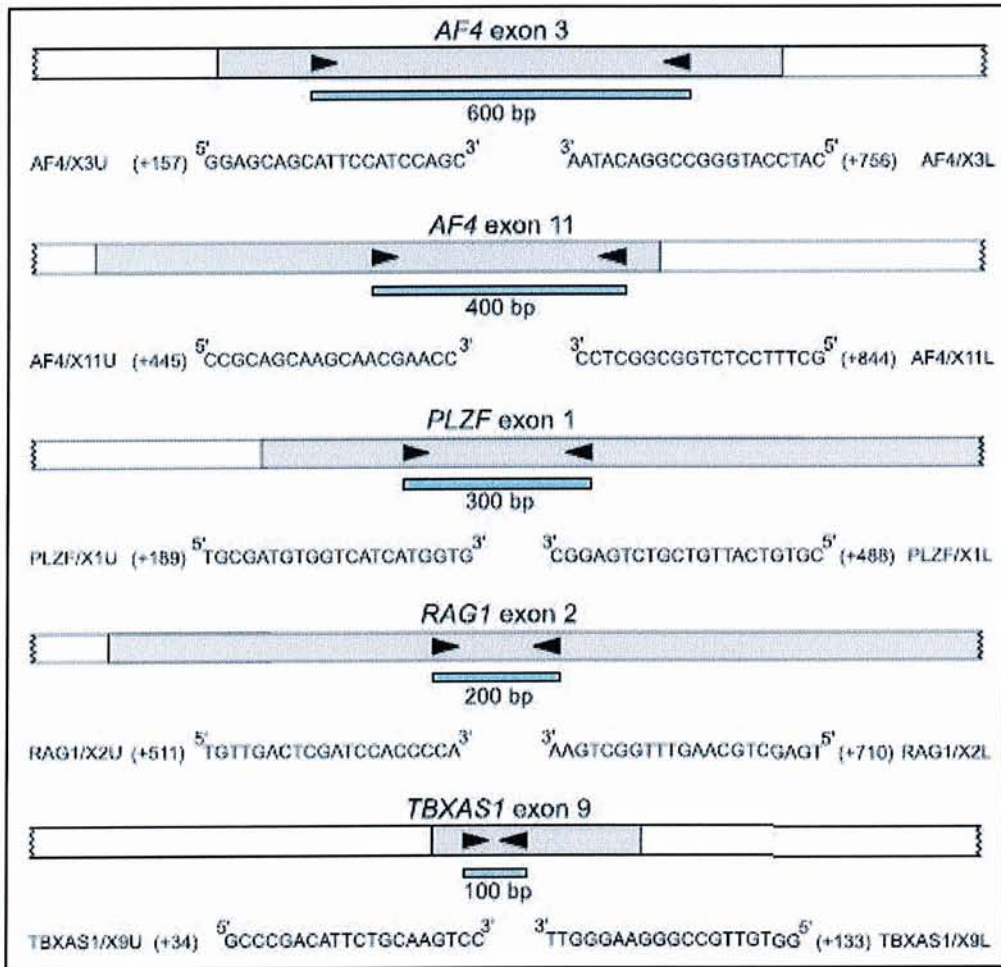


Figure 2 : Amorces utilisées dans le protocole de vérification de la qualité de l'ADN extrait par PCR BIOMED-2

L'analyse électrophorétique des produits d'amplification se fait sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide (29/1) à 6% dans 0,5x de TBE (Annexe 7). La migration s'effectue à 110 volts pendant 2 heures à 2 heures 30. Les produits d'amplification sont ensuite observés sous ultraviolets après coloration de l'ADN par du bromure d'éthidium.

8.2. Analyse de l'ARN

L'analyse de la qualité de l'ARN issu de tissus fixés par le formol, le mélange glyoxal 4%-éthanol 10% pH 4 et le Glyo-fixx™ est réalisée en comparaison avec de l'ARN issu de tissu congelé. Les prélèvements analysés parviennent, comme pour l'étude de l'ADN et l'hybridation *in situ*, de parenchymes ganglionnaire, pulmonaire, rénal et cardiaque.

8.2.1. Extraction de l'ARN

L'extraction est réalisée à l'aide d'une solution de Trizol (INVITROGEN life Technology, Référence 15596-026) en plusieurs étapes (Annexe 7).

8.2.2. Dosage de l'ARN des échantillons

Une fois les échantillons récupérés, l'ARN peut être dosé par mesure de l'absorbance de la solution dans l'UV à 260 nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre Beckman DU640B, France).

Le rapport des densités optiques à 260 nm et 280 nm permet d'apprécier la pureté de l'ARN. Un rapport inférieur à 1,80 témoigne de la présence de protéines.

La concentration d'ARN de l'échantillon est estimée à partir de la densité optique mesurée à 260 nm, en utilisant la relation suivante : 1 unité de densité optique égale 40 µg/mL d'ARN.

Les échantillons sont conservés à 4°C pour une utilisation immédiate de l'ARN ou congelés à -80°C pour une utilisation différée.

8.2.3. Analyse de l'ARN par utilisation des puces AGILENT RNA 6000 NANO série II

La technologie Agilent permet de déterminer précisément la qualité et la quantité d'ARN à partir de faibles quantités d'échantillons (1µL) et en un temps très court. Cette technique remplace les deux manipulations traditionnellement effectuées, qui étaient la mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm pour avoir une idée de la pureté de l'échantillon et l'électrophorèse sur gel d'agarose en condition dénaturante suivie de révélation au BET pour mettre en évidence une éventuelle dégradation des acides nucléiques.

Le principe repose sur la technologie « lab-on-a-chip » ou laboratoire sur puce. Cette puce est composée de puits, qui comportent des micro-réseaux. Douze puits sont destinés aux échantillons et un au marqueur de Poids Moléculaire (PM).

On dépose d'abord un gel filtré, mélangé à un colorant intercalant de l'ARN spécifique et fluorescent (Dye). Celui-ci est réparti de façon équitable dans chaque puits et remplit les microréseaux. Un tampon est alors ajouté dans chaque puits, afin de placer ensuite les échantillons et le marqueur de PM, dans un milieu stable, à un pH donné. La puce est vortexée afin d'homogénéiser le tampon et les échantillons, puis placée dans l'appareil BIOANALYSEUR 2100 Agilent. Les puits sont analysés un par un, en commençant par le marqueur de PM, qui sert d'étalon aux niveaux qualitatif et quantitatif. Une électrode est en contact avec chaque puits. Pendant l'analyse, l'électrode est soumise à un voltage élevé, qui permet une séparation très rapide des brins d'ARN de l'échantillon en fonction de leur taille. Au moment de leur passage dans le gel, au sein des micro-réseaux, les molécules d'ARN se lient spécifiquement au colorant. En fin de course (fin de colonne, fin du micro-réseau), les molécules sont détectées en fluorescence : les molécules sont excitées par un rayonnement UV et seuls les ARNs, liés au colorant, vont ré-émettre un rayonnement fluorescent.

L'appareil mesure, en temps réel, l'intensité de la fluorescence émise en fonction du temps de rétention de l'échantillon au sein du micro-réseau. Ainsi, plus les ARNs sont courts, plus ils migrent rapidement et donc plus leur temps de rétention est faible. Plus l'intensité de fluorescence est importante, plus la quantité d'ARN est importante. Ces données qualitatives (temps de rétention) et quantitatives (intensité de fluorescence) sont validées par rapport au marqueur de PM, qui est connu très précisément par le logiciel.

L'ensemble de la procédure technique ainsi que les éléments de l'analyse qualité sont présentés en annexes (Annexe 7).

Quatrième partie : Résultats

1. Paramètres physiques de la fixation

La fixation est constituée de deux étapes plus ou moins concomitantes, à savoir 1) la diffusion des différents constituants du liquide fixateur dans l'échantillon et 2) l'interaction des divers composants de la solution avec les macromolécules tissulaires. Les territoires fixés sont grisâtres, plus fermes que ceux non infiltrés par le fixateur. L'échantillon peut subir une rétraction.

1.1. Correspondance entre remaniements macroscopiques et espace de diffusion des fixateurs

Dans un premier temps, nous avons recherché l'existence d'un synchronisme entre diffusion et modifications macromoléculaires. En d'autres termes, les espaces de diffusion des fixateurs correspondent-ils aux territoires ayant subi des modifications tinctoriales ? Dans le cas des fixateurs aldéhydiques, les groupements réactionnels n'ayant pas réagi peuvent être mis en évidence par leur capacité à précipiter l'ion argent d'une solution de nitrate d'argent ammoniacale (formation d'un miroir d'argent). L'argent réduit apparaît alors sous la forme d'un précipité noirâtre sur les coupes d'échantillons fixés puis congelés, séchés et immergés dans une solution argentique. Dans notre travail, cette recherche est réalisée sur des échantillons de foie fixés au formol à 10% (v/v) pH 7,4 ou dans le Glyo-fixxTM pendant 24 heures. Un fragment de foie congelé non fixé sert de témoin. L'incubation des coupes de foie congelé sans fixation préalable ne donne lieu à aucune coloration. Dans le cas des fragments hépatiques fixés puis congelés, et ceci quelque soit le fixateur utilisé, une bonne correspondance est observée entre les territoires grisâtres au plan macroscopique et les espaces de diffusion des fixateurs appréciés par la technique du miroir d'argent. Ceci vaut non seulement pour le liseré grisâtre aisément reconnaissable à la périphérie des échantillons, mais également pour des plages irrégulières jaune-grisâtres de petite taille, situées dans la partie centrale des échantillons, dont il était difficile de préciser la nature par l'examen macroscopique (territoires fixés versus plages de stéatose).

1.2. Comparaison des espaces de diffusion : étape macroscopique. Variation de consistance

Les épaisseurs maximales et minimales des liserés de fixation présents à la périphérie d'échantillons fixés 24 heures au formol à 10% (v/v) pH 7,4 ou dans le Glyo-fixxTM sont

rapportées dans le tableau 15. En dépit du caractère un peu rudimentaire de la méthode de mesure, il apparaît clairement que le formol diffuse dans les tissus beaucoup plus rapidement que le Glyo-fixx™. Il n'est pas rare avec ce dernier que la profondeur de diffusion ne dépasse pas 1 mm. Cette dernière peut même ne pas être appréciable macroscopiquement. Parallèlement, la consistance des tissus fixés au formol augmente toujours, alors qu'il n'en est rien avec le Glyo-fixx™. Enfin, quelque soit le fixateur, la capsule de Glisson ne constitue pas un frein à la diffusion, puisque l'épaisseur du liseré périphérique est identique que cette dernière soit présente ou non.

Prélèvements hépatiques		Avant fixation	Après 24h de fixation	Liseré périphérique
Cas n°1	Formol	4,5 x 4 x 1,5 cm	4,4 x 3,6 x 1,5 cm	5 à 13 mm
	Glyo-Fixx™	5 x 4 x 1,5 cm	4,5 x 3,6 x 1,5 cm	2 mm
Cas n°2	Formol	6 x 5 x 1,5 cm	5,5 x 4,9 x 1,4 cm	6 mm
	Glyo-Fixx™	6 x 5,5 x 1,7 cm	5,7 x 5,5 x 1,6 cm	absent
Cas n°3	Formol	6 x 6 x 1,8 cm	5,7 x 5,5 x 1,8 cm	2 à 6 mm
	Glyo-Fixx™	6 x 6 x 1,5 cm	5,8 x 5,5 x 1,5 cm	1 à 2 mm
Cas n°4	Formol	6 x 5,5 x 1,5 cm	5,5 x 5,1 x 1,4 cm	2 à 6 mm
	Glyo-Fixx™	6 x 5,5 x 1,5 cm	5,5 x 5 x 1,4 cm	1 à 2 mm

Tableau 15 : Tailles des prélèvements de parenchyme hépatique avant fixation et après 24h de fixation et mesures du liseré périphérique en fonction du fixateur utilisé (Formol versus Glyo-fixx™)

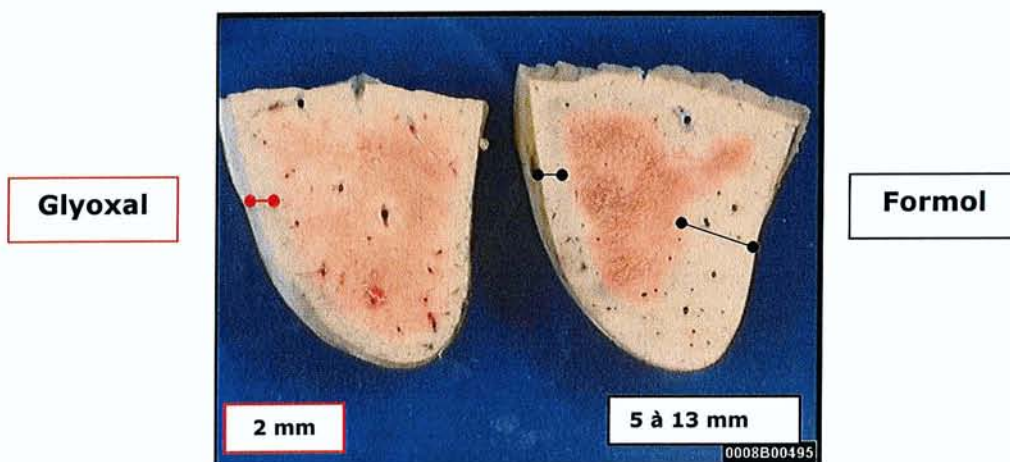


Figure 3 : Aspect macroscopique des tranches de section du parenchyme hépatique (cas n°1)

1.3. Comparaison microscopique de la distribution des groupements aldéhydiques libres

Ces derniers correspondent d'une part aux molécules ayant diffusé mais pas réagi, d'autre part à celles de glyoxal dont un seul des deux groupements réactionnels a réagi. La distribution des précipités d'argent avec les deux fixateurs n'est pas identique (figure 4). La différence porte bien entendu sur la profondeur de diffusion, toujours beaucoup plus importante avec le formol mais également : 1) sur la pente du gradient de concentration des groupements aldéhydiques toujours plus abrupte dans le cas du glyoxal, 2) sur l'existence d'un précipité soulignant les fibres grillagées du foie visible uniquement en cas de fixation au glyoxal, 3) sur les colorations nucléaires toujours beaucoup plus intenses avec le formol et celles des cytoplasmes avec le glyoxal. Dans les deux cas, la réticuline des espaces porto biliaires est clairement marquée ceci même en profondeur de l'échantillon témoignant ainsi de la diffusion des fixateurs par voie canalaire.

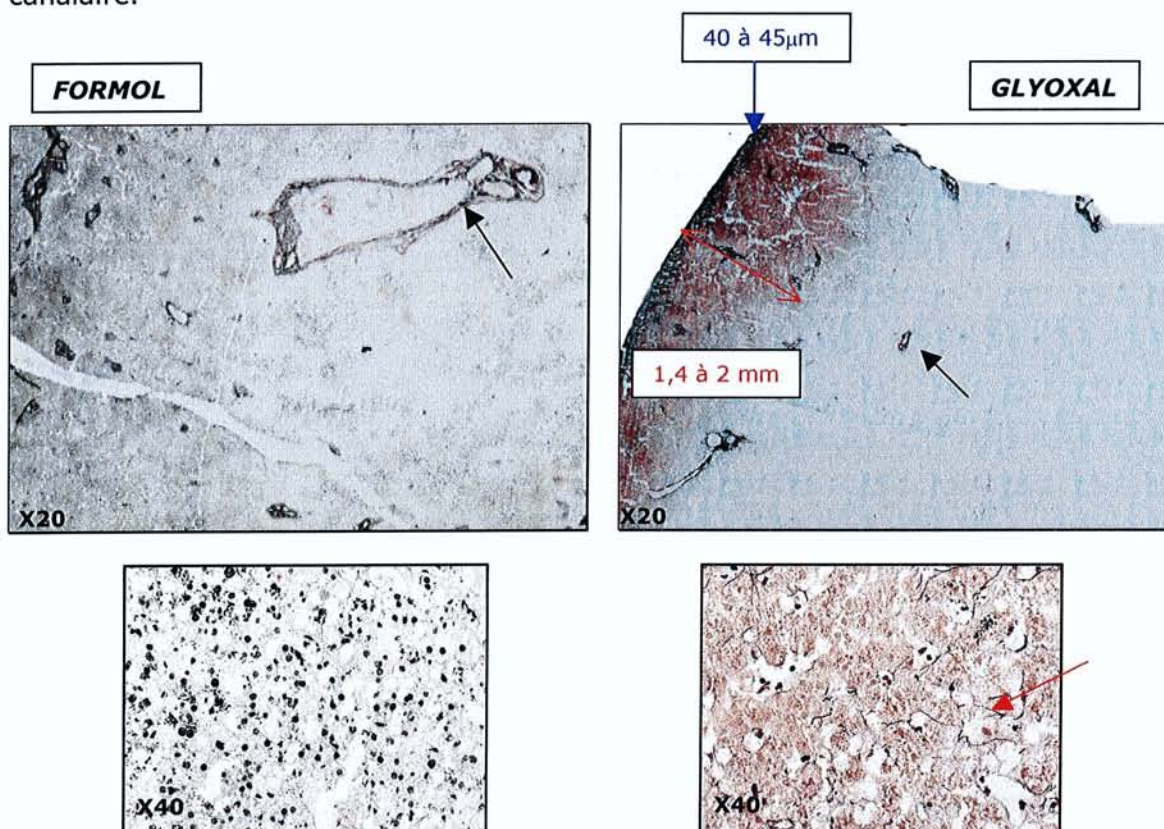


Figure 4 : Argentation : formol/glyoxal

⇒ Formol : importante diffusion en profondeur (x20), coloration nucléaire intense (x40).

⇒ Glyoxal : gradient de concentration important : marquage intense en surface sur 40-45 μm, modéré sur 1,4 à 2 mm puis quasiment absent plus en profondeur (x20), coloration des cytoplasmes et des fibres grillagées du foie (flèche rouge) (x40).

⇒ Pour les deux fixateurs : coloration de la réticuline des espaces porto-biliaires (flèches noires), témoignant de la diffusion par voie canalaire (x20).

Le réactif de Schiff permet de mettre en évidence la présence de groupements aldéhydiques résiduels après les étapes de déshydratation et d'inclusion au niveau des prélèvements fixés à l'aide de glyoxal.

1.4. Rétraction tissulaire

Les mesures effectuées dans les trois dimensions, avant fixation et après 24 heures de fixation, à quatre reprises, suggèrent que la fixation s'accompagne d'une rétraction tissulaire. Cette dernière peut être estimée à 2-10% des dimensions de départ. Les mesures effectuées sont en nombre insuffisant pour que des variations de rétraction avec les fixateurs puissent être appréciées.

2. Etude de la fixation d'une solution de gélatine

Le mécanisme de fixation (réticulation versus coagulation), la cinétique de réaction et son éventuelle réversibilité spontanée sont étudiées à l'aide d'une solution modèle de gélatine. Dans ce système, des différences majeures sont observées (figure 5). L'éthanol donne naissance à un coagulât blanchâtre qui précipite et dont la formation est immédiate. Le glutaraldéhyde induit dans les cinq minutes la formation d'un gel homogène brunâtre et stable. Avec le formaldéhyde et les sels de zinc, le gel obtenu est homogène, blanchâtre et translucide. La cinétique de fixation est beaucoup plus longue avec les sels de zinc (12h) qu'avec le formol (2h30). Enfin la solution de gélatine ne précipite, ni ne gélifie avec le glyoxal à 4% ou à 10% pH 7,4 ou le Glyo-fixx™. Elle devient cependant progressivement brunâtre et faiblement visqueuse. Quant à la réversibilité de la réaction, seul le précipité obtenu avec l'éthanol se dissout spontanément et complètement après 5 minutes.

3. Recherche d'une auto-fluorescence des coupes tissulaires déparaffinées

L'intensité de l'auto-fluorescence des coupes de tissus fixés et inclus dans de la paraffine, observées au microscope à fluorescence sous les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la fluorescéine, varie avec le fixateur. Elle est intense avec le glutaraldéhyde, intermédiaire avec le Glyo-fixx™ et faible avec le formol. L'intensité de l'auto-fluorescence avec les deux premiers fixateurs est telle que les techniques d'immunofluorescence ne peuvent être envisagées (figure 6).

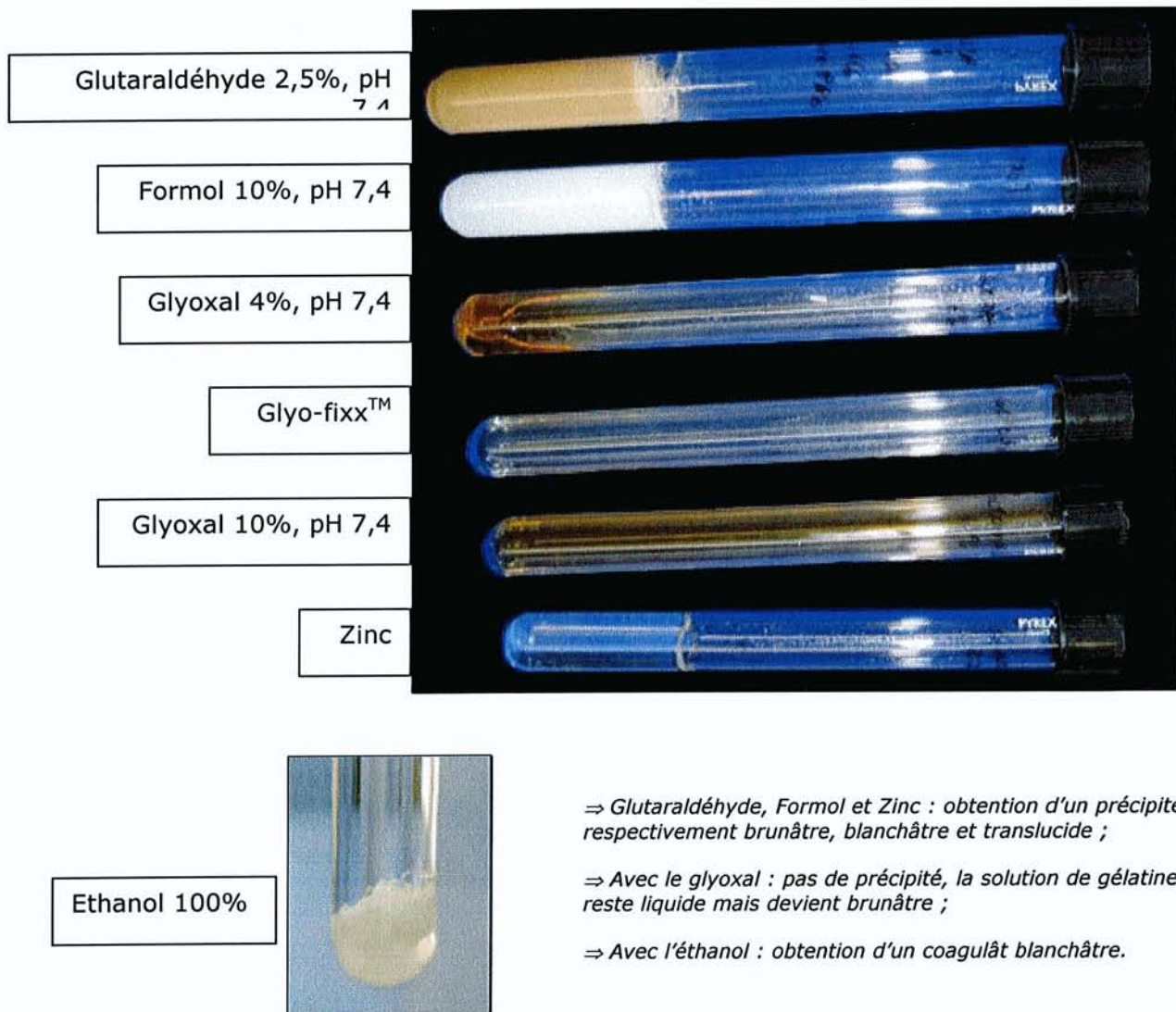


Figure 5 : Fixation d'une solution de gélatine en tubes à essai

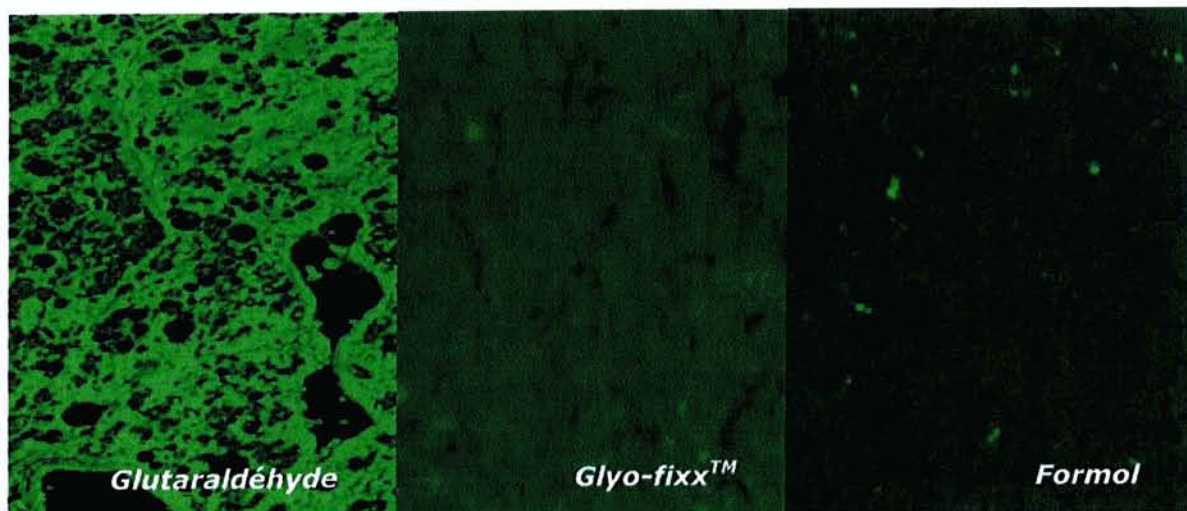


Figure 6 : Auto-fluorescence des coupes déparaffinées d'échantillons tissulaires fixés dans différents fixateurs

4. Etude morphologique

4.1. Coloration Hématoxyline-éosine-safran (HES)

4.1.1. Choix de la solution de glyoxal-éthanol

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer si les résultats morphologiques les meilleurs étaient donnés par une solution de glyoxal pur ou par des solutions composées à base de glyoxal et d'éthanol.

Une première étude a donc consisté à comparer la qualité micro-anatomique de prélèvements de foie, rein et intestin grêle, fixés dans des solutions de glyoxal 4% pH 4 ou pH 7, de glyoxal à 4% (v/v) pH 4 ou pH 7 additionné de 5% (v/v), 10% (v/v) ou 20% (v/v) d'éthanol absolu. Quatre observateurs ont apprécié les préparations tissulaires sur les critères définis antérieurement, à savoir morphologie générale, coloration, contours cellulaires, détails nucléaires et cytoplasmiques. De façon unanime, bien qu'avec de discrètes variations en fonction du pourcentage d'éthanol absolu, les coupes issues des prélèvements fixés au glyoxal à 4% (v/v) additionné de 10% d'éthanol (v/v) sont considérées comme de meilleure qualité par rapport aux autres solutions.

Ainsi, l'ensemble des études morphologique, immunohistochimique et moléculaire a été réalisé sur des prélèvements fixés dans une solution de glyoxal à 4% (v/v) pH 4 avec 10% (v/v) d'éthanol.

4.1.2. Résultats de l'étude morphologique sur les colorations HES

Après regroupement de l'ensemble des scores attribués à chaque paramètre sur chaque coupe tissulaire par les cinq observateurs, une étude statistique est réalisée.

La concordance des résultats entre les différents lecteurs a tout d'abord été vérifiée. Le test non paramétrique Kappa (K) de Cohen permet de chiffrer l'accord entre deux observateurs ou techniques lorsque les jugements sont qualitatifs. L'accord observé entre des jugements résulte de la somme d'une composante «aléatoire» et d'une composante d'accord «véritable». Le coefficient Kappa propose de chiffrer l'intensité ou la qualité de l'accord réel entre des jugements qualitatifs appariés. Il exprime une différence relative entre la proportion d'accord observée P_o et la proportion d'accord aléatoire P_e qui est la

valeur espérée sous l'hypothèse nulle d'indépendance des jugements, divisée par la quantité disponible au-delà de l'accord aléatoire. Le coefficient Kappa est un nombre réel, sans dimension, compris entre -1 et 1. L'accord est d'autant plus élevé que la valeur de Kappa est proche de 1 et l'accord maximal est atteint ($K = 1$) lorsque $P_o = 1$ et $P_e = 0,5$. Lorsqu'il y a indépendance des jugements, le coefficient Kappa est égal à zéro ($P_o = P_e$), et dans le cas d'un désaccord total entre les juges, le coefficient Kappa prend la valeur -1 (tableau 16).

Accord	Kappa
Excellent	$\geq 0,81$
Bon	0,80 - 0,61
Modéré	0,60 - 0,41
Médiocre	0,40 - 0,21
Mauvais	0,20 - 0,0
Très mauvais	$< 0,0$

Tableau 16 : Degré d'accord et valeur de Kappa

Le test de Cohen ne s'appliquant que pour des études de concordance entre deux juges, nous avons utilisé un programme disponible sur Internet, qui accepte toutes les études de concordance entre deux ou plusieurs juges (de 2 à 25 juges), ayant de 2 à 25 modalités de jugement et un nombre de sujets au plus égal à 5500. Il s'agit du Kappa multi juges de Fleiss (P. Bonnardel [68]).

Plusieurs calculs ont été effectués entre 2 juges par le programme « Fleiss.exe » et en parallèle par le test de Cohen. Les kappas obtenus étant voisins (tableau 17), nous autorisons à utiliser le test de Fleiss pour les études de concordance multi juges.

Les résultats (Kappa, Standard error et p-value) de ces études sont présentés dans le tableau 18.

Etude de concordance	test	kappa	Standard error	p-value
Lecteur 1 versus lecteur 5	FLEISS	0,185	0,028	$< 1^{E-09}$
	COHEN	0,226	0,028	0,000
Lecteur 3 versus lecteur 5	FLEISS	0,147	0,027	$2,12^{E-09}$
	COHEN	0,186	0,028	0,000
Lecteur 1 versus lecteur 2	FLEISS	0,345	0,028	$< 1^{E-09}$
	COHEN	0,351	0,032	0,000

Tableau 17 : Comparaison des tests de Fleiss et de Cohen

Etude de concordance		kappa	Standard error	p-value
Tous résultats		0,224	0,009	$<1^{E-09}$
Formol		0,038	2,041	0,0206
Glyo-fixx		0,205	0,015	$<1^{E-09}$
Glyoxal éthanol		0,211	0,015	$<1^{E-09}$
Hématies et PNE		0,386	0,021	$<1^{E-09}$
Score global		0,135	0,028	$5,69^{E-07}$
Score global, formol		-0,001	0,056	0,494
Score global, glyo-fixx		0,052	0,052	0,159
Score global, glyoxal		0,085	0,051	0,0487
Noyaux		0,045	0,029	0,0572
Lymphocytes		-0,014	0,031	0,32
Morphologie		0,147	0,029	$1,58^{E-07}$
Coloration		0,107	0,028	$5,27^{E-05}$
Contours cellulaires		0,119	0,027	$4,84^{E-06}$
Cytoplasme		0,168	0,026	$<1^{E-09}$
par organe	cœur	0,144	0,038	$7,63^{E-05}$
	colon	0,191	0,040	$7,05^{E-07}$
	estomac	0,339	0,036	$<1^{E-09}$
	foie	0,150	0,027	$8,68^{E-09}$
	ganglion	0,342	0,037	$<1^{E-09}$
	grele	0,106	0,037	0,00208
	pancreas	0,272	0,040	$<1^{E-09}$
	peau	0,227	0,040	$6,7^{E-09}$
	poumon	0,174	0,027	$<1^{E-09}$
	prostate	0,222	0,039	$7,5^{E-09}$
	rate	0,271	0,026	$<1^{E-09}$
	rein	0,23	0,036	$<1^{E-09}$
	sein	0,191	0,042	$2,18^{E-06}$
	thyroïde	0,240	0,041	$1,96^{E-09}$
	uterus	0,031	0,039	0,212
	vessie	0,173	0,039	$5,07^{E-06}$

Non significatif

Concordances
les meilleures**Kappa / Accord**

$\geq 0,81$ Excellent
 0,80 - 0,61 Bon
 0,60 - 0,41 Modéré
 0,40 - 0,21 Médiocre
 0,20 - 0,0 Mauvais
 $< 0,0$ Très mauvais

Tableau 18 : Etude de concordance entre lecteurs : kappa multi juges de Fleiss

Au niveau de cinq items, les résultats du test de Fleiss ne sont pas significatifs (score global formol, score global Glyo-fixxTM, noyaux, lymphocytes, utérus).

En revanche, pour tous les autres paramètres testés, une concordance, bien qu'hétérogène et faible, est mise en évidence entre les 5 lecteurs. Les concordances les plus élevées sont observées pour les hématies et les polynucléaires éosinophiles, pour le ganglion et l'estomac.

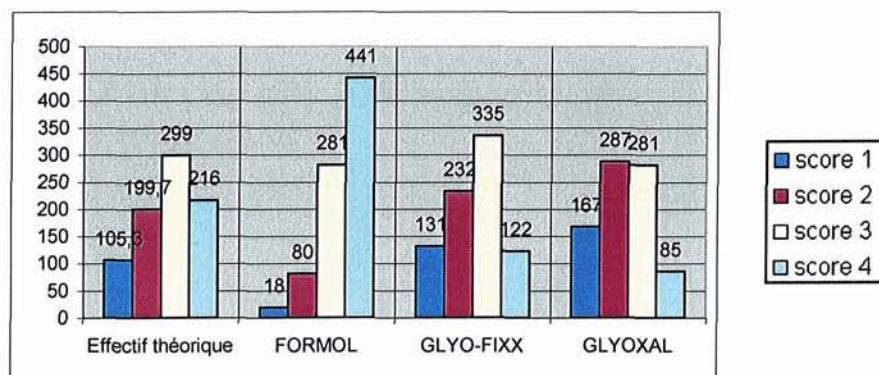
Par conséquent, l'absence de discordance (pas de kappa $< 0,0$), autorise à considérer l'ensemble des lecteurs dans la suite de l'étude statistique.

Ainsi, en premier lieu, les scores sont appréciés de façon globale, c'est-à-dire tous organes et tous paramètres confondus, pour le formol, le Glyo-fixxTM et la solution glyoxal 4%-éthanol 10% pH4 (glyoxal), avec réalisation d'un test de Khi-deux, tous lecteurs confondus puis par lecteur. En raison du faible nombre de score 5 attribué par les différents lecteurs, il a été décidé de fusionner les catégories des scores 4 et 5. Pour rappel, les scores sont définis ainsi : 1 mauvais ; 2 moyen ; 3 bon ; 4 très bon et excellent.

Dans un second temps, les tests sont réalisés pour chacun des fixateurs, pour les différents paramètres, notamment les paramètres 'noyaux', 'lymphocytes', 'hématies' et 'polynucléaires éosinophiles' et pour tous les organes.

✓ **Comparaison de chaque fixateur, tous lecteurs, tous organes et tous paramètres confondus :**

▪ ***Entre les trois fixateurs***



Khi-deux de Pearson = 591,2 ; signification : 0,000

Le formol obtient tous organes et tous paramètres confondus des résultats statistiquement meilleurs que ceux du Glyo-fixxTM et du glyoxal, avec un Khi-deux très significatif. Comme l'indique le tableau 19, les contributions au Khi-deux proviennent essentiellement des scores 1, 2 et 4 du formol (de 12% à 40%) et en partie du score 4 du glyoxal (14%). Elles représentent l'importance des écarts entre les effectifs observés et les effectifs théoriques (résidus). Ces résidus sont en effet chiffrés à -87,30 pour le score 1, -119,70 pour le score 2, +225 pour les scores 4 et 5 du formol et à -131 pour le score 4 du glyoxal.

A**Résidu = effectif observé (o_k) – effectif théorique (e_k)**

FIXATEURS	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
GLYOXAL	61,70	87,30	-18	-131
GLYO-FIXX	25,70	32,30	36	-94
FORMOL	-87,30	-119,70	-18	225

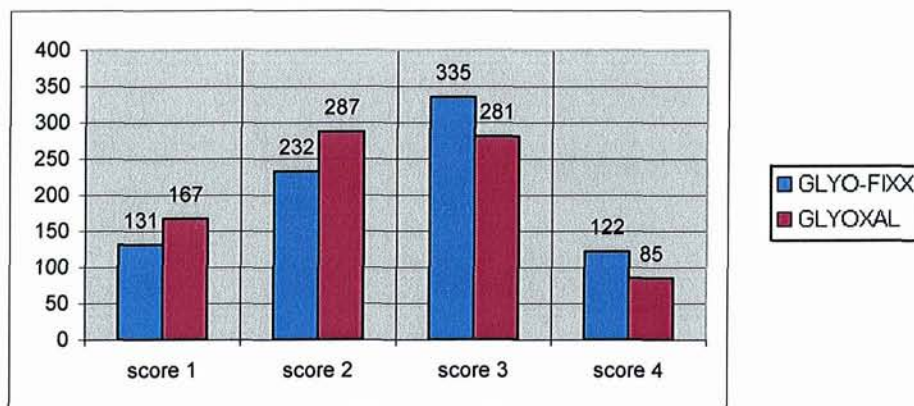
B

$$ctr_k = \frac{\frac{(o_k - e_k)^2}{e_k}}{\chi^2}$$

FIXATEURS	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
GLYOXAL	6,1%	6,5%	0,2%	13,5%
GLYO-FIXX	1,1%	0,9%	0,7%	6,9%
FORMOL	12,2%	12,1%	0,2%	39,6%

Tableau 19 : Tableaux récapitulatifs des résidus (A) et des contributions au Khi-deux en % (B)

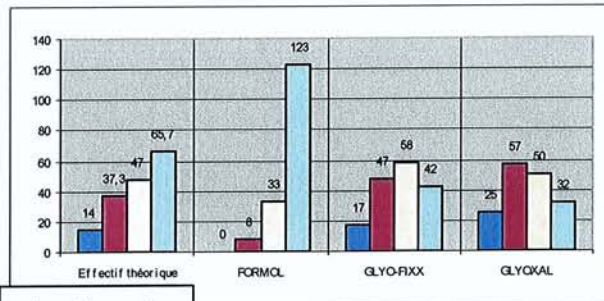
▪ **Entre le Glyo-fixxTM et le glyoxal**



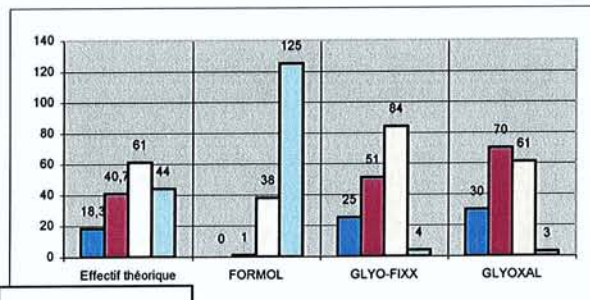
Khi-deux de Pearson = 21,525 ; signification : 0,000

La comparaison entre Glyo-fixxTM et glyoxal, tous organes et paramètres confondus, montre également une différence significative entre ces deux fixateurs, avec supériorité du Glyo-fixxTM. Celui-ci obtient en effet plus de scores 3 et 4 et à l'inverse moins de scores 1 et 2, comparativement au glyoxal.

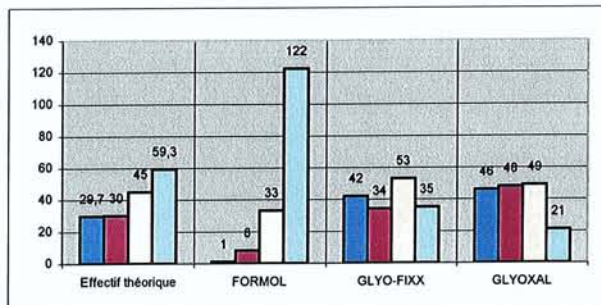
✓ **Comparaison de chaque fixateur PAR LECTEUR, tous organes et tous paramètres confondus :**


Lecteur 1

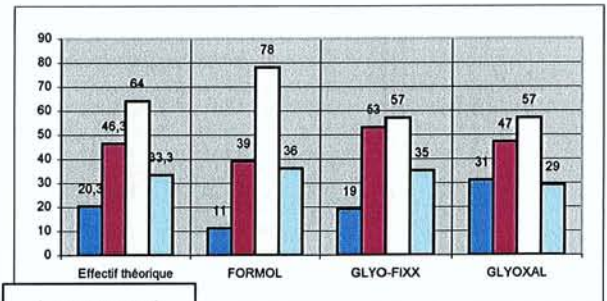
Khi-deux : 141,980 ; signif : ,000


Lecteur 2

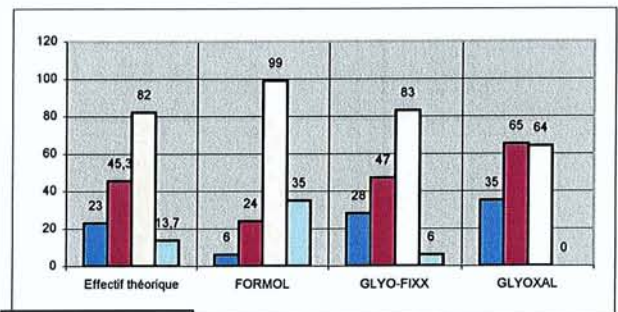
Khi-deux : 331,683 ; signif : ,000


Lecteur 3

Khi-deux : 175,197 ; signif : ,000


Lecteur 4

Khi-deux : 17,550 ; signif : ,007


Lecteur 5

Khi-deux : 97,301 ; signif : ,000

■ score 1 ■ score 2 □ score 3 □ score 4

Il existe des différences significatives entre les trois fixateurs, ces différences étant retrouvées de façon plus ou moins marquées en fonction des lecteurs :

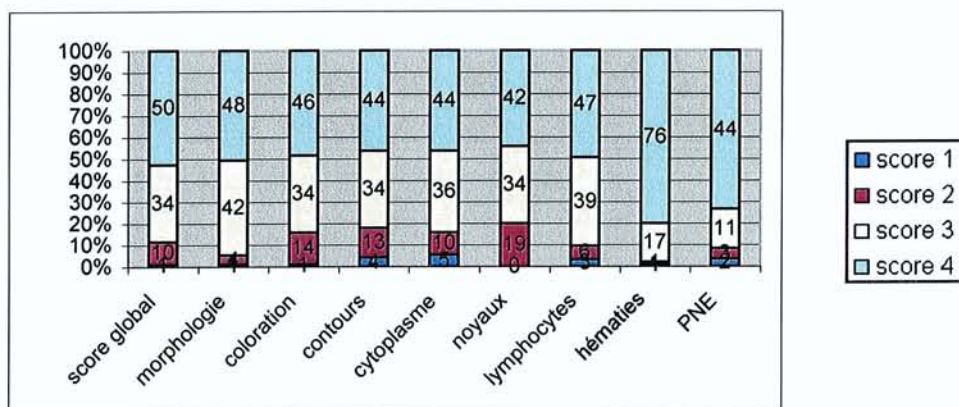
- le formol obtient toujours une majorité de scores 3 et 4 (jusqu'à 125 scores 4), trois lecteurs donnant une majorité de score 4 et deux autres, correspondants aux pathologistes les plus expérimentés, une majorité de score 3. Peu de scores 1 (de 0 à maximum 11 scores 1) sont attribués au formol.

- Le Glyo-fixx™ et le glyoxal obtiennent, quant à eux, peu de scores 4 (0 à maximum 42 scores 4) et plus de scores 1 comparativement au formol (de 17 à 46 scores 1), la majorité des scores attribués étant les scores 2 et 3. Cependant, il est à noter que le Glyo-fixx™ présente un plus grand nombre de scores 3 que de scores 2 (jusqu'à

maximum 84 scores 3 et 53 scores 2), alors que le glyoxal obtient plus de scores 2 que de scores 3 (maximum 64 scores 3 et 70 scores 2).

✓ **Comparaison des scores attribués à chacun des neuf PARAMETRES en fonction des fixateurs, tous organes confondus :**

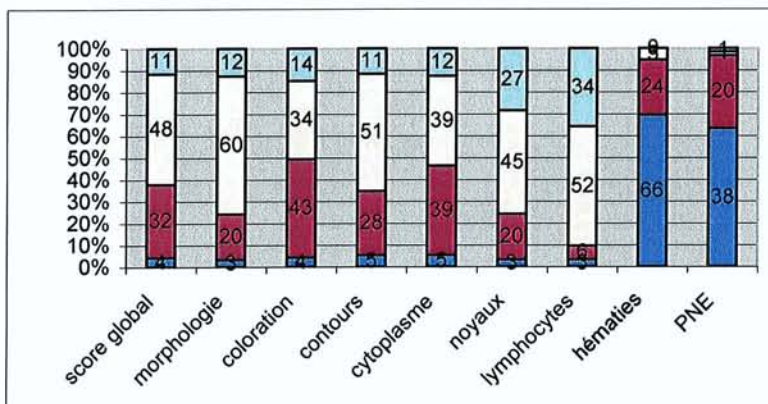
FORMOL



Khi-deux de Pearson = 75,654 ; signification : 0,000*

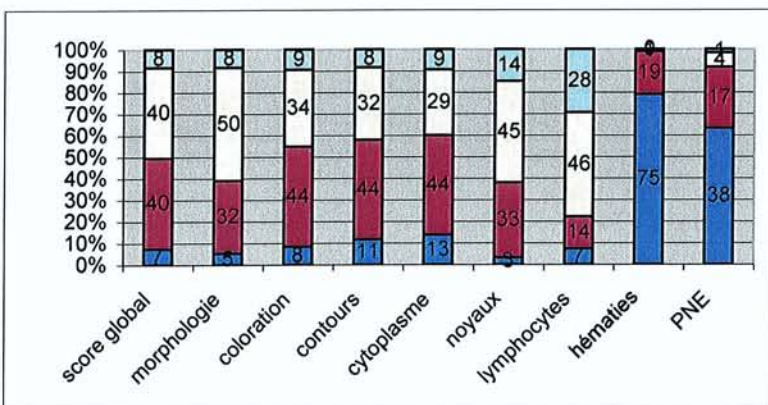
* 9 cellules (25%) ont un effectif théorique inférieur à 5 ; Le Khi-deux est donné à titre indicatif.

GLYO-FIXX™



Khi-deux de Pearson = 489,1 ; signification : 0,000

GLYOXAL



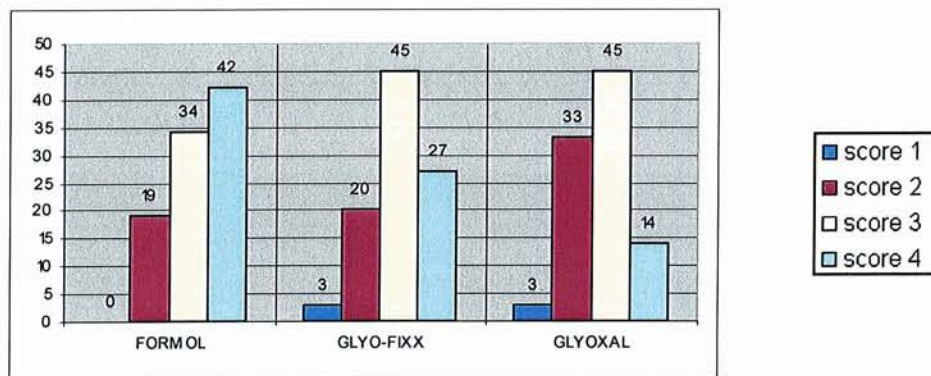
Khi-deux de Pearson = 413,3 ; signification : 0,000

Ces résultats par paramètres, significatifs, révèlent que trois 'groupes' peuvent être distingués :

1) les 5 paramètres 'score global', 'morphologie', 'coloration', 'contours' et 'cytoplasme' montrent des résultats globalement similaires, avec supériorité du formol par rapport au Glyo-fixxTM et au glyoxal.

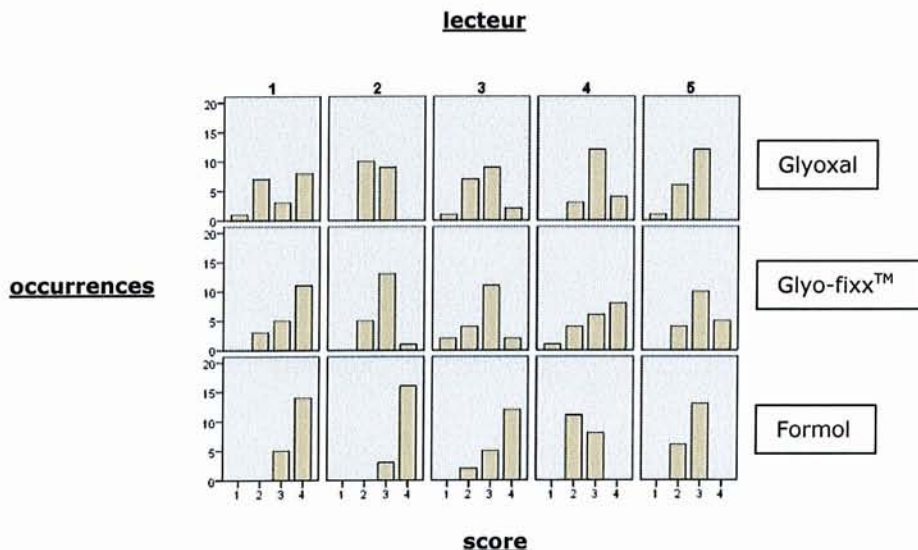
2) Les paramètres 'noyaux' et 'lymphocytes' montrent, de même, des résultats inférieurs pour le Glyo-fixxTM et le glyoxal, comparativement au formol, mais dans une moindre mesure : pour ces deux paramètres, en effet, moins de scores faibles (scores 1 et 2) et plus de scores élevés (3 et 4) sont observés, notamment avec le Glyo-fixxTM.

▪ **Scores attribués au paramètre 'NOYAUX' en fonction des fixateurs, tous organes confondus :**

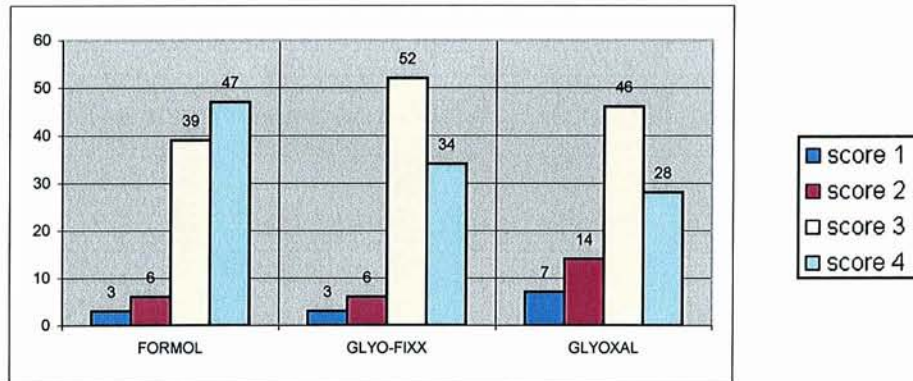


Khi-deux de Pearson = 24,228 ; signification : 0,00*

* 3 cellules (25%) ont un effectif théorique inférieur à 5 ; Le Khi-deux est donné à titre indicatif.



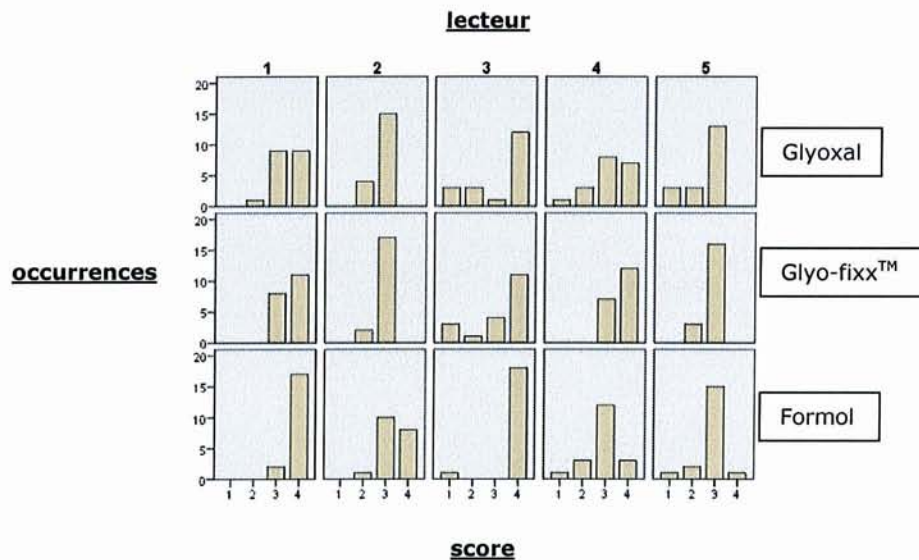
▪ **Scores attribués au paramètre 'LYMPHOCYTES' en fonction des fixateurs, tous organes confondus :**



Khi-deux de Pearson = 14,431 ; signification : 0,025*

* 3 cellules (25,0%) ont un effectif théorique inférieur à 5

Test exact de Fisher : 13,463 ; signification exacte : 0,032



Ainsi, même si des différences significatives persistent pour ces deux paramètres 'noyaux' et 'lymphocytes', elles sont moins prononcées. La qualité des détails nucléaires et des lymphocytes est, en effet, souvent bonne avec des scores 3 (figures 7 et 8).

Comme nous l'avons souligné précédemment, la répartition des scores par lecteur montre que l'appréciation du formol est différente selon les lecteurs : les lecteurs 1, 2 et 3 répondent de façon similaire, donnant une majorité de scores 4 au formol, alors que les lecteurs 4 et 5 (pathologistes les plus confirmés) attribuent de moins bons scores au formol avec une majorité de scores 3.

3) A l'inverse des paramètres 'noyaux' et 'lymphocytes', les deux paramètres 'hématies' et 'polynucléaires éosinophiles' montrent des résultats très médiocres avec le Glyo-fixx™ et le glyoxal (importante majorité de scores 1 et 2), comparativement au formol (majorité de scores 3 et 4).

▪ **Scores attribués au paramètre 'HEMATIES' en fonction des fixateurs, tous organes confondus :**

Khi-deux de Pearson
= 258,9
signification : 0,000

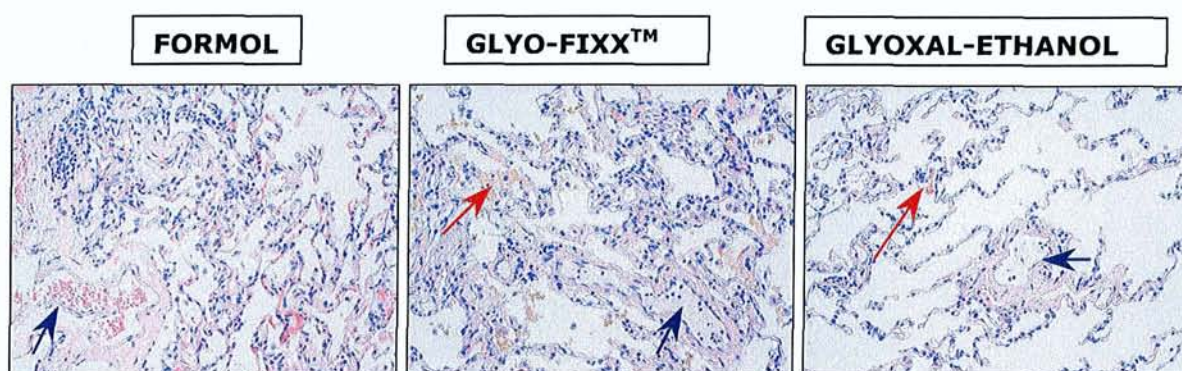
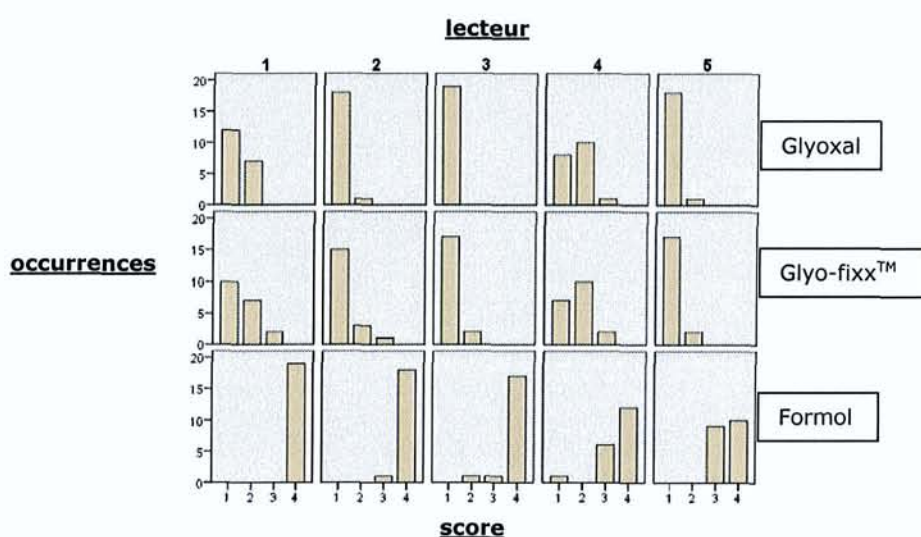
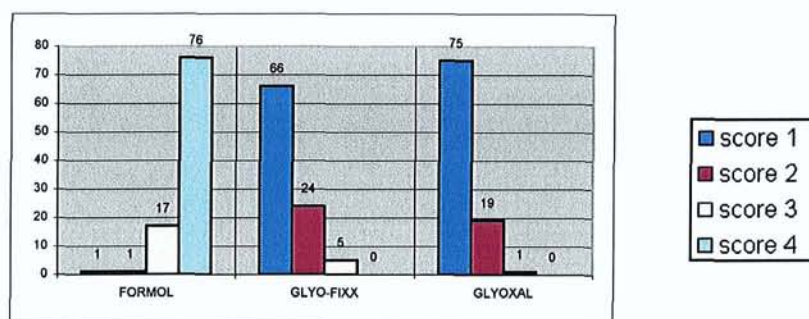


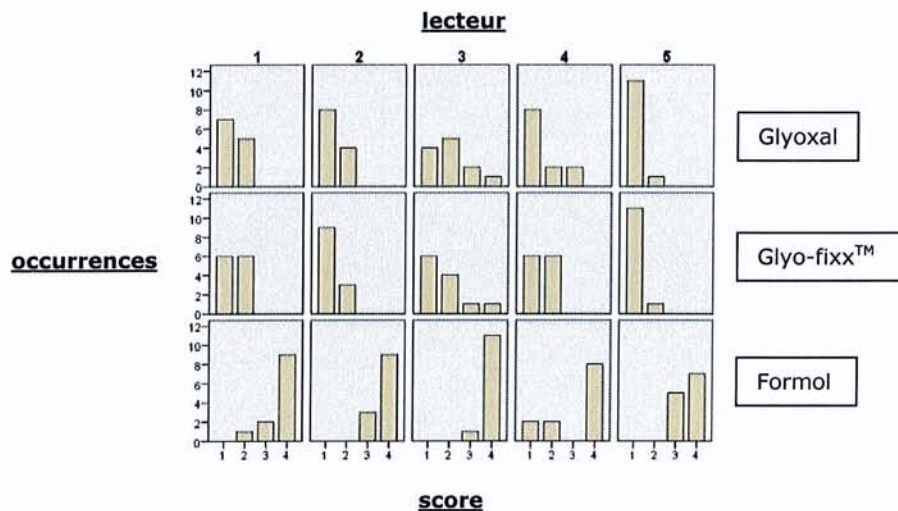
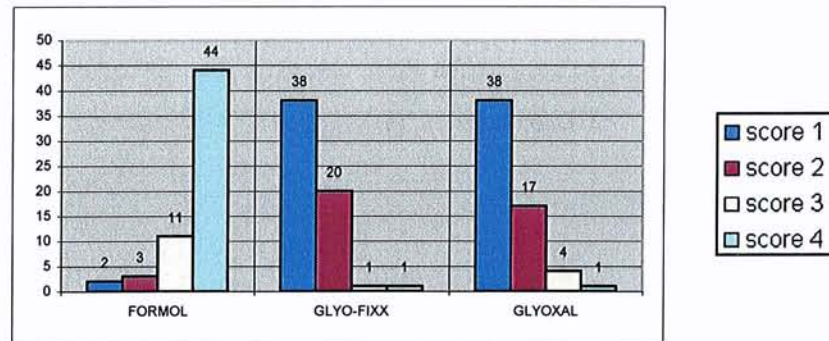
Figure 7 : Etude morphologique : exemple du poumon (HES x20)

⇒ Hématies bien visibles avec le formol, non colorées difficilement visibles avec le glyoxal (flèche bleue)

⇒ Présence de pigments brunâtres sur les coupes fixées au glyoxal (flèche rouge)

- **Scores attribués au paramètre 'POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES' en fonction des fixateurs, tous organes confondus :**

Khi-deux de Pearson
 = 135,8
 signification : 0,000



La répartition des scores par lecteur souligne également pour ces deux paramètres une supériorité du formol, qui est nette chez les lecteurs 1 à 3 et légèrement plus nuancée chez les lecteurs 4 et 5.

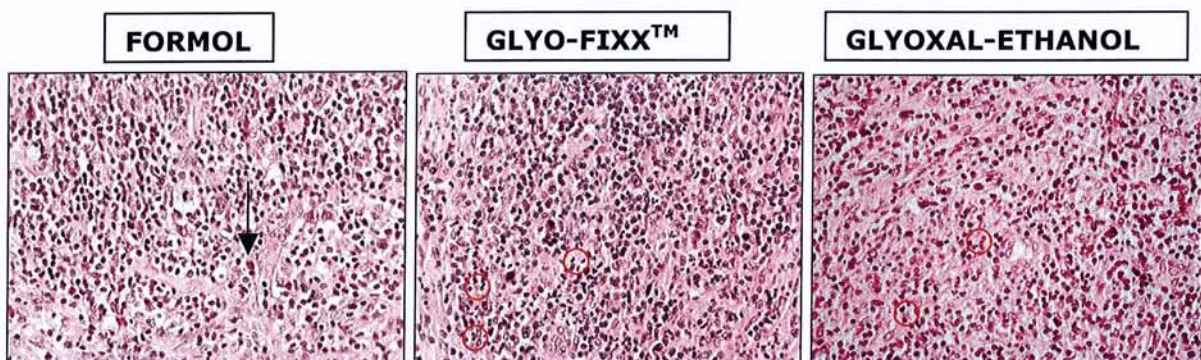


Figure 8 : Etude morphologique : exemple du ganglion - maladie de Hodgkin (HES x40)

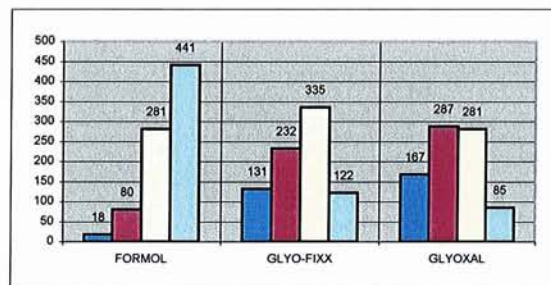
⇒ Polynucléaires éosinophiles bien visibles avec le formol (flèche noire), non colorés avec le glyoxal (exemple cercles rouges).

⇒ Morphologie nucléaire conservée avec les trois fixateurs.

✓ **Scores de chaque fixateur, tous organes confondus AVEC et SANS les paramètres 'Hématies' et 'Polynucléaires éosinophiles' :**

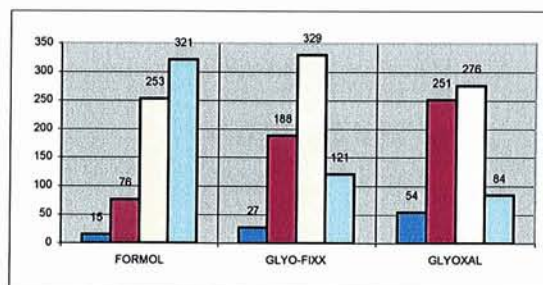
Devant les résultats très médiocres obtenus avec le Glyo-fixx™ et le glyoxal pour les paramètres 'hématies' et 'polynucléaires éosinophiles', il est intéressant d'analyser les scores obtenus par chaque fixateur tous organes confondus et tous paramètres confondus, mais sans ces deux derniers éléments.

Tous paramètres confondus



Khi-deux de Pearson = 591,2 ; signification : 0,000

Tous paramètres hors hématies et PNE



Khi-deux de Pearson = 312,5 ; signification : 0,000

■ score 1 ■ score 2 □ score 3 □ score 4

Il est ainsi observé, de façon logique, que le nombre de scores 4 du formol est moindre (-120) et surtout que le nombre de scores 1 est très diminué pour le Glyo-fixx™ et le glyoxal (divisé par un facteur de 3 à 5).

Cependant, même en retirant ces scores des paramètres 'hématies' et 'polynucléaires éosinophiles', les résultats du Glyo-fixx™ et du glyoxal restent statistiquement inférieurs à ceux du formol.

✓ **Scores attribués aux différents ORGANES en fonction des fixateurs, tous paramètres confondus:**

Si, globalement, tous organes et paramètres confondus, le formol apparaît meilleur, deux organes, étudiés individuellement, présentent d'aussi bons résultats quelque soit le fixateur. Il s'agit des prélèvements de cœur et de prostate. Tous les autres organes montrent une supériorité du formol, statistiquement significative.

Après la présentation globale des résultats par organe et par fixateur, tous paramètres confondus et tous paramètres hors 'hématies' et 'polynucléaires éosinophiles', les résultats obtenus pour l'estomac d'une part, pour la prostate et le cœur d'autre part, sont détaillés pour la représentativité de leurs résultats obtenus avec le glyoxal,

respectivement inférieurs pour le premier et équivalents pour les deux autres, par rapport au formol.

- **Tableau récapitulatif des Khi-deux calculés pour chaque organe en fonction des fixateurs, tous paramètres confondus**

ORGANES	KHI-DEUX	SIGNIFICATION
CŒUR	4,400	0,623
COLON	36,210*	0,000
ESTOMAC	122,5	0,000
FOIE**	49,754	0,000
GANGLION	54,809	0,000
GRELE	61,955*	0,000
PANCREAS	48,048*	0,000
PEAU	55,142*	0,000
POUMON**	113,5	0,000
PROSTATE	8,948	0,177
RATE**	90,741	0,000
REIN	42,578	0,000
SEIN	20,867*	0,002
THYROIDE	24,261*	0,000
UTERUS	14,888	0,021
VESSIE	36,389*	0,000

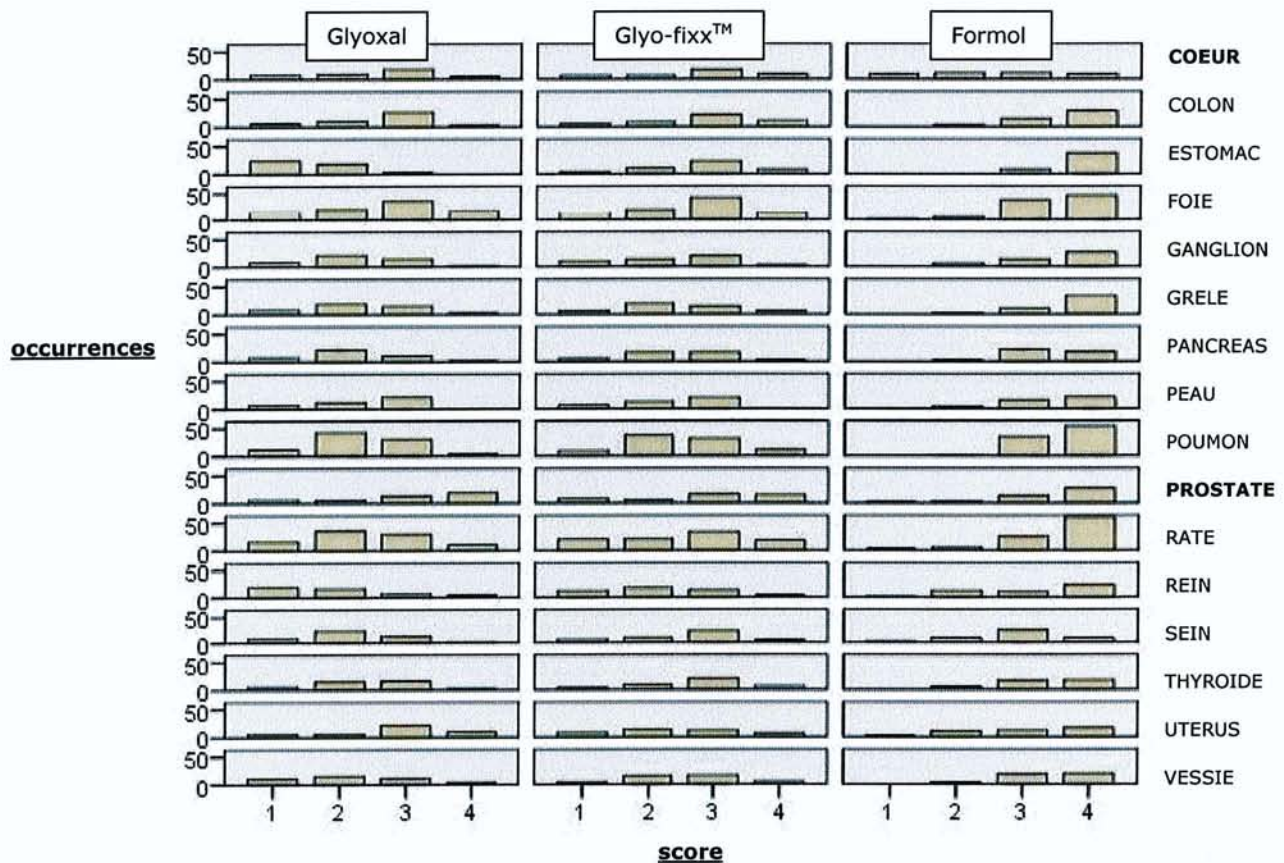
non significatif

* plusieurs cellules ont un effectif théorique inférieur à 5 ; Le Khi-deux est donné à titre indicatif.

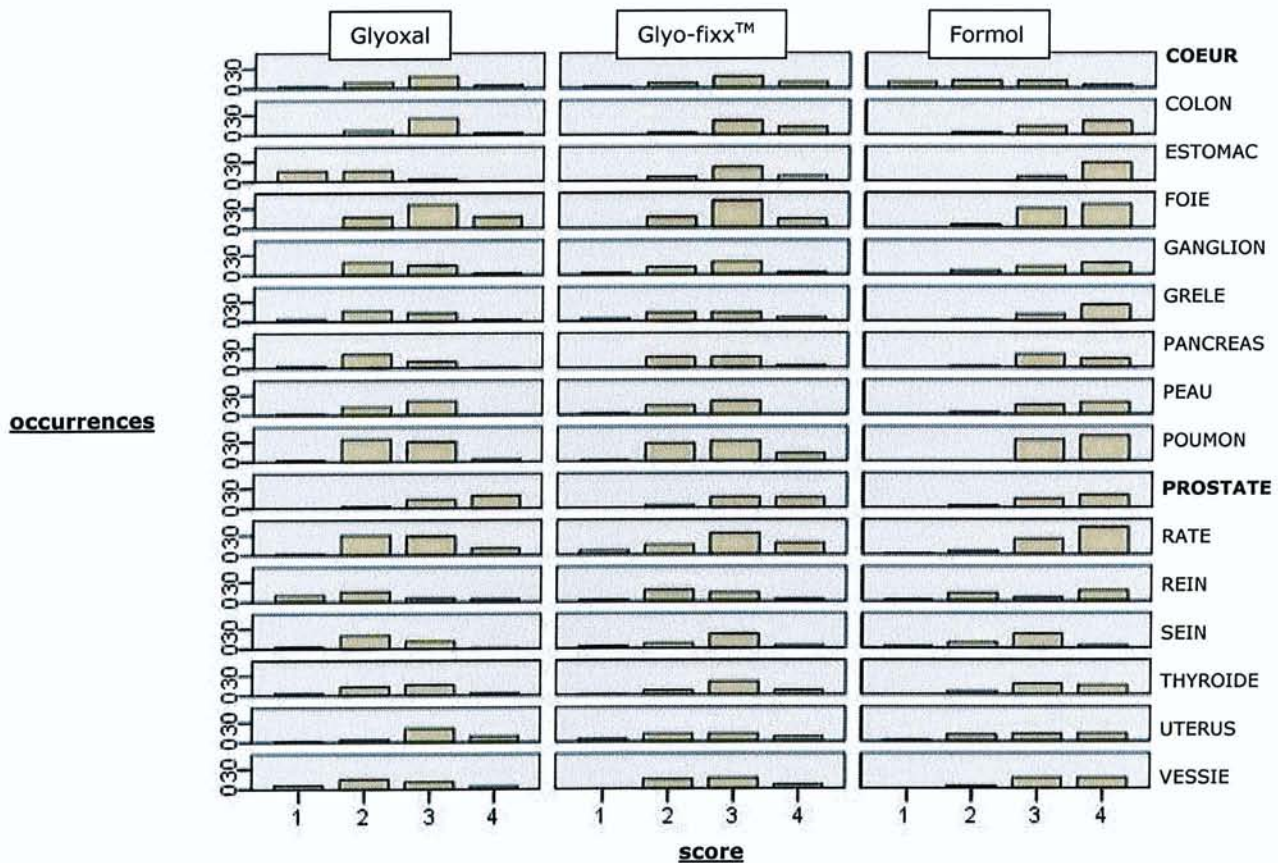
** Effectif double pour ces trois organes (2 échantillons étudiés pour chacun).

Tableau 20 : Khi-deux par organes en fonction des fixateurs, tous paramètres confondus

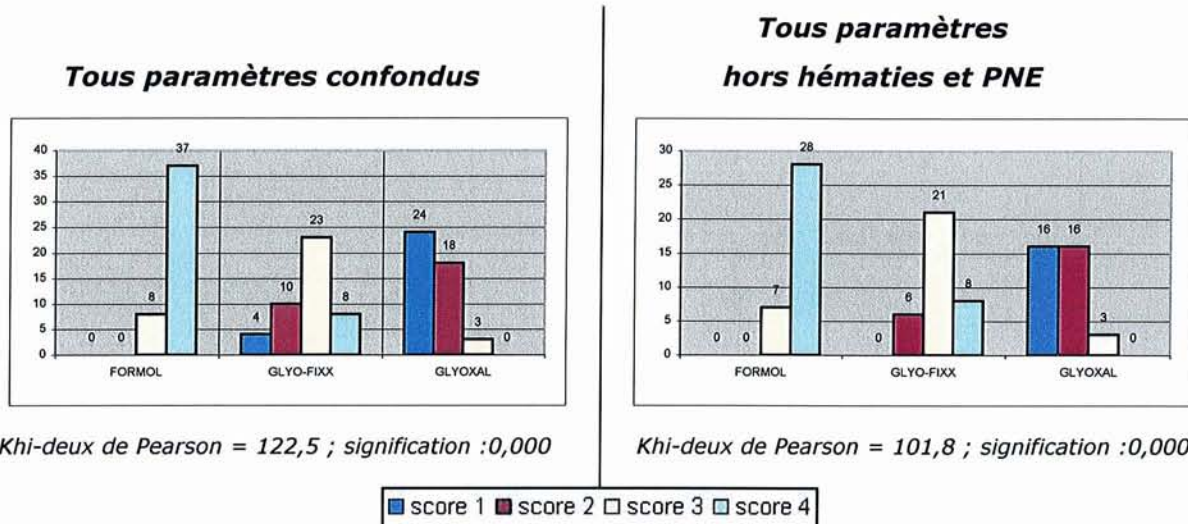
▪ **Tous paramètres confondus**



▪ **Tous paramètres hors 'Hématies' et 'Polynucléaires éosinophiles'**



▪ **Scores attribués à l'organe 'ESTOMAC' en fonction des fixateurs :**



Le formol est de façon statistiquement significative supérieur au Glyo-fixxTM, lui-même supérieur à la solution glyoxal-éthanol.

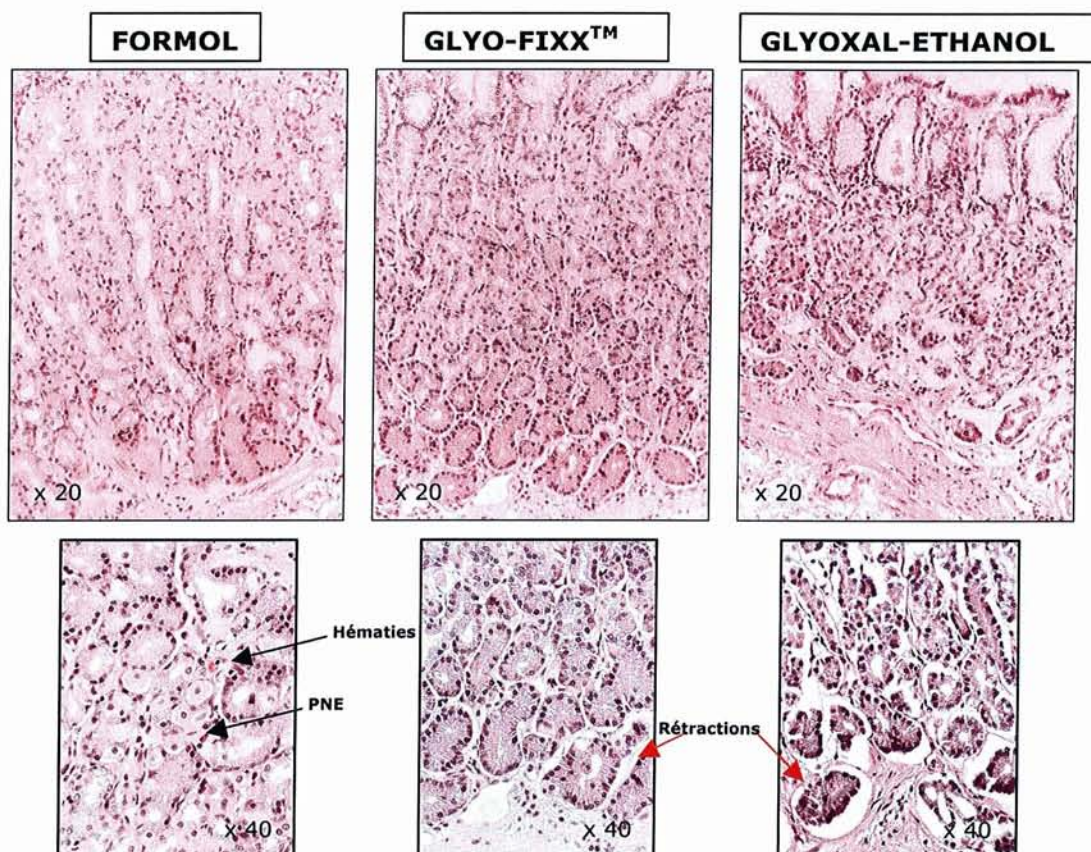


Figure 9 : Etude morphologique : estomac (HES x20 et x40)

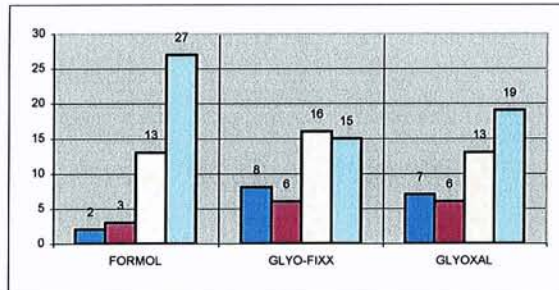
⇒ Morphologie très altérée avec le glyoxal (rétractions importantes, contours cellulaires peu nets, hématies et polynucléaires éosinophiles non visibles).

⇒ Morphologie correcte avec le Glyo-fixxTM, notamment nucléaire, mais présence de quelques rétractions, de contours cellulaires moins nets qu'avec le formol. Hématies et polynucléaires éosinophiles non visibles.

- **Scores attribués aux organes 'PROSTATE' et 'CŒUR' en fonction des fixateurs :**

PROSTATE

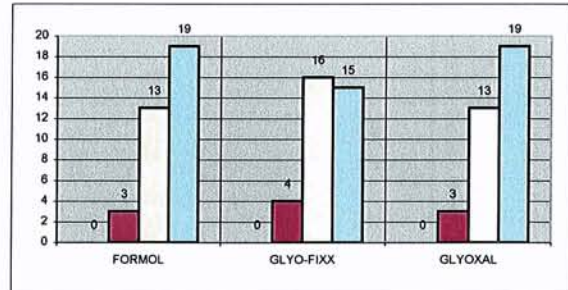
Tous paramètres confondus



Khi-deux de Pearson = 8,948 ; signification : **0,177**

Tous paramètres

hors hématies et PNE



Khi-deux de Pearson = 1,232* ; signification : **0,873**

■ score 1 ■ score 2 □ score 3 □ score 4

* 3 cellules (33,3%) ont un effectif théorique inférieur à 5 ; Le Khi-deux est donné à titre indicatif.

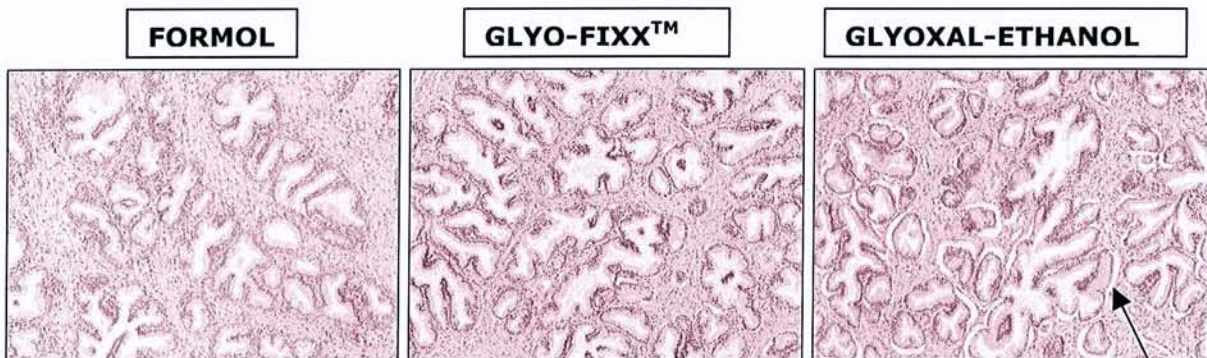


Figure 10 : Etude morphologique : prostate (HES x10)

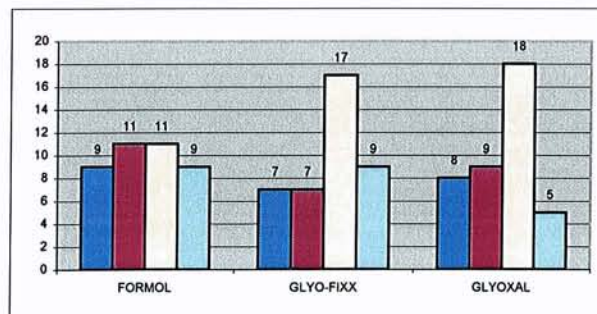
⇒ morphologie équivalente entre les trois fixateurs, hors la présence de rétractions plus marquées avec la solution glyoxal 4%-éthanol 10%.

Ainsi, pour cet organe, il n'est pas mis en évidence de différence significative entre les trois fixateurs, surtout lorsqu'on exclut les paramètres 'hématies' et 'polynucléaires éosinophiles'. Il en est de même pour le cœur :

CŒUR

Tous paramètres confondus

Khi-deux de Pearson
= 4,400
Signification : **0,623**



■ score 1
■ score 2
□ score 3
□ score 4

✓ **Remarques additionnelles**

- Dans la mesure où certains organes comme le foie ou le rein sont pauvres en mastocytes, une étude statistique de la conservation de la morphologie de cette population n'est pas réalisable. Quand ils sont présents, cependant, ils sont aisément reconnaissables et ceci quelque soit le fixateur.
- Les granulations des cellules de Paneth sont mal visibles dans les tissus fixés au glyoxal.
- La fixation au Glyo-fixxTM et avec la solution glyoxal 4%-éthanol 10% donne naissance à des pigments brunâtres, non biréfringents, particulièrement bien visibles au niveau du poumon (figure 7), du foie, de la thyroïde, de l'estomac et de la rate alors que, dans le même temps, aucuns pigments ne sont observés dans les coupes de tissus fixés au formol.
- Des fentes de rétraction témoignant d'une réticulation insuffisante sont fréquemment observées autour des structures épithéliales, (notamment au niveau de l'estomac, du grêle, du colon, de la prostate, du rein, du foie, du pancréas...) dans les tissus fixés au Glyo-fixxTM et au glyoxal 4%-éthanol 10% Elles sont particulièrement intenses avec ce dernier fixateur. Elles ne sont pas observées dans les coupes de tissus fixés au formol (figures 9 et 10).

4.2. Colorations histochimiques spéciales

Les colorations testées sont celles utilisées en routine au laboratoire. Dans un premier temps, elles ont été pratiquées sans adaptation des protocoles. Quelque soit la technique, la micro-anatomie est moins bien conservée avec le glyoxal qu'avec le formol. Ce fait est particulièrement net au niveau des préparations de rate et de tube digestif.

Le bleu de toluidine est un colorant cationique, de petite taille, faiblement hydrophile. Quand le colorant réagit avec l'ADN et l'ARN, il donne naissance à une coloration bleue orthochromatique. Avec certains constituants tissulaires, tels que les glycoaminoglycanes, la coloration devient rougeâtre / pourpre, le déplacement du spectre étant appelé métachromasie. A durée de coloration égale, la coloration des noyaux est toujours plus pâle avec le glyoxal. Les propriétés métachromatiques du colorant sont conservées, les mastocytes étant particulièrement bien visibles. Les glycoaminoglycanes du mucus sont bien colorés (figure 11).

Le bleu alcian 8G est un colorant cationique volumineux, se liant aux anions tissulaires par interactions électrostatiques. La sélectivité de la coloration repose sur une capacité à diffuser dans les tissus beaucoup plus faible que celle du bleu de toluidine et au développement d'interactions de Van der Waals. Dans les tissus fixés au formol, les glycoaminoglycanes, tels que présents dans le mucus sont colorés, alors que les acides nucléiques ne le sont pas. Dans le cas des tissus fixés au glyoxal, le bleu alcian 8G ne colore pas les noyaux. Il donne lieu à une absence de coloration du mucus (colon) ou à une coloration très faible.

Avec la coloration par le PAS, le mucus est coloré quasiment de la même façon quel que soit le fixateur. Cependant, comme précédemment, la morphologie est moins bien conservée au niveau des prélèvements fixés à l'aide du glyoxal.

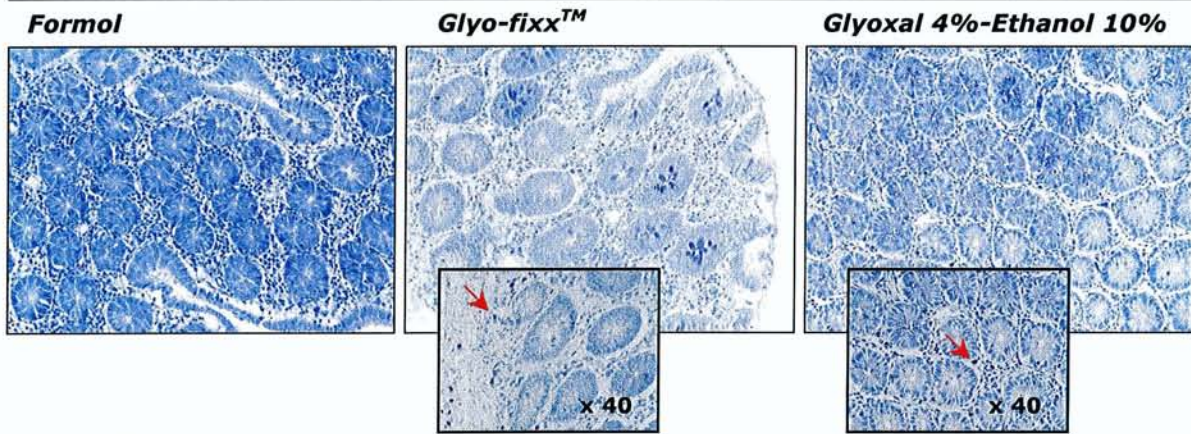
Il n'est pas observé de différence de colorabilité des fibres de la matrice extracellulaire en fonction du type de fixateur avec les colorations de Gordon, au Rouge Sirius F3B et de Weigert.

Par la coloration de Fontana, les cellules endocrines digestives des tissus fixés au glyoxal ne sont pas mises en évidence. En revanche, un artéfact de cette coloration argentique est évident, avec, dans les conditions de réalisation utilisées, la mise en évidence des fibres de réticuline (figure 12).

Les colorations de type Giemsa contiennent un colorant thiazinique cationique de petite taille, l'Azur B, et un colorant anionique de grande taille l'éosine Y. Initialement, la coloration fait intervenir des mécanismes électrostatiques (l'azur B colore les acides nucléiques en bleu et l'éosine les protéines en rouge). Dans un deuxième temps, des complexes (ou « sels ») AzurB-éosine pourpre se forment dans la chromatine et les granules des neutrophiles. Le développement de cette dernière coloration est multifactorielle. Outre la concentration des colorants et le rapport de leur concentration, la coloration dépend de la fixation (qui joue sur le nombre des groupements NH₂ libres), de la perméabilité tissulaire, du pH et de la concentration molaire des sels dans la solution, de la durée de coloration et de la nature des solvants. Quelque soit le fixateur, la coloration pourpre n'est pas obtenue. Dans les conditions utilisées, les noyaux des lymphocytes, avec le glyoxal, sont bien conservés mais leur coloration est pâle et les cytoplasmes lymphocytaires et plasmocytaires ne sont pas colorés, alors qu'ils le sont bien avec le formol. La métachromasie des granules mastocytaires est conservée, les mastocytes étant aisément observés. En revanche, les granulations des polynucléaires éosinophiles, évidentes sur le prélèvement fixé au formol, sont très faiblement ou non contrastées avec le glyoxal (figure 13).

La coloration de Perls met en évidence des grains d'hémosidérine dans les cellules de Küpffer dans des coupes de deux échantillons de foie fixés au formol. Le pigment n'est pas détecté dans les prélèvements hépatiques correspondants fixés au glyoxal. Sur un des prélèvements, une coloration bleutée diffuse, non granulaire, est observée dans les sinusoides, traduisant probablement la diffusion du fer, sous forme ou non d'hémosidérine, pendant la fixation et/ou la coloration (figure 14).

Dans un second temps, quelques variations techniques sont testées, notamment un allongement du temps de coloration pour les colorations de bleu de Toluidine, bleu alcian et Giemsa. Pour ces colorations, sur les prélèvements fixés à partir de glyoxal, l'augmentation du temps de coloration n'améliore que très discrètement l'intensité de la coloration, qui reste beaucoup plus faible comparativement au formol.



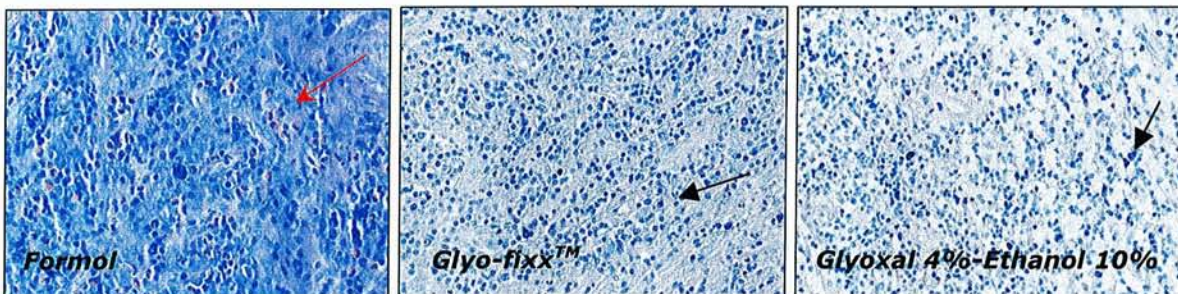
Glyo-fixx™ et Glyoxal : coloration nucléaire plus pâle, rétraction, mastocytes bien visibles (flèches rouges)

Figure 11 : Coloration par le Bleu de Toluidine : colon (x20)



Formol : cellules endocrines (flèche rouge) ; **Glyo-fixx™ et Glyoxal** : coloration de la réticuline (flèches noires), rétraction, cellules endocrines non mises en évidence

Figure 12 : Coloration de Fontana : colon (x20)



Formol : coloration nucléaire et cytoplasmique, polynucléaires éosinophiles colorés (flèche rouge) ; **Glyo-fixx™ et Glyoxal** : polynucléaires éosinophiles non colorés ; coloration nucléaire plus pâle, mastocytes bien visibles (flèches noires).

Figure 13 : Coloration de Giemsa : ganglion (maladie de Hodgkin) (x40)

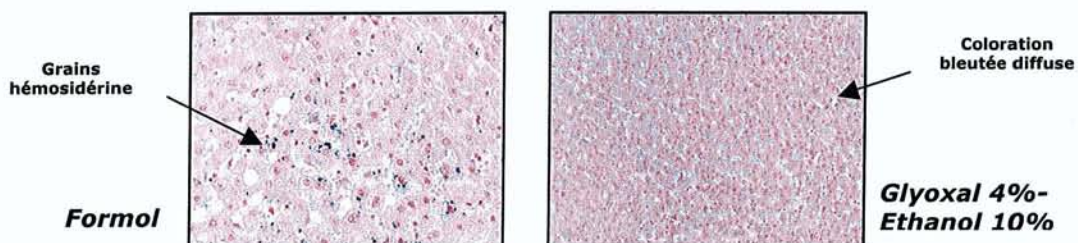


Figure 14 : Coloration de Perls : foie (x10)

4.3. Effets du pH sur la micro-anatomie

Les solutions à base de glyoxal utilisées dans notre étude, dont le Glyo-fixx™, ont pour caractéristique un pH acide (pH 4). Sur quatre prélèvements (prostate, rein, foie et colon), les effets du pH ont été appréciés en comparant la fixation obtenue avec des solutions de glyoxal 4%-éthanol 10% pH4 à celles de glyoxal 4%-éthanol 10% tamponnées avec un pH final de 7.

Dans les échantillons fixés à l'aide de glyoxal, les hématies sont difficiles à reconnaître, ceci quelque soit le pH. Elles ne sont pas lysées, mais peu ou pas colorées. Leur coloration, comme celle des granulations des éosinophiles est un peu plus intense à pH 7 qu'à pH 4 (figure 15). Dans tous les cas, leur forme est altérée: perte de la forme biconcave, ballonnisation ou rétraction, délimitation imparfaite de la membrane plasmique. La mise en évidence d'une glycoprotéine membranaire, la glycophorine, démontre cependant la persistance de cette dernière (figure 16).

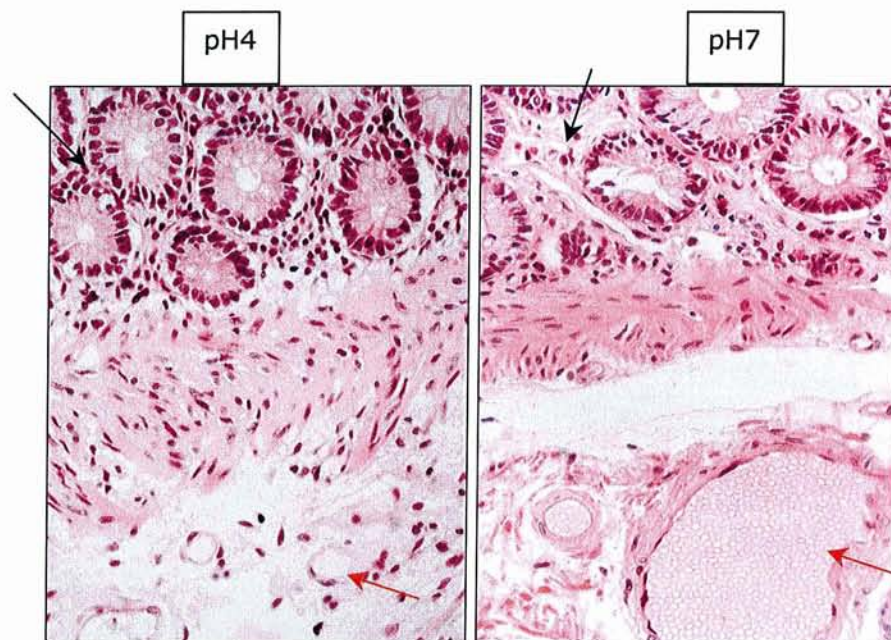


Figure 15 : Effets du pH de la solution glyoxal 4%-éthanol 10% sur des échantillons de colon (x20)

⇒ A pH4 : hématies (flèche rouge) et granulations éosinophiles (flèche noire) non colorées.

⇒ A pH7 : hématies (flèche rouge) et granulations éosinophiles (flèche noire) discrètement plus colorées

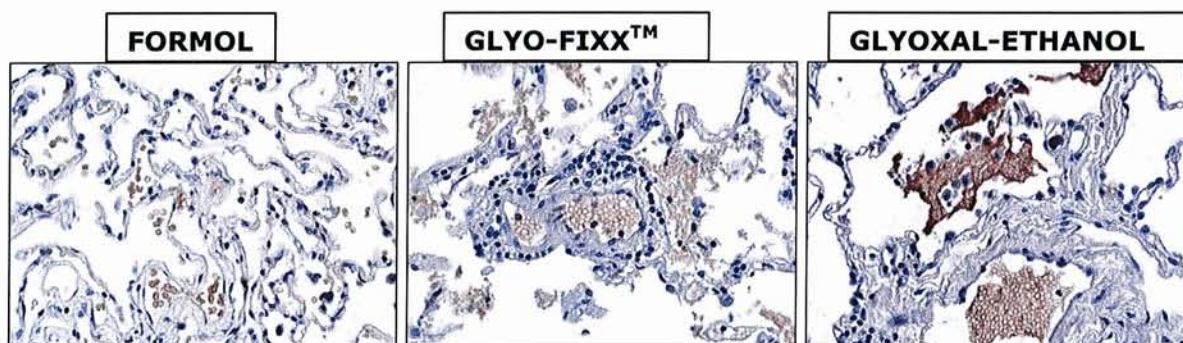


Figure 16 : Mise en évidence des hématies par la Glycophorine en immunohistochimie (x40)

⇒ Formol : hématies mises en évidence, forme biconcave respectée

⇒ Glyoxal : mise en évidence de la membrane plasmique des hématies, mais forme altérée (perte de la forme biconcave, ballonisation ou rétraction)

4.4. Conséquences d'une fixation prolongée sur la micro-anatomie

Cinq prélèvements ont été conservés pendant une période de quatre semaines dans les fixateurs testés, afin d'apprécier les éventuels effets du glyoxal dans le temps, sur le plan histologique et cytologique.

Avant l'inclusion des échantillons, un fait marquant est la présence de très nombreux dépôts en suspension dans les liquides fixateurs à base de glyoxal, qui sont devenus colorés et troubles (Glyo-fixx™ et solution de glyoxal 4%-éthanol 10%), alors que le formol est resté clair et limpide.

Sur le plan histologique, les échantillons fixés au glyoxal et conservés durant quatre semaines avant inclusion en paraffine révèlent globalement une moindre colorabilité en HES, prédominant sur le caractère éosinophile. L'explication peut provenir d'une perte de matériel, constatée surtout au niveau du foie, où les cytoplasmes apparaissent clarifiés et en partie vidés de leur contenu. La morphologie nucléaire est cependant respectée.

De plus, sur un de ces prélèvements, correspondant à un parenchyme hépatique non tumoral, deux éléments essentiels concernant l'échantillon fixé avec du glyoxal sont relevés :

- ✓ Une nette dégradation de la morphologie générale de l'échantillon. L'aspect est celui d'un parenchyme lysé.
- ✓ En périphérie du prélèvement, de très nombreux filaments mycéliens sont mis en évidence dès la coloration HES, dont la présence est confirmée par les colorations spéciales Grocott et PAS. Il s'agit de filaments septés, disposés en périphérie de la coupe tissulaire (figure 17).

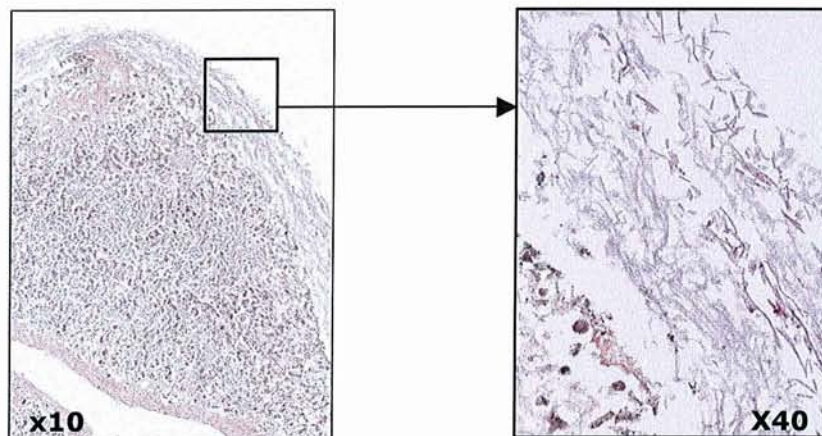


Figure 17 : Aspect histologique d'un prélèvement hépatique fixé dans le glyoxal pendant 4 semaines

⇒ aspect lysé du parenchyme hépatique et présence de nombreux filaments mycéliens en périphérie

5. Etude immunohistochimique

L'interprétation des résultats des techniques immunohistochimiques a été systématiquement réalisée par deux observateurs, sans divergence dans l'appréciation de ces résultats.

Les résultats sont exprimés de façon semi-quantitative et qualitative, en fonction du nombre de cellules marquées, du caractère homogène ou hétérogène du marquage ainsi que l'intensité du marquage obtenu et la présence ou non d'un bruit de fond.

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 21.

ANTICORPS	ORGANES	PRE-TRAITEMENT	FORMALDEHYDE	GLYO-FIXX™	GLYOXAL 4%- ETHANOL 10%	TEMOIN
MARQUEURS NUCLEAIRES	TTF1	THYROÏDE	absence	0	0	
			Autoclave EDTA	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	+ cyt focal 2 pas de BF	+
			Autoclave Tris HCl	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	+ cyt focal 2 pas de BF	
		POUMON	absence	0	0	
			Autoclave EDTA	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	Présence de précipités 0	+
			Autoclave Tris HCl	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	Présence de précipités 0	
	RE	SEIN	absence	0	+ cyt focal 2	
			CM Tris citrate	++ nucléaire 3 BF modéré (cyt)	+ nucléaire 2 BF léger	
			Autoclave Tris HCl	++ nucléaire 3 BF léger	Rares 1-2 pas de BF	
	RP	SEIN	absence	Rares 1 pas de BF	+ 2-3 pas de BF	
			CM Tris citrate	+++ 3 pas de BF	++ 3 pas de BF	
			Autoclave Tris HCl	+++ 3 pas de BF	++ 3 pas de BF	
	P63	PROSTATE	absence	0	+ focal 1 pas de BF	
			Autoclave EDTA	+++ diffus 3 pas de BF	++ 2-3 pas de BF	+
			Autoclave Tris HCl	++ hétérogène 2-3 pas de BF	++ hétérogène 2-3 pas de BF	
	Bcl2	GANGLION	absence	0	0	
			Autoclave EDTA	Nucléaire +++ 3 pas de BF	Nucléaire + 1 pas de BF	
			Autoclave Tris HCl	Nucléaire +++ 2-3 pas de BF	Nucléaire rares 1 pas de BF	
	Bcl6	GANGLION	absence	0	0	
			pH 9,9	+++ nucléaire 3 pas de BF	Rares nucléaire 1 pas de BF	décollé
			Autoclave Tris HCl	+ 1-2 pas de BF	0	
	Mib1	GANGLION	absence	0	0	
			Autoclave EDTA	+++ nucléaire 3 pas de BF	+ nucléaire 2 Pas de BF	
			Autoclave Tris HCl	+ nucléaire 2 BF léger	+ nucléaire 2 Pas de BF	
	Mib1	GRELE	absence	0	Rares + cyt 2 Pas de BF	
			Autoclave EDTA	+++ nucléaire 3 pas de BF	+ nucléaire 2 BF léger	+
			Autoclave Tris HCl	+++ nucléaire 3 Pas de BF	Rares cyt 2 pas de BF	

BF bruit de fond

Cyt cytoplasmique

Mbr Membranaire

- absence d'expression

+ expression faible

++ expression modérée

+++ expression forte

1 marquage peu intense

2 marquage modérément intense

3 marquage intense

ANTICORPS		ORGANES	PRE-TRAITEMENT	FORMALDEHYDE	GLYO-FIXX™	GLYOXAL 4%- ETHANOL 10%	TEMOIN
MARQUEURS CYTOPLASMIQUES	HEPATOCYTE	FOIE	absence	++ granulaire cyt 1 pas de BF	++ granulaire cyt 3 pas de BF	+++ granulaire cyt 3 pas de BF	
			Autoclave EDTA	+++ granulaire cyt 3 pas de BF	+++ granulaire cyt 2-3 pas de BF	+++ granulaire cyt 3 pas de BF	+
			Autoclave Tris HCl	+++ granulaire cyt 2 pas de BF	+++ granulaire cyt 3 pas de BF	+++ granulaire cyt 3 pas de BF	
	KL1	COLON	absence	0	0	Rares 1 pas de BF	
			Autoclave EDTA	Cyt +++ 3 pas de BF	Cyt + 1 pas de BF	Cyt ++ 1 pas de BF	+
			Autoclave Tris HCl	Cyt +++ 2-3 pas de BF	Cyt ++ 1 pas de BF	Cyt ++ 1 pas de BF	
	KER HMW	PROSTATE	absence	0	+ 3 pas de BF	+ 3 pas de BF	
			Autoclave EDTA	+++ 3 pas de BF	+ 2-3 BF léger	+ 3 BF léger	+
			Autoclave Tris HCl	+++ 2-3 pas de BF	+ 3 pas de BF	+ 3 pas de BF	
	PSA	PROSTATE	absence	++ hétérogène 2 pas de BF	+++ diffus 3 BF	+++ 3 pas de BF	
			Autoclave EDTA	+++ 3 BF léger	++ hétérogène 2-3 BF léger	+++ 3 BF léger	+
			Autoclave Tris HCl	+++ 3 BF léger	+++ 3 BF modéré	+++ 3 BF modéré	
	NF	GRELE	absence	0	+++ 3 BF modéré	+++ 3 BF modéré	
			Autoclave EDTA	+++ 3 BF léger	+++ 3 BF léger	+++ 3 BF léger	+
			Autoclave Tris HCl	+++ 3 BF léger à modéré	+++ 3 BF léger	+++ 3 BF léger	
	CGA	GRELE	absence	++ 3 pas de BF	+++ 3 pas de BF	+++ 3 pas de BF	+
			Autoclave Tris HCl	+++ 3 BF léger	+++ 3 BF léger à modéré	+++ 3 BF modéré	
	NSE	GRELE	absence	0	++ 2 pas de BF	++ 2 BF léger	
			Autoclave EDTA	+++ 3 BF modéré	+++ 3 BF modéré	+++ 3 BF modéré	+
			Autoclave EDTA Dilution 1/4000	+++ 3 BF léger	+++ 3 BF léger	+++ 3 BF léger	
			Autoclave Tris HCl	++ 1-2 BF modéré	++ 2 BF modéré	++ 1-2 BF modéré	
	CD3	GANGLION	absence	0	Rares cyt 1 pas de BF	+ cyt 1 pas de BF	
			Autoclave EDTA	Cyt +++ 3 pas de BF	Cyt ++(baveux) 2 pas de BF rétraction	Cyt ++(baveux) 2 pas de BF rétraction	+
			Autoclave Tris HCl	Cyt +++ 3 pas de BF	Cyt ++(baveux) 2 pas de BF rétraction	Cyt ++(baveux) 2 pas de BF rétraction	
	TG	THYROIDE	absence	++ 3 BF modéré	++ 3 BF modéré	++ 3 BF modéré	+
			Autoclave Tris HCl	+ hétérogène 3 BF modéré	+ hétérogène 3 BF modéré	+++ diffus 3 BF modéré	

BF bruit de fond

Cyt cytoplasmique

Mbr Membranaire

- absence d'expression

+ expression faible

++ expression modérée

+++ expression forte

1 marquage peu intense

2 marquage modérément intense

3 marquage intense

ANTICORPS		ORGANES	PRE-TRAITEMENT	FORMALDEHYDE	GLYO-FIXX™	GLYOXAL 4%- ETHANOL 10%	TEMOIN
MARQUEURS MEMBRANAIRES	CD20	GANGLION	absence	0	Mbr ++ 3 pas de BF	Mbr ++ 3 pas de BF	
			Autoclave EDTA	Mbr +++ 3 pas de BF	Mbr ++ (baveux) 3 pas de BF	Mbr +++ (baveux) 3 pas de BF	+
			Autoclave Tris HCl	Mbr +++ 3 pas de BF - bon qu'EDTA	Mbr +++ (baveux) 3 pas de BF	Mbr +++ (baveux) 3 pas de BF	
MATRICE EXTRACELLULAIRE	COLLAGENE IV	GRELE	absence	-+ 1 pas de BF	++ hétérogène 1-2 pas de BF rétraction	++ hétérogène 1-2 pas de BF rétraction	
			Autoclave Tris HCl	++ hétérogène 1-2 pas de BF	+++ 2 BF léger rétraction Grains cyt	+++ 1-2 BF modéré rétraction Grains cyt	
			EDTA + Collagénase	+++ 3 pas de BF	+++ 3 BF léger rétraction grains cyt	+++ 3 pas de BF rétraction grains cyt	+
			Tris HCl+ Collagénase	+++ 3 pas de BF	+++ 3 pas de BF rétraction grains cyt	+++ 3 pas de BF rétraction grains cyt	
		PROSTATE	absence	0	+ hétérogène 1 pas de BF	+ hétérogène 1-2 pas de BF	
			Autoclave Tris HCl	+ hétérogène 1 pas de BF	++ hétérogène 1-2 pas de BF grains cyt	++ hétérogène 1-2 pas de BF grains cyt	
			EDTA + Collagénase	+++ 3 pas de BF	+++ 3 pas de BF grains cyt	+++ 2-3 pas de BF grains cyt	+
			Tris HCl + Collagénase	+++ 3 pas de BF	+++ 1-2 pas de BF	+++ 3 pas de BF grains cyt	

BF bruit de fond

Cyt cytoplasmique

Mbr Membranaire

- absence d'expression

+ expression faible

++ expression modérée

+++ expression forte

1 marquage peu intense

2 marquage modérément intense

3 marquage intense

Tableau 21 : Résultats de l'étude immunohistochimique : anticorps testés en fonction de différents pré-traitements et des fixateurs

L'interprétation des résultats de l'étude immunohistochimique comporte de façon systématique l'appréciation de la conservation ou non de l'intégrité micro-anatomique des coupes tissulaires, sans ou après pré-traitement, de la sensibilité de la technique, en comparant l'intensité du signal à concentration égale d'anticorps et avec des conditions techniques identiques, de la localisation du signal attendu, de la présence d'artéfacts (bruit de fond, artéfact lié à la biotine endogène, présence de pigments). Enfin, après obtention des premiers résultats, la capacité d'adaptation de la technique est testée en modifiant soit la concentration de l'anticorps, soit le pré-traitement.

✓ ***Intégrité micro-anatomique***

Sur la majorité des tissus testés pour l'étude immunohistochimique, la morphologie et la cytologie sont globalement beaucoup moins bien conservées lors d'une fixation à base de glyoxal. Ceci a été particulièrement évident sur les prélèvements de rate, sur lesquels les anticorps testés (tableau 22), CD3, CD20 et bcl2, montrent les mêmes résultats au niveau du marquage immunohistochimique que ceux obtenus sur le ganglion, mais avec une morphologie très altérée, se traduisant par une perte de matériel et des rétractions cellulaires importantes (figure 18). Ces altérations de la morphologie sont constatées même en l'absence de restauration antigénique, permettant d'exclure la responsabilité unique des pré-traitements.

ORGANE	ANTICORPS	PRE-TRAITEMENT	FORMALDÉHYDE	GLYO-FIXX TM	GLYOXAL 4%-ETHANOL 10%
RATE	MARQUEUR CYTOPLASMIQUE CD3	absence	0	Rares cyt ? 2 pas de BF morpho ---	Rares cyt ? 2 pas de BF morpho ---
		Autoclave EDTA	Cyt +++ 3 pas de BF	Cyt + 2 pas de BF morpho ---	Cyt + 3 pas de BF morpho ---
		Autoclave Tris HCl	Cyt +++ 3 pas de BF	Cyt +++ 3 pas de BF morpho ---	Cyt +++ 3 pas de BF morpho ---
	MARQUEUR MEMBRANAIRE CD20	absence	Mbr + 1 pas de BF	Mbr ++ 3 pas de BF morpho ---	Mbr ++ 3 pas de BF morpho ---
		Autoclave EDTA	Mbr +++ 3 pas de BF	Mbr ++ (baveux) 3 pas de BF morpho ---	Mbr ++ (baveux) 3 pas de BF morpho ---
		Autoclave Tris HCl	Mbr +++ 3 pas de BF	Mbr ++ (baveux) 3 pas de BF morpho ---	Mbr ++ (baveux) 3 pas de BF morpho ---
	MARQUEUR NUCLEAIRE Bcl2	absence	0	0 morpho ---	0 morpho ---
		Autoclave EDTA	Nucléaire +++ 3 BF léger	Nucléaire ++ 3 pas de BF morpho ---	Nucléaire + 3 pas de BF morpho ---
		Autoclave Tris HCl	Nucléaire +++ 3 BF léger	Nucléaire ++ 3 BF léger morpho --- [69]	Nucléaire + 3 BF léger morpho --- [69]

BF bruit de fond

Cyt cytoplasmique

Mbr Membranaire

- absence d'expression

+ expression faible

++ expression modérée

+++ expression forte

1 marquage peu intense

2 marquage modérément intense

3 marquage intense

Tableau 22 : Résultats de l'étude immunohistochimique sur les prélèvements de rate : CD3, CD20 et bcl2

✓ **Sensibilité de la technique immunohistochimique**

Les conditions techniques adoptées correspondent à celles utilisées en routine dans le laboratoire pour des prélèvements fixés au formol. La sensibilité de la technique est comparée à même concentration d'anticorps dans des conditions strictement identiques pour chaque pré-traitement.

Une majorité des techniques immunohistochimiques se révèlent moins sensibles après fixation au glyoxal qu'après fixation formolique.

- Parmi les 9 antigènes cytoplasmiques étudiés, trois ne sont pas détectés ou très faiblement sur les coupes de tissus fixés à base de glyoxal en l'absence de pré-traitement. Le signal est amélioré après application d'un pré-traitement, sans que des différences significatives ne soient observées entre le pré-traitement en autoclave dans le tampon EDTA pH 8 ou celui dans le tampon Tris HCl 0,01M pH 8,5. Les signaux observés après ces pré-traitements sont cependant globalement moins intenses et de répartition

moins homogène dans la coupe que ceux observés sur les coupes de tissus fixés au formol après application des mêmes pré-traitements. Il s'agit du CD3, de la pancytokératine KL1 et de la Kératine de haut poids moléculaire (KER HMW), qui sont d'utilisation très courante et pourtant réputés de mise au point facile.

- La détection des antigènes nucléaires est toujours plus difficile après fixation au glyoxal qu'après fixation au formol. Certains épitopes ne sont pas reconnus. Il en est ainsi de TTF1, qui n'est pas détecté et ceci en dépit de l'essai de diverses modalités de pré-traitement (tableau 23) et de la forte positivité dans les tissus témoins fixés au formol sauf lorsqu'aucun pré traitement n'a été réalisé (figure 19). De même, les indices de prolifération mesurés après mise en évidence de l'antigène Ki-67 par l'anticorps Mib1 sont beaucoup plus faibles dans les tissus fixés au glyoxal que dans ceux fixés au formol. Ainsi, mesuré à partir d'un compte de 1000 cellules dans les territoires les plus prolifératifs, l'indice de prolifération est de 37% au niveau du prélèvement ganglionnaire fixé au formol, de 18% et 16% au niveau des mêmes prélèvements fixés respectivement avec le Glyo-fixxTM et avec la solution glyoxal 4%-éthanol 10%. Il n'est pas observé de marquage au niveau de l'épithélium glandulaire sur le prélèvement de grêle fixé à l'aide du Glyo-fixxTM ou de la solution glyoxal 4%-éthanol 10%. Avec ce dernier fixateur, un marquage cytoplasmique focal des cellules épithéliales est constaté.

Pour les antigènes bcl2 et bcl6, les résultats sur le ganglion sont similaires avec un marquage nucléaire d'une part peu intense, d'autre part par un nombre nettement plus faible de cellules sur les prélèvements fixés à l'aide de glyoxal.

Enfin, après fixation au glyoxal, le signal correspondant à la détection des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone est faible. Il est amélioré après application d'un pré-traitement, sans que des différences ne soient notables entre le pré-traitement 'classique' (EDTA pH 8) et celui conseillé par Dapson pour les prélèvements fixés au glyoxal (Tris HCl 0,1 pH 8,5). Il demeure toujours inférieur à celui observé après fixation formolique.

- 7 antigènes sur les 18 recherchés sont détectés sans pré-traitement dans les tissus fixés au glyoxal, contre seulement 2 sur 18 dans les tissus fixés au formol. L'application d'un pré-traitement n'améliore pas le signal, voire à l'inverse le détériore (tableau 21). Il s'agit du CD20, de la chromogranine A, de la thyroglobuline, des neurofilaments, de l'antigène spécifique de la prostate, de l'énolase neuronale spécifique et de l'antigène détecté par l'anticorps hépatocyte.

ANTICORPS	PRE-TRAITEMENT	DILUTION	FORMALDEHYDE	GLYO-FIXX™	GLYOXAL 4%- ETHANOL 10%
TTF1	PAS DE PRE-TRAITEMENT	1/1600	0	0 Présence de précipités	0 Présence de précipités
		1/800			
		1/400			
		1/100			
		1/50			
	EDTA PH8	1/1600	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	0 Présence de précipités	0 Présence de précipités
		1/800			
		1/400			
		1/100			
		1/50			
	TRIS HCL	1/1600	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	0 Présence de précipités	0 Présence de précipités
		1/800			
		1/400			
		1/100			
		1/50			
	CITRATE PH6	1/1600	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	0 Présence de précipités	0 Présence de précipités
		1/800			
		1/400			
		1/100			
		1/50			
	TAMPON PH9,9	1/1600	+++ nucléaire diffus 3 pas de BF	Pas de marquage nucléaire Discret marquage cytoplasmique sur rares cellules Présence de précipités	
		1/800			
		1/400			
		1/100			
		1/50			

BF bruit de fond

Cyt cytoplasmique

Mbr Membranaire

- absence d'expression

+ expression faible

++ expression modérée

+++ expression forte

1 marquage peu intense

2 marquage modérément intense

3 marquage intense

Tableau 23 : Les différents pré-traitements et dilutions testés pour l'anticorps TTF1 sur les prélèvements pulmonaires

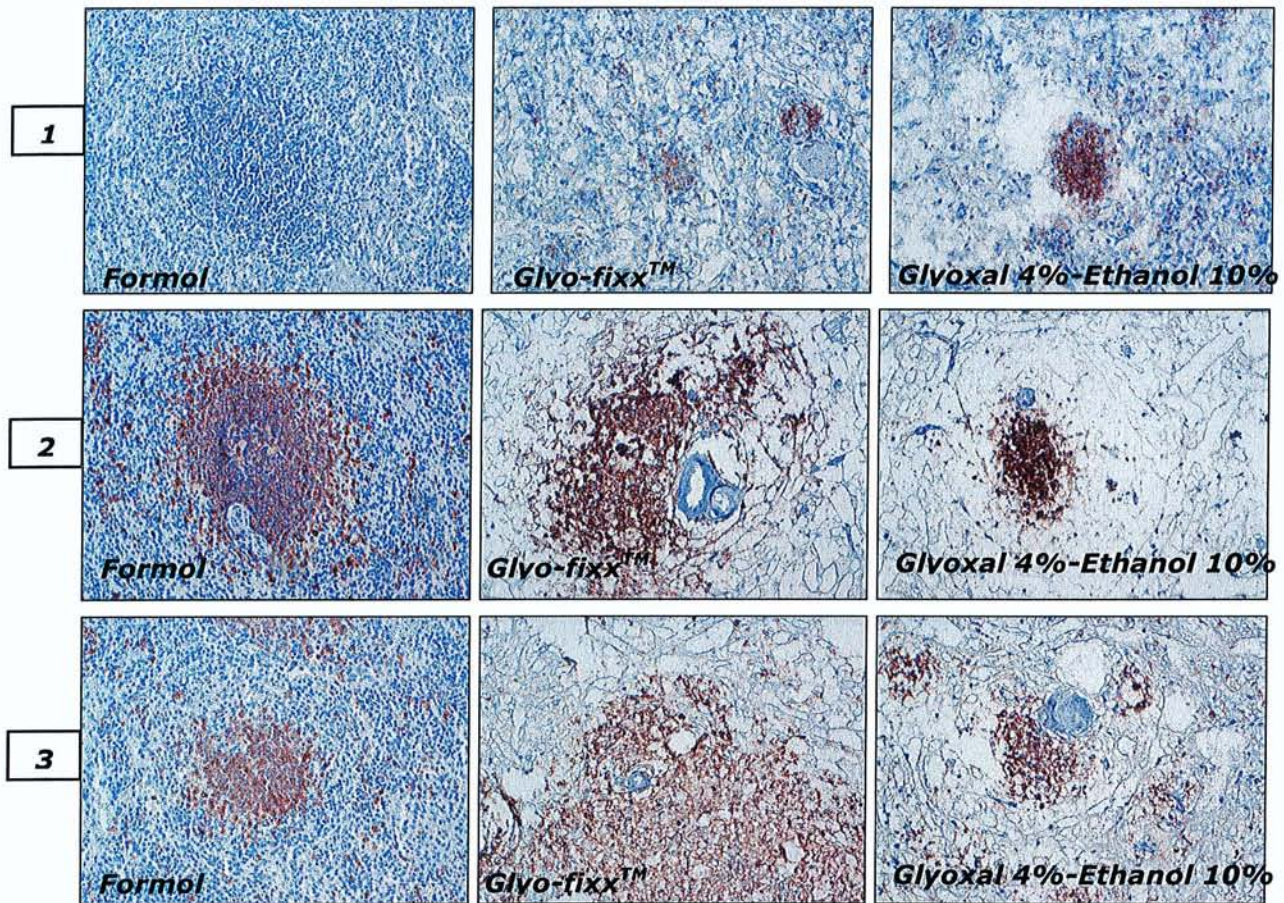


Figure 18 : Immunohistochimie sur la rate : exemple de l'anticorps anti-CD20 (x20)

1 : sans restauration antigénique (RA)

2 : pré-traitement en autoclave dans tampon EDTA pH8

3 : pré-traitement en autoclave dans tampon Tris HCl 0,01M pH 8,5

⇒ Formol : morphologie conservée ; très faible marquage sans RA ; marquage intense +++ après RA

⇒ Glyoxal : morphologie très altérée même sans RA, marquage membranaire ++ 'baveux'

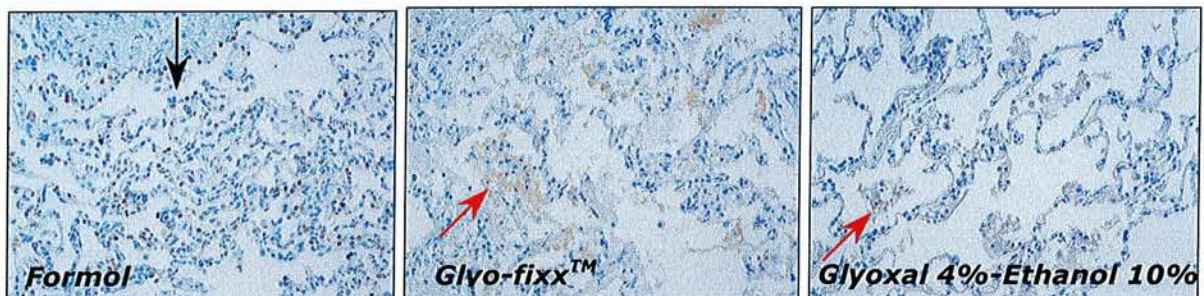


Figure 19 : Immunohistochimie sur le poumon : exemple du TTF1 (x20)

⇒ absence de marquage nucléaire sur les prélèvements fixés avec le glyoxal quelque soit le pré-traitement et la dilution de l'anticorps. Marquage nucléaire intense avec le formol (flèche noire)

⇒ présence de dépôts granuleux brunâtres sur les échantillons de poumon fixés avec le glyoxal (flèches rouges)

✓ **Localisation du signal**

Pour tous les prélèvements fixés au formol, aucun signal aberrant n'est constaté et la localisation du signal observé correspond toujours à celle attendue. Il n'en va pas de même après fixation au glyoxal. C'est ainsi que l'anticorps dirigé contre le collagène IV donne lieu à une coloration granulaire dans les cellules épithéliales du grêle et de la prostate, non observée après fixation formolique. Des constatations similaires sont faites avec l'anticorps Mib 1, qui donne lieu à un marquage cytoplasmique au niveau de rares cellules du grêle.

✓ **Artéfacts**

Concernant la biotine endogène, des artéfacts liés à sa présence sont constatés lors de la recherche de l'antigène nucléaire TTF1 au niveau de coupes issues des prélèvements thyroïdiens fixés à base de glyoxal et après pré-traitement, sous forme d'un marquage du cytoplasme de quelques cellules. Ces cellules, repérées sur la coloration HES, correspondent à des cellules oncocytaires. Le marquage cytoplasmique observé dans ces thyrocytes est en rapport avec la biotine endogène présente dans leurs cytoplasmes. Par ailleurs, quelques marquages cytoplasmiques non attendus sont observés au niveau de plusieurs organes (intestin grêle, sein, prostate) lors de la recherche d'expression de différents antigènes (Mib1, récepteurs aux oestrogènes et collagène IV). Ce marquage cytoplasmique ne correspond pas à celui de la biotine endogène et sa signification n'est pas clairement établie.

Enfin, alors qu'aucun pigment formolique n'est observé sur les coupes de tissus fixés au formol, plusieurs prélèvements fixés à l'aide de glyoxal présentent des précipités noirâtres, plus ou moins abondants, situés dans le cytoplasme de macrophages ou dans la matrice extra-cellulaire, déjà repérés sur les colorations standards HES et non biréfringents (figure 19).

✓ **Capacité d'adaptation de la technique**

Les techniques immunohistochimiques peuvent être adaptées en fonction de l'antigène recherché et en fonction du tissu. Il est ainsi possible de modifier soit le pré-traitement, soit la dilution de l'anticorps.

Plusieurs antigènes auraient pu faire l'objet de modifications techniques, notamment ceux pré-cités auparavant pour lesquels la technique appliquée s'est révélée moins sensible sur les prélèvements fixés à l'aide de glyoxal comparativement au formol, afin de savoir si des modifications dans les pré-traitements ou dans les concentrations

d'anticorps pourraient permettre d'obtenir des signaux meilleurs. Ceci représentant un travail considérable et sortant des objectifs de ce travail, seul l'antigène nucléaire TTF1 a fait l'objet de nombreuses adaptations techniques pour tenter de le mettre en évidence sur les prélèvements de poumon. En effet, pour cet antigène recherché de façon très courante en Anatomie Pathologique, aucune expression n'a pu être observée dans les conditions techniques initiales (pas de restauration antigénique, pré-traitement en autoclave avec les tampons EDTA et Tris HCl, à dilution de l'anticorps égale à 1/1600^{ème}), sur les prélèvements pulmonaire et thyroïdien fixés à l'aide de glyoxal. Ainsi, deux autres pré-traitements (Citrates pH6 et Tampon pH9,9) ont été réalisés. En outre, une gamme de dilution de l'anticorps de 1/1600^{ème} à 1/50^{ème} a été testée, en l'absence de restauration antigénique et après chacun des quatre pré-traitements appliqués (tableau 23). Alors que sur les prélèvements pulmonaires fixés au formol, hormis en l'absence de restauration antigénique, l'expression du TTF1 est observée avec les quatre pré-traitements testés et dès la dilution de l'anticorps au 1/1600^{ème}, aucune expression du TTF1 n'a été constatée sur les prélèvements fixés à l'aide de glyoxal quel que soit le pré-traitement ou la dilution (figure 19).

✓ **Stabilité antigénique des tissus dans les blocs**

Cette étude a pour but d'évaluer d'éventuels effets du glyoxal sur la conservation de l'antigénicité dans les blocs de paraffine. La comparaison avec l'étude immunohistochimique réalisée quatre mois auparavant, peu de temps après la fixation et l'inclusion en paraffine, ne montre pas de différence significative dans le marquage observé : les signaux sont similaires à conditions techniques identiques (pré-traitements et dilution de l'anticorps).

6. Hybridation in situ

Les techniques d'hybridation *in situ* à la recherche de cibles ADN sont réalisées depuis de nombreuses années à partir classiquement de tissus fixés à l'aide de fixateurs non pontants, tel que le liquide de Clarke. Dès 1988, ces techniques ont pourtant été adaptées avec de bons résultats aux tissus fixés au formol à 10% (v/v), après réalisation d'un pré-traitement des coupes à la chaleur humide et traitement enzymatique.

Nous avons donc testés ces techniques à la recherche de l'ADN nucléaire au sein de coupes de ganglion, de cœur, de poumon et de rein, fixés dans le Glyo-fixxTM et dans la solution glyoxal 4%-éthanol 10%, en comparaison avec des coupes des mêmes tissus fixés au formol 10% (v/v).

L'analyse des résultats a pris en compte l'intensité de la coloration nucléaire, le pourcentage de noyaux marqués et le respect de la morphologie.

Quel que soit l'organe étudié, le signal obtenu sur les coupes de tissu fixés dans le Glyo-fixx™ et dans le mélange glyoxal 4%-éthanol 10% est toujours de moins bonne qualité et moins intense que celui observé après fixation formolique, dans des conditions techniques strictement identiques avec notamment un temps égal de révélation.

La conservation de l'intégrité micro-anatomique est peu satisfaisante avec une morphologie le plus souvent fortement altérée : les noyaux marqués apparaissent rétractés, avec des contours nucléaires très irréguliers. De plus, le pourcentage de noyaux marqués est moins important que celui observé sur les tissus fixés au formol (figure 20). Dans un second temps, la réalisation de techniques d'hybridation avec une augmentation du temps de révélation pour les tissus fixés à l'aide de glyoxal a révélé une discrète augmentation du nombre de noyaux marqués et de l'intensité du signal. Cependant, la morphologie reste très altérée, avec des rétractions nucléaires importantes et des contours nucléaires très irréguliers.

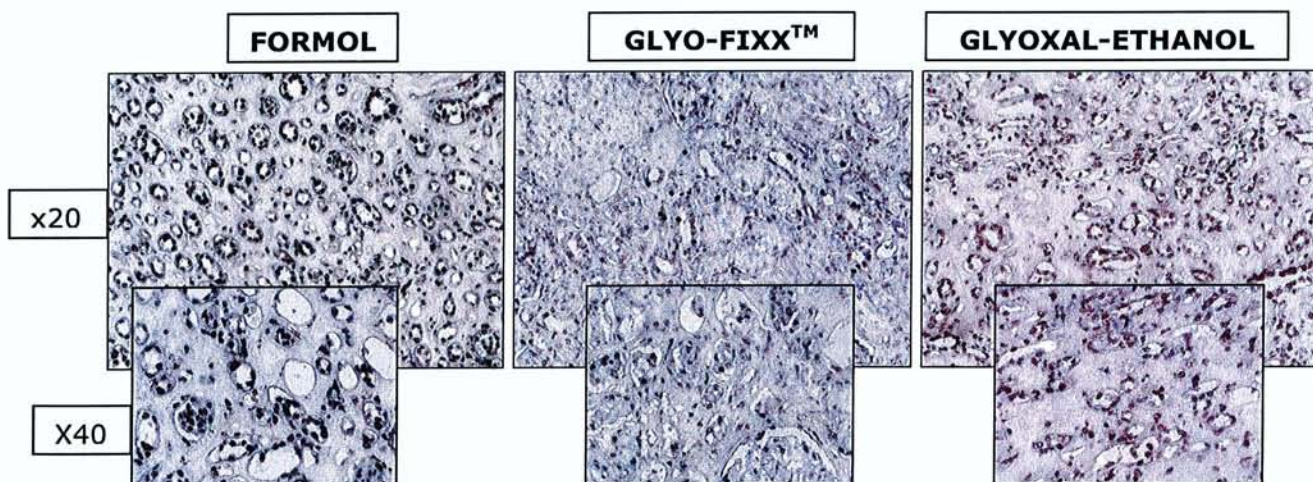


Figure 20 : Hybridation in situ : exemple du rein

⇒ Avec le formol : intense marquage nucléaire. Morphologie conservée.

⇒ Avec le glyoxal (Glyo-fixx™ et glyoxal-éthanol) : rares noyaux marqués. Morphologie nettement altérée.

7. Microscopie électronique

En microscopie à balayage, le glyoxal à 4% pH7 montre, au niveau des lymphocytes ganglionnaires, une perte de sphéricité peu importante avec de discrètes irrégularités de surface. Il a donc un comportement proche de celui du formol en terme de conservation de la forme, mais fournit des résultats inférieurs au glutaraldéhyde, qui est considéré comme le fixateur donnant les résultats ultrastructuraux les plus proches de la réalité *in vivo*. Avec le Glyo-fixx™, en revanche, les pertes moléculaires et les modifications de

forme sont beaucoup plus marquées qu'avec le formol ou le glyoxal : les cellules apparaissent affaissées et les faisceaux de collagène sont fusionnés (figure 21)

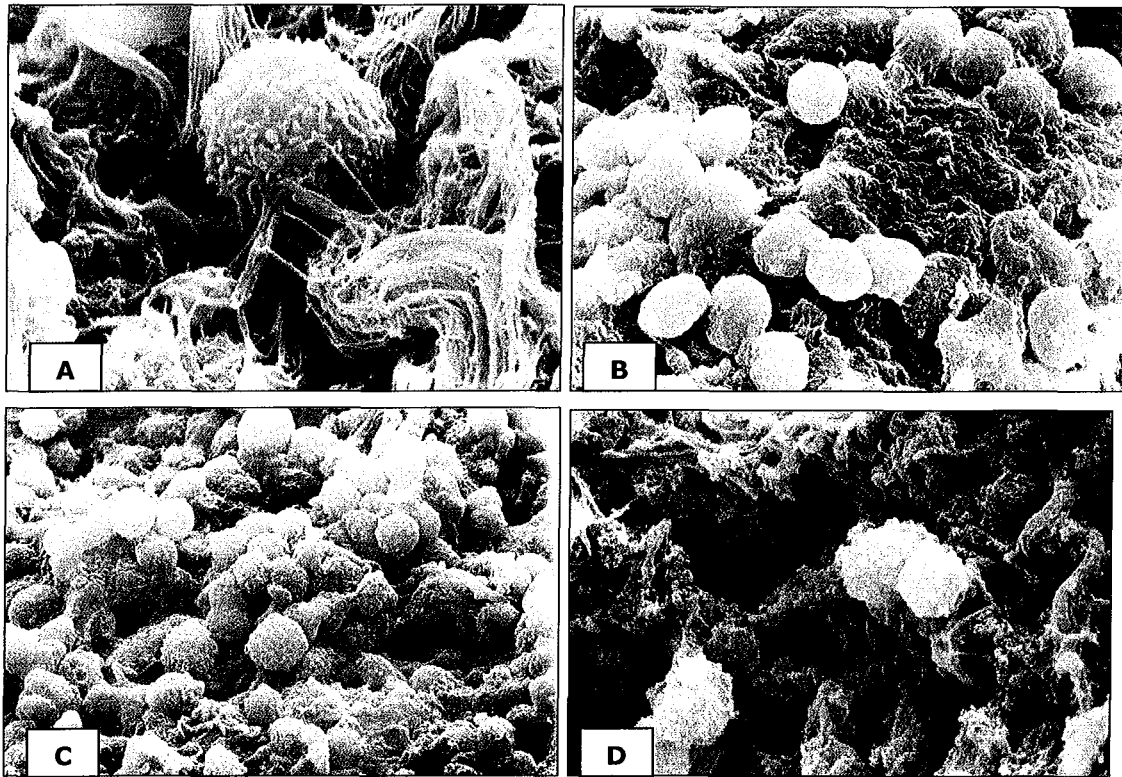


Figure 21 : Microscopie électronique à balayage : aspect des lymphocytes d'un parenchyme ganglionnaire avec différents fixateurs
Glutaraldéhyde (A), Formol (B), Glyoxal 4% pH7 (C) et Glyo-fixx™ (D)

Un fragment de ganglion est également examiné au microscope électronique à transmission, après fixation dans des solutions de glyoxal 4% à pH 4 et pH 7 et dans ces mêmes solutions additionnées d'éthanol 10%, ainsi que dans le Glyo-fixx™. Dans tous les cas, la conservation ultrastructurale est mauvaise, comparativement au glutaraldéhyde (figure 22). Les membranes plasmiques sont détruites, avec formation de corps myéliniques. Les organites intra-cytoplasmiques ne sont pas observés, à l'exception du réticulum endoplasmique parfois visible avec la solution de glyoxal 4%-éthanol 10% pH7. Les aspects des noyaux varient en fonction de la solution fixatrice : le niveau d'agrégation de la chromatine est le plus souvent grossière et s'accompagne parfois de vacuoles artéfactuelles. L'enveloppe nucléaire est inconstamment présente.

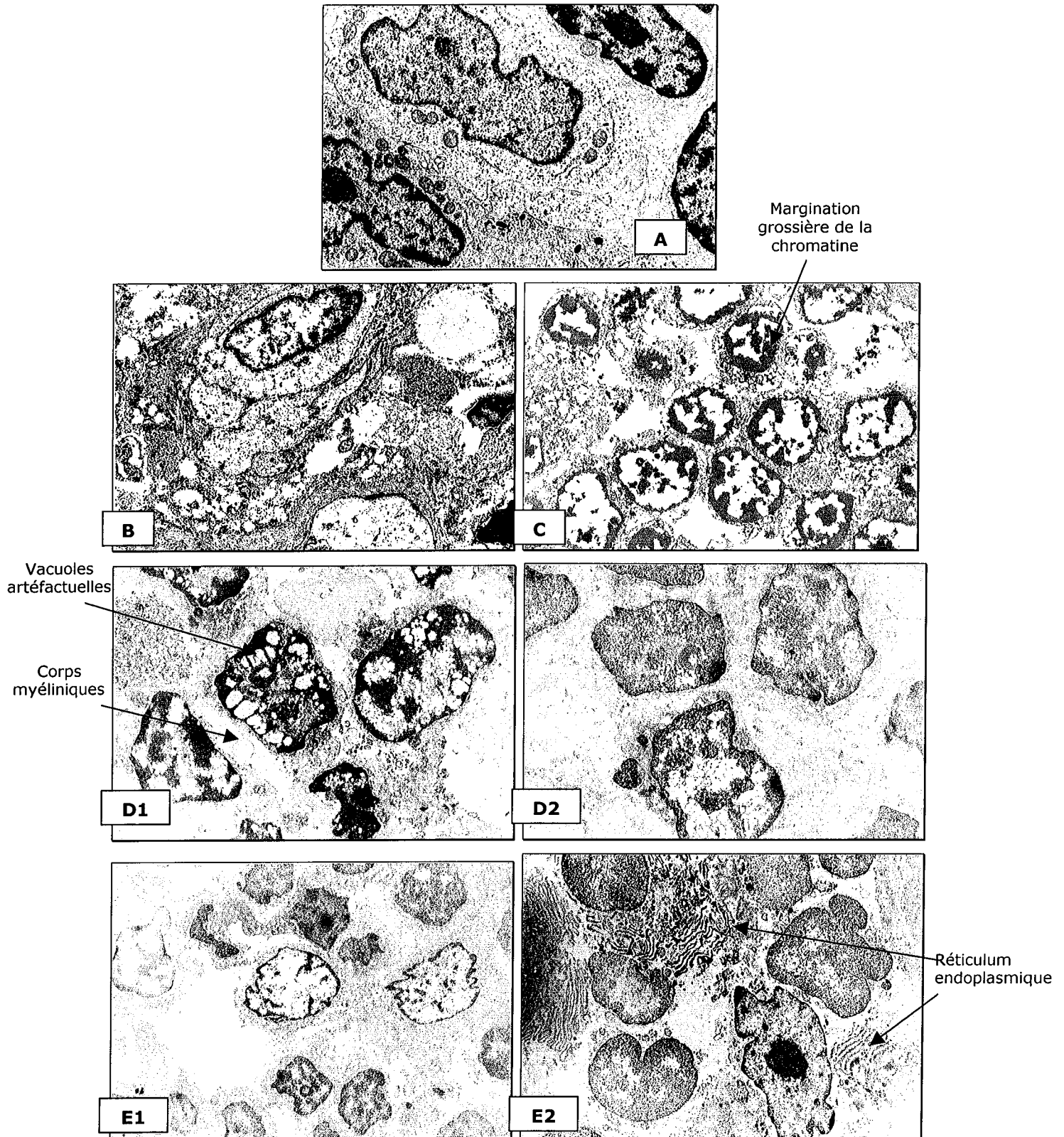


Figure 22 : Microscopie électronique à transmission : aspect des lymphocytes d'un parenchyme ganglionnaire avec différents fixateurs

Glutaraldéhyde (A), Formol (B), Glyo-fixx™ (C), Glyoxal 4% [pH4 (D1) ; pH7 (D2)], Glyoxal 4%-éthanol 10% [pH4 (E1) ; pH7 (E2)]

8. Biologie moléculaire

8.1. Analyse de l'ADN

La qualité de l'ADN peut être appréciée en estimant la taille maximale des séquences amplifiables par PCR à partir d'extraits d'ADN purifié. Dans notre travail, nous avons choisi d'amplifier des séquences d'ADN codant le récepteur des immunoglobulines. Les tailles des amplicons obtenus avec de l'ADN extrait de tissus congelés sont respectivement de 100, 200, 300, 400 et 600 paires de base. Dans notre travail, les profils électrophorétiques de l'ADN amplifié à partir d'échantillons fixés à l'aide de glyoxal (Glyo-fixxTM et mélange glyoxal 4%-éthanol 10%) sont comparés à ceux obtenus après amplification de l'ADN extrait d'échantillons de même nature fixés au formaldéhyde ou congelés.

L'ADN a tout d'abord été extrait d'échantillons de ganglion, de rein, de poumon et de cœur parvenus à l'état frais au laboratoire. Les concentrations d'ADN extrait pour chaque organe, en fonction de la fixation utilisée, estimées par spectrophotométrie, sont reportées dans le tableau 24, ainsi que la quantité totale d'ADN extrait, tous organes confondus, selon le type de fixation, donnée à titre indicatif dans le tableau 25.

ORGANES	FIXATEURS	CONCENTRATION ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	VOLUME ELUAT	QUANTITE TOTALE EXTRAITE (μg)
COEUR	Congélation	0,049	50 μL	2,45
	Formaldéhyde	-	50 μL	-
	Glyo-fixx TM	0,066	50 μL	3,3
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	-	50 μL	-
POUMON	Congélation	1,17	50 μL	58,5
	Formaldéhyde	0,21	50 μL	10,5
	Glyo-fixx TM	0,444	50 μL	22,2
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	0,486	50 μL	24,3
GANGLION	Congélation	1	50 μL	50
	Formaldéhyde	0,379	50 μL	18,95
	Glyo-fixx TM	1,33	50 μL	66,5
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	0,518	50 μL	25,9
REIN	Congélation	0,346	50 μL	17,3
	Formaldéhyde	-	50 μL	-
	Glyo-fixx TM	-	50 μL	-
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	0,077	50 μL	3,85

Tableau 24 : Concentrations ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pour chacun des 4 prélèvements de cœur, poumon, ganglion et rein selon leur fixation.

FIXATEURS	QUANTITE TOTALE EXTRAITE (μg)
Congélation	128,25
Formaldéhyde	29,45
Glyo-fixxTM	92
Glyoxal 4%-Ethanol 10%	54,05

Tableau 25 : ADN : quantité totale extraite, tous organes confondus (en μg)

La comparaison des différents électrophorégrammes obtenus permet les observations suivantes :

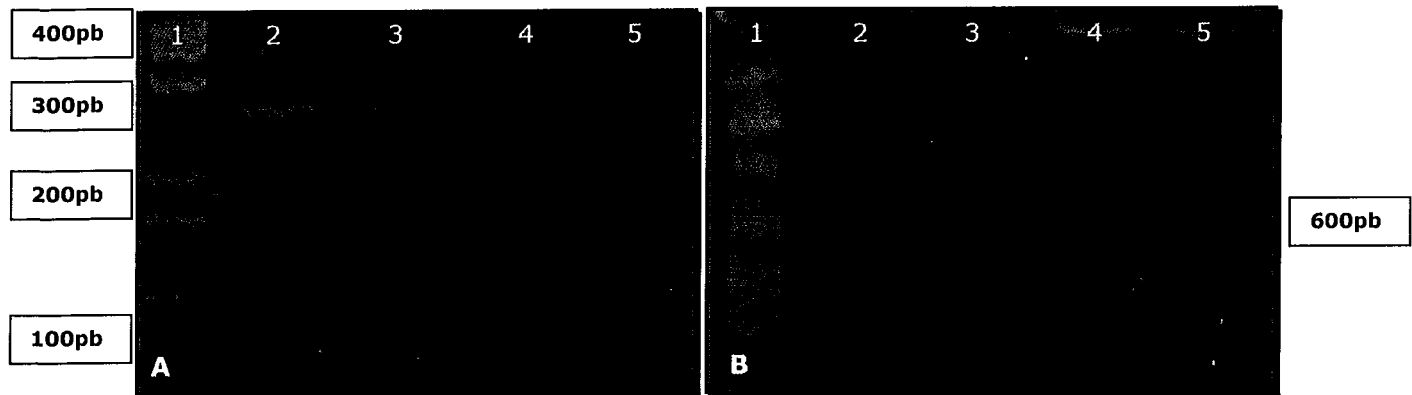
1) Le profil électrophorétique ne varie pas d'un organe à l'autre lorsque les conditions de fixation des échantillons sont identiques

2) La longueur des amplicons pour un même organe varie d'une condition de conservation à l'autre :

Observation (figure 23) :

- ✓ des bandes à 100, 200, 300, 400 et 600 pb pour les tissus congelés,
- ✓ des bandes à 100, 200, 300, et d'une faible bande à 600 pb pour les tissus fixés au formol,

- ✓ de la seule bande à 100 pb avec les tissus fixés au Glyo-fixx™ ou au mélange glyoxal 4%-éthanol 10%.



1 marqueur de taille ; 2 congélation, 3 formol, 4 Glyo-fixx™, 5 Glyoxal 4% Ethanol 10%

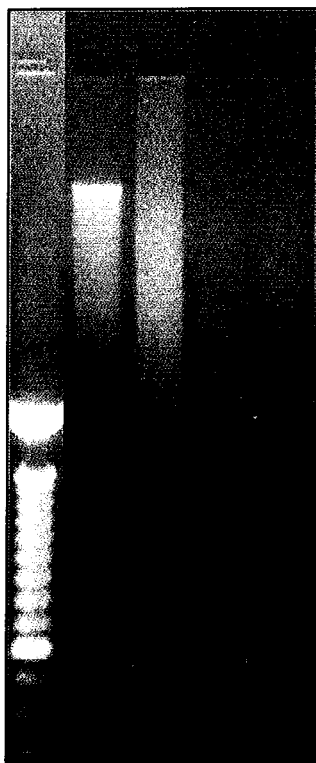
Figure 23 : PCR Biomed 2 – ganglion -

A : PCR n°1 : 100, 200, 300 et 400 pb

B : PCR n°2 : 600 pb

- ⇒ Formol -3- : présence de bandes à 100, 200, 300 pb [A] et 600pb [B].
- ⇒ Glyoxal -4 et 5- (Glyo-fixx™ et glyoxal-éthanol) : unique bande à 100pb [A].
- ⇒ Pour les échantillons congelés -2- : présence de bandes à 100, 200, 300, 400pb [A] et 600pb [B].

Ces données ont été confirmées par électrophorèse en gel d'agarose de l'ADN extrait des tissus fixés. Dans le cas d'un ADN de bonne qualité, non dégradé, nous observons un smear, correspondant à la présence de nombreux fragments d'ADN de taille variable, de petite à grande taille. C'est le cas des ADN extraits des tissus congelés (gel d'électrophorèse présenté figure 24). Dans le cas des ADN issus de tissus fixés au formaldéhyde, l'intensité du smear est moins marqué, notamment dans les tailles élevées. Pour les ADN extraits à partir de tissus fixés avec le Glyo-fixx™ ou le mélange glyoxal 4%-éthanol 10%, l'intensité est encore plus faible et uniquement dans des longueurs de fragments de petite taille, témoignant d'une dégradation importante de l'ADN.



1 marqueur de taille, 2 congélation, 3 formol, 4 Glyo-fixx™, 5 Glyoxal 4% Ethanol 10%

Figure 24 : Migration ADN total - ganglion -

8.2. Analyse de l'ARN

La première étape a consisté à extraire les ARN à partir des prélèvements des quatre tissus suivants, parvenus à l'état frais au laboratoire : ganglion, rein, poumon et cœur. Les concentrations d'ARN extrait pour chaque organe, en fonction de la fixation utilisée, calculées par mesure de l'absorbance par spectrophotométrie, sont reportées dans le tableau 26, ainsi que la quantité totale d'ARN extrait, tous organes confondus, selon le type de fixation, dans le tableau 27. Comme pour l'ADN, ces résultats sont donnés uniquement à titre indicatif.

ORGANES	FIXATEURS	CONCENTRATION ARN µg/µL	VOLUME ELUAT	QUANTITE TOTALE EXTRAITE (µg)
COEUR	Congélation	0,325	30 µL	9,75
	Formaldéhyde	0,128	30 µL	3,84
	Glyo-fixx™	0,0036	30 µL	0,108
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	0,04	30 µL	1,2
POUMON	Congélation	3,660	30 µL	109,8
	Formaldéhyde	0,151	30 µL	4,53
	Glyo-fixx™	0,001	30 µL	0,03
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	0,045	30 µL	1,35
GANGLION	Congélation	3,060	30 µL	91,8
	Formaldéhyde	0,063	30 µL	1,89
	Glyo-fixx™	0,143	30 µL	4,29
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	0,337	30 µL	10,11
REIN	Congélation	1,270	30 µL	38,1
	Formaldéhyde	-	30 µL	-
	Glyo-fixx™	-	30 µL	-
	Glyoxal 4%-Ethanol 10%	0,059	30 µL	1,77

Tableau 26 : Concentrations ARN en µg/ µL pour chacun des 4 prélèvements de cœur, poumon, ganglion et rein selon leur fixation.

FIXATEURS	QUANTITE TOTALE EXTRAITE (µg)
Congélation	249,45
Formaldéhyde	10,26
Glyo-fixx™	4,43
Glyoxal 4%-Ethanol 10%	14,43

Tableau 27 : ARN : quantité totale extraite, tous organes confondus (en µg)

Dans notre travail, la qualité des ARNm est appréciée par détermination de la répartition des tailles par analyse micro-capillaire. Les résultats ne varient pas d'un organe à l'autre, lorsque les conditions de conservation des échantillons sont identiques (figure 25).

- ✓ Les profils obtenus, concernant les échantillons non fixés, témoignent de la bonne qualité des ARNm extraits (R.I.N entre 7 et 8).
- ✓ En revanche, les ARNm extraits de tissus fixés, tant au formol qu'au Glyo-fixx™ ou au mélange glyoxal 4%-éthanol 10%, sont très altérés.
- ✓ Uniquement pour les ARN des prélèvements de cœur fixés à l'aide de Glyo-fixx™ ou du mélange glyoxal 4%-éthanol 10%, nous avons pu constater la présence de

deux bandes de très faible intensité sur le gel d'électrophorèse (figure 25) et de deux pics de très faible amplitude sur les électrophorégrammes correspondants (figure 26). La trop faible intensité de ces pics, pouvant éventuellement correspondre à des pics 28S et 18S, ne permet ni de conclure à une qualité satisfaisante des ARNs extraits, ni de calculer le critère de qualité R.I.N.

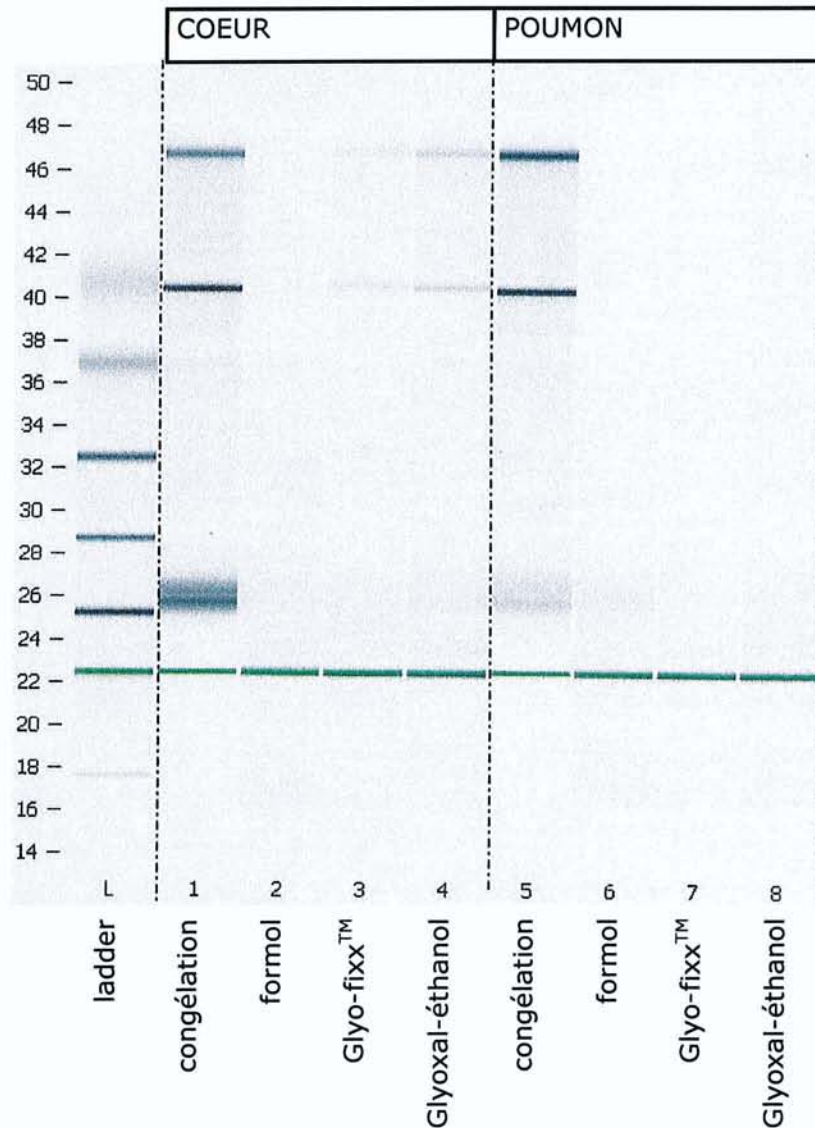


Figure 25 : Analyse sur Agilent de l'ARN extrait de prélèvements de cœur et de poumon : gel d'électrophorèse.

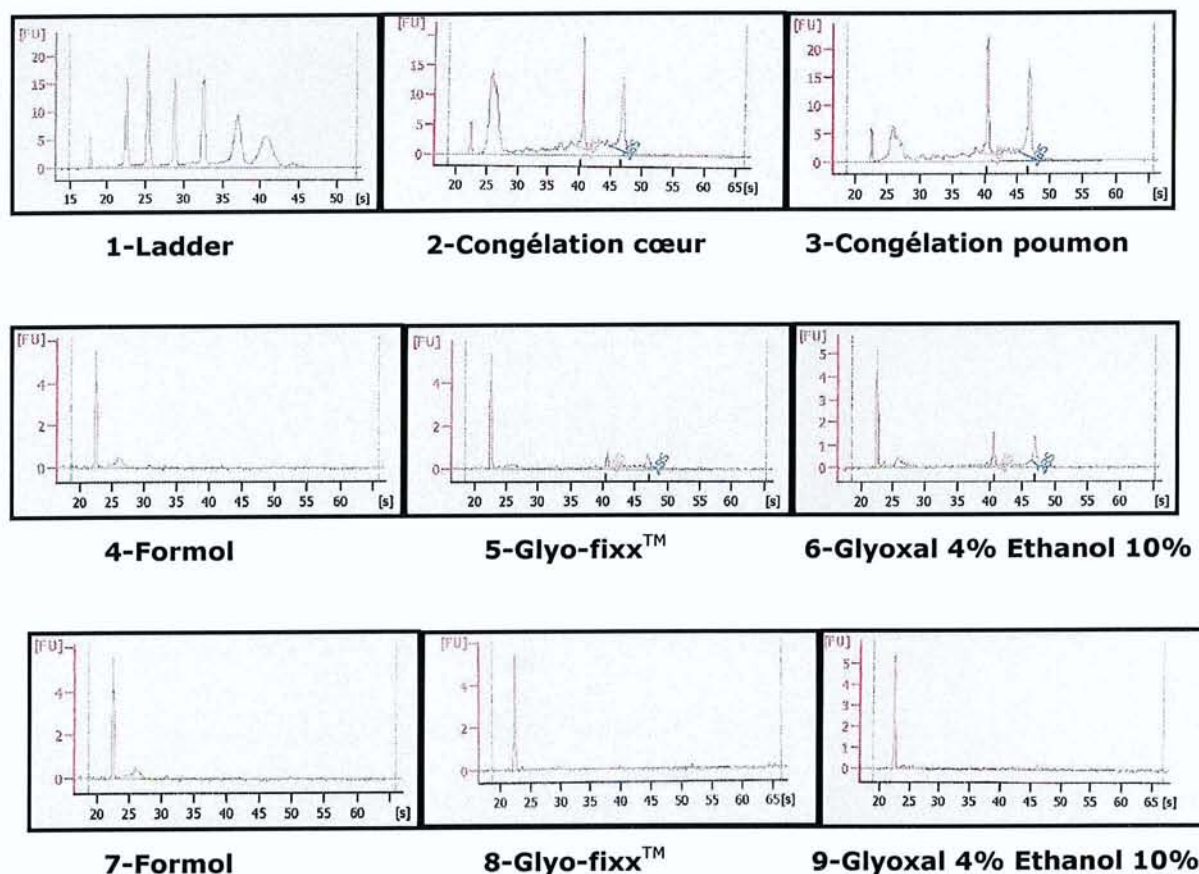


Figure 26 : Analyse sur Agilent de l'ARN : électrophorégrammes des échantillons de cœur et poumon

1-ladder, 2-3-congélation cœur et poumon, 4-5-6 cœur, 7-8-9 poumon

Cinquième partie : Discussion

Depuis son introduction en 1893, le formaldéhyde, sous la forme d'une solution de formol diluée au 1/10ème ou de celles de fixateurs composés de formules variées (plus de 200 formules publiées), est de très loin l'agent fixant le plus utilisé en histopathologie. C'est à partir de prélèvements fixés par des liquides à base de formaldéhyde qu'ont été établies les sémiologies macroscopiques et microscopiques d'une majorité de maladies et définis le plus grand nombre des paramètres pronostiques et prédictifs de la réponse thérapeutique. Utilisé en mélange avec des agents précipitants, la qualité des préparations histologiques, au niveau de la résolution de la microscopie photonique, est bonne. Le formaldéhyde est un bon agent de conservation permettant l'examen différé dans le temps des pièces opératoires. La réactivité du formaldéhyde avec les biopolymères a fait l'objet de très nombreux travaux. De nombreuses techniques d'analyse moléculaire *in situ* sur coupes histologiques (histochimie, histoenzymologie, immunohistochimie, hybridation *in situ*, etc) ou *ex situ* après extraction de macromolécules à partir d'échantillons fixés au formol et inclus dans de la paraffine ont été développées. Elles permettent l'étude de molécules spécifiques ou portent sur la composition globale des tissus (établissement de profils moléculaires). La fixation formolique est au moins pour partie réversible. De nombreux réactifs, notamment immunohistochimiques, ont été sélectionnés par l'industrie pour fonctionner sur des tissus fixés au formol. Un grand nombre d'agents pathogènes perdent leur caractère infectieux après fixation. Enfin, la fixation formolique n'est pas onéreuse. Le formaldéhyde n'est, cependant, pas un fixateur idéal. Il ne garantit pas une parfaite identité de la composition qualitative et quantitative d'un échantillon fixé à celle du même échantillon à l'état frais. Compte tenu de ce fait et parce que le Centre International de Recherche sur le Cancer a récemment classé le formaldéhyde comme cancérigène pour l'homme (catégorie 1), il paraît raisonnable de s'interroger sur la possibilité de lui substituer d'autres fixateurs et d'évaluer les conséquences de cet éventuel changement de référentiel sur la pratique diagnostique.

S'il s'avérait nécessaire de ne plus utiliser le formol et par là même de modifier le référentiel international, les pré-requis suivants devraient être satisfaits :

- 1) le risque sanitaire encouru lors de l'exposition au substitut est démontré inférieur à celui observé avec le formol. Les propriétés biocides du substitut sont connues.
- 2) la composition du fixateur est connue et les conditions de production sont telles que la constance de l'offre industrielle soit assurée. Dans le cas des produits commerciaux, il

convient, en effet, de se protéger de modifications cryptiques de formule ou de rupture de marché.

3) le fixateur est stable et ceci dans des gammes de température et d'humidité suffisantes pour que le fixateur puisse être utilisé sous des latitudes variées.

4) le fixateur et ses conditions d'utilisation n'entraînent pas une hausse excessive du coût de production de l'unité d'œuvre ou des modifications de pratique auxquelles les laboratoires ne pourraient s'adapter.

5) le fixateur est un bon agent de conservation permettant la dissection de pièces anatomiques après des délais de plusieurs mois voire plusieurs années tout en maintenant autant que faire se peut les couleurs initiales des tissus.

6) le fixateur diffuse rapidement dans les tissus ; la périphérie des échantillons une fois fixée ne constitue pas une gêne à la diffusion du fixateur vers le centre des prélèvements.

7) la qualité morphologique des préparations histologiques est au moins égale à celle obtenue avec les fixateurs composés à base de formol. Le degré de rétraction tissulaire n'est pas significativement différent de celui observé avec le formol (sinon des paramètres pronostiques comme la densité microvasculaire ou les indices mitotiques exprimés en nombre de mitoses par grand champ pourraient être modifiés).

8) les grandes lignes des interactions fixateur / biopolymères sont connues et les pertes macromoléculaires au cours de la fixation et de l'inclusion estimées. La fixation autorise la réalisation d'un ensemble de techniques complémentaires *in situ* et *ex situ* équivalente à celle rendue possible par l'emploi du formol, sans changements fondamentaux des référentiels diagnostiques, prédictifs et pronostiques.

9) les biomolécules des échantillons fixés et inclus dans de la paraffine sont stables, autorisant ainsi la création de banques tissulaires.

Si les offres de substituts sont nombreuses, les alternatives sont en fait limitées, les mécanismes élémentaires de la fixation n'étant qu'au nombre de trois. La fixation peut être réalisée par insolubilisation de molécules par réticulation macromoléculaire ou précipitation des macromolécules, avec ou sans dénaturation. Le troisième mécanisme

consiste dans le piégeage de molécules solubles dans un réseau macromoléculaire stabilisé par réticulation ou précipitation. La fixation par voie physique (la chaleur essentiellement) est rarement utilisée en histopathologie. La fixation par voie chimique fait appel à un nombre réduit de classes de réactifs dont la plupart sont connus depuis la fin du XIX^{ème} siècle. Les agents pontants sont principalement des aldéhydes ou des oxydants puissants, les précipitants des solvants organiques, des sels de cations divalents, des polyélectrolytes, des acides organiques, etc. Chaque classe est elle-même constituée d'un nombre variable de composés. C'est ainsi que des formules de fixateurs comportant les cations Hg^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , UO_2^{2+} et Zn^{2+} ont été proposées, chaque cation pouvant provenir de la dissociation de sels différents. Par exemple, Zn^{2+} peut être apporté sous forme de citrate, de trifluoroacétate, de tartrate ou d'isovalérate. Enfin, dans la mesure où : 1) deux éléments ou plus, de classes différentes, peuvent être mélangés (il existe des incompatibilités) ; 2) chaque composant d'un mélange peut apparaître à différentes concentrations, 3) le pH des liquides vecteur peut être ajusté à des niveaux variables, 4) la solution fixatrice peut contenir des additifs non fixants (sucrose, mercaptoéthanol, DMSO, etc.), les variations possibles sont quasiment infinies. De fait, dans son livre intitulé « The Microanatomist's Formulary and Guide », publié en 1954, P.Gray estime à plus de 600 les formules proposées. Depuis lors, chaque année, de nouveaux fixateurs sont mis sur le marché. Entre deux formules, les différences sont souvent minimes. Aucun n'a réussi à ce jour à se substituer au formol et l'immense majorité d'entre eux a disparu par sélection darwinienne.

Du fait d'une très faible pression de vapeur et de mécanismes de fixation **a priori** similaires à ceux du formaldéhyde, le glyoxal paraît en première analyse un substitut intéressant du formol. Il est cependant curieux de constater que, synthétisé 12 ans avant le formaldéhyde (1856), le glyoxal n'a été utilisé en histologie que 70 ans après ce dernier (Sabatini et al 1963, Janigan 1965, Pearse 1968). A cette époque, le glyoxal était considéré comme un bon fixateur histochimique, mais un fixateur microanatomique plutôt mauvais. Le premier fixateur commercial contenant du glyoxal comme unique ingrédient actif est mis sur le marché en 1993 (Prefer, Anatech Ltd, Battle Creek, Mi). D'autres mélanges à base de glyoxal ont depuis été commercialisés, tels que Glyo-fixxTM (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA), Excell Plus (Microm), Histochoice (Amresco, Solon, Ohio), Preserve (Electron Microscopy Science), Glyofix (Shandon Lipshaw).... Dans tous les cas, ces fixateurs à base de glyoxal, sont composés, avec des formules variables, dans lesquelles les parts respectives de chaque composant ne sont pas connues. Nous avons constaté dans nos travaux initiaux, que le glyoxal à 4% pH7 était un mauvais fixateur histologique, ne permettant pas une bonne conservation de la micro-anatomie. L'ajout d'un faible pourcentage d'éthanol (10%) et l'acidification de la solution (pH4)

permettent l'obtention de meilleurs résultats. Ces conditions d'utilisation du glyoxal, définies au préalable dans notre travail, sont équivalentes à celles décrites par Dapson [66].

✓ **Risques et dangerosité du substitut**

Avant de choisir un éventuel substitut, il est nécessaire de démontrer que le risque sanitaire encouru lors de son utilisation est inférieur à celui observé avec le formol. Comme nous l'avons rappelé ci-dessus, le glyoxal est allergisant et pour cette raison, en voie de substitution dans certaines industries, notamment dans les secteurs de fabrication des savons, des détergents et des produits d'entretien [3]. Aucun effet cancérogène n'est rapporté chez l'homme mais les études en ce domaine sont peu nombreuses. Les seules VLEP définies pour le glyoxal sont inférieures à celles retenues pour le formol (0,1 mg/m³ versus 0,37 mg/m³). Les précautions à prendre lors de l'utilisation de ce dialdéhyde doivent donc être aussi rigoureuses que celles mise en oeuvre pour le formol.

La biocidie des fixateurs alternatifs a fait l'objet de peu de travaux [70][71]. Le développement d'une colonie de champignons dans un conteneur quatre semaines après l'immersion d'une pièce opératoire dans un volume de fixateur suffisant atteste de la faiblesse des propriétés antiseptiques de ce dialdéhyde, constatation cohérente avec ses faibles capacités fixatrices.

En revanche, le risque chimique encouru lors de son utilisation est moindre.

✓ **Diffusion et cinétique**

La cinétique des interactions entre le formol ou le glyoxal et les macromolécules tissulaires n'est pas identique. Il est, en effet, tout à fait remarquable de noter que le glyoxal à 4 ou 10% pH 7,4, ainsi que le Glyo-fixxTM, ne précipitent pas la gélatine, ni ne gélifient la solution en 48 heures, alors que le formaldéhyde à 10% pH 7,4 donne naissance en deux heures trente à un gel très homogène. Le glyoxal a cependant interagi avec la gélatine, puisque la solution devient brunâtre, traduisant le développement d'une réaction de Maillard. La faible réactivité du glyoxal ne s'explique pas par la composition de la gélatine en arginine, qui n'est pas particulièrement faible.

La lenteur des interactions glyoxal-macromolécules tissulaires explique probablement la mauvaise conservation ultrastructurale, car le paramètre diffusion du fixateur n'intervient pas.

Le processus de fixation peut être divisé en deux phases. Pendant la première phase, le fixateur pénètre le tissu par diffusion en s'accumulant à une concentration suffisante pour que la deuxième phase, la phase réelle de fixation ou de stabilisation, commence. Pénétrés par un fixateur aldéhydique, les organes colorés comme le foie deviennent blanchâtres. La ligne de démarcation entre le fixé et le non fixé est nette et régulière. Il paraît donc possible d'obtenir des informations sur la vitesse de diffusion de ces fixateurs en appréciant l'épaisseur des territoires décolorés d'échantillons de dimensions identiques immergés dans les fixateurs étudiés pendant des durées progressivement croissantes. Dans notre travail, nous avons souhaité valider la méthode en démontrant par une technique au miroir d'argent l'excellente correspondance existant entre les volumes de diffusion du formol et du glyoxal d'une part et les étendues correspondantes de la décoloration des pièces macroscopiques d'autre part. Cette étude nous a permis toutefois de constater que les deux fixateurs migrent plus rapidement le long des structures canalaire (canaux biliaires, artères ou veines porte, hépatiques ou centrolobulaires) à l'origine de petites plages blanc-jaunâtres au sein des territoires 'non fixés', pouvant être interprétés de façon erronée comme des territoires stéatosiques. La capsule de Glisson ne constitue pour aucun des deux fixateurs un obstacle à la diffusion. Mesurée à la 24^{ème} heure, la pénétration du glyoxal au sein du parenchyme hépatique est beaucoup plus faible que celle du formaldéhyde, ce qui est logique puisque le flux moléculaire est inversement proportionnel à la masse moléculaire. Il est, en effet, nécessaire de tenir compte du fait que les aldéhydes en solution aqueuse sont fortement hydratés (> 99,9% pour le formaldéhyde). Le glyoxal dans l'eau existe sous des formes variées, dont la plus abondante est le dimère cyclique, 1-3 dioxolane, dont la masse moléculaire (Mr 80) est presque deux fois plus élevée que celle du méthylol, forme hydratée du formaldéhyde (Mr 48) [72]. Apprécié par la technique du miroir d'argent, le gradient de concentration du formaldéhyde en fonction de la profondeur dans les tissus est faible alors qu'elle est abrupte avec le glyoxal. Les autres différences, à savoir une accumulation de groupements aldéhydiques au niveau des fibres grillagées du foie dans le cas du glyoxal et au niveau des noyaux dans le cas du formaldéhyde n'ont pas d'explications simples.

Nous n'avons pas l'expérience d'une accélération de la diffusion et d'une stimulation de la réactivité chimique du glyoxal par la chaleur (micro-ondes). Energy Beam Sciences (EBS) rapporte de bons résultats morphologiques et immunohistochimiques après une fixation d'une durée inférieure à deux heures avec son fixateur Prefer [73]. Une pré-fixation de

trente minutes à température ambiante, précédant l'application des micro-ondes est recommandée avec Preserve™ (EBS), Prefer (Anatech) et Glyo-fixx™ (Thermo Shandon). La température à laquelle les échantillons doivent être fixés n'est pas clairement établie. EBS recommande une fixation à température ambiante. Dapson conteste les résultats d'une analyse comparative de substituts du formol peu flatteuse pour le glyoxal [74], au motif que les auteurs de l'étude n'ont pas fixé les échantillons à la température recommandée de 4°C. En fait, la température de fixation est rarement définie dans les notices techniques et la fixation à 4°C est peu adaptée à la pratique anatomopathologique de routine.

En raison des caractéristiques de diffusion et de réactivité du glyoxal, on peut s'attendre à une stabilisation lente des tissus, avec une inhibition retardée des activités enzymatiques et une activité biocide incomplète. Le glyoxal et les fixateurs composés à base de glyoxal ne peuvent donc être des conservateurs de pièces anatomiques ou d'échantillons de grande taille. Ils peuvent, en revanche, éventuellement, être adaptés à la fixation d'échantillons de petit volume.

✓ ***Chimie des interactions formaldéhyde-protéines et glyoxal-protéines***

La fixation des tissus résulte principalement d'interactions entre les molécules du fixateur et les protéines de l'échantillon. Dans le cas d'une fixation au formaldéhyde, les conséquences sur les protéines sont principalement les suivantes : 1) Une insolubilisation de beaucoup de protéines hydrosolubles par la réticulation intra et intermoléculaire, qui se traduit au cours des techniques histologiques par : a) leur rétention mais également par celle d'autres macromolécules hydrosolubles par piégeage dans le réseau tridimensionnel formé par la fixation, b) une diminution de leur propriété de rétention d'eau qui va de pair avec une augmentation de leur hydrophobicité et une réduction de leur propriété de mouillabilité, c) enfin, par une résistance accrue aux attaques chimiques et enzymatiques; 2) Un abaissement de leur point isoélectrique; 3) Une limitation de flexibilité conformationnelle entraînant une élévation de la température de dénaturation thermique, liée essentiellement au développement du pontage intracaténaire; 4) Une altération ou un blocage de sites réactifs entraînant des modifications des propriétés biologiques (perte ou gain d'antigénicité, perte de toxicité, d'activités enzymatiques, etc). L'inhibition de ces différentes propriétés peut être dissociée ou partielle. Les sites protéiques ou peptidiques intervenant dans les réactions avec le formaldéhyde sont les groupements NH₂ terminaux et les fonctions polaires des chaînes latérales des acides aminés, c'est-à-dire les groupements amine, guanidyle, hydroxyle, thiol et les noyaux

indole, imidazole et phénol. Les mécanismes réactionnels sont alors gouvernés par la réactivité relative de ces différents groupements et les conditions du milieu. L'ensemble des résultats acquis indique l'intervention prédominante des résidus lysine. La réactivité de cet acide aminé s'explique par les propriétés chimiques propres de la fonction amine mais également par sa position à l'extrémité d'un bras butyl ammonium oscillant relativement long [4 résidus méthylène-(CH₂)₄], qui la rend accessible. Les groupements thiol des protéines, facilement oxydés, ne jouent probablement qu'un rôle limité dans la fixation des protéines *in situ*. La réaction est équilibrée et donc potentiellement réversible. Le taux de conversion des fonctions amine primaire *in vitro* varie de 3 à 22 % en fonction de la séquence de la protéine. La réduction des groupes hydroxyméthyle par le formaldéhyde et la condensation de l'acide formique, produit de l'auto oxydation du formaldéhyde présent dans les solutions non tamponnées sur les groupements amine, peuvent conduire respectivement à la formation de dérivés méthylés et N-formylés hydrophobes. Un petit nombre de groupements hydroxyméthyle subissent une déshydratation conduisant à la formation de groupements imine très réactifs (bases de Schiff). La réaction de déshydratation est maximale à pH 4-5. Si les conditions stériques sont favorables (la longueur de la liaison est de 2 Å), les groupes imine sont le sujet d'une attaque par un autre nucléophile avec formation de ponts intra ou intermoléculaires. Les plus fréquents sont les ponts méthyléniques R-CH₂-R'. Ces derniers se développent toujours aux dépens de chaînes latérales de nature chimique différente (groupement amine primaire dans un premier temps, puis interaction avec d'autres résidus d'acide aminé tel que l'arginine, l'asparagine, la glutamine, l'histidine et le tryptophane dans un deuxième temps). Elles peuvent également impliquer des groupes amine primaire de macromolécules non protéiques comme les acides nucléiques. Les ponts diméthyléther (R-CH₂-O-CH₂-R') sont beaucoup moins nombreux. Bien que monofonctionnel, le formaldéhyde est donc un puissant agent de couplage, pouvant induire la formation de ponts intra ou inter-moléculaires (Annexe 9) [75].

Le corpus de connaissance sur les mécanismes de la fixation des protéines par le glyoxal est plus limité. Un fait aujourd'hui bien établi est leur dépendance du pH. Le glyoxal ne se comporte comme un agent réticulant qu'à un pH très alcalin. A pH 10, comme le formaldéhyde, il réagit principalement avec les résidus lysine pour donner des ponts éthyléniques acido résistants. A pH physiologique ou en milieu acide, les propriétés fixatrices du glyoxal font intervenir principalement les groupements guanidyle de l'arginine avec formation d'adduits dihydroxyimidazolidines et hydroimidazolones (Annexe 9) [60]. Ces réactions d'addition sont sélectives dans leur topographie et ne touchent pas les différents résidus d'une même protéine de façon identique. Il n'y a pas de formation de ponts inter et intramoléculaires.

✓ **Conséquences d'une fixation au glyoxal sur la morphologie, l'immunohistochimie et les acides nucléiques**

▪ *Conservation de l'intégrité micro-anatomique*

La préservation de la qualité micro-anatomique est primordiale tant en histologie standard que pour la réalisation de techniques complémentaires. Notre travail démontre que, tous organes et tous paramètres confondus, la conservation de la morphologie sur des coupes colorées à l'hématoxyline éosine safran est moins bonne après fixation au glyoxal qu'après fixation formolique. Des variations, cependant, sont observées en fonction des organes et des paramètres étudiés. C'est ainsi, par exemple, qu'après fixation au glyoxal, la morphologie de la prostate et du cœur est bien conservée et que les scores attribués aux caractéristiques nucléaires et à la qualité des lymphocytes, bien qu'inférieurs à ceux obtenus avec le formol, correspondent souvent à une qualité acceptable. Les variations d'un organe à l'autre ne sont pas expliquées. En ce qui concerne les noyaux, il est probable que leur bonne visibilité s'explique par un effet « éthanol », l'alcool du fixateur composé, en induisant une margination de la chromatine le long de l'enveloppe nucléaire, facilite en effet la reconnaissance des contours des noyaux.

De plus, certaines caractéristiques des tissus fixés au glyoxal constituent une gêne considérable au diagnostic :

- la difficile reconnaissance des hématies. Celles-ci perdent, en effet, leur classique forme biconcave et apparaissent vidées de leur contenu, alors que les membranes plasmiques sont conservées. Si la présence de globules rouges dans la lumière des vaisseaux peut être estimée, leur reconnaissance en position extravasculaire devient impossible. Dapson attribue cette difficile visibilité à une lyse érythrocytaire induite par l'acidité de la solution fixatrice. Ceci n'est probablement pas exact dans la mesure où les globules rouges sont aisément reconnus dans les coupes de tissus fixés au liquide de Bouin. Quelqu'en soit le mécanisme, la mauvaise visualisation des hématies peut poser des difficultés dans tous les cas où leur observation est nécessaire au diagnostic (purpura, syndrome d'activation macrophagique...).

- la non ou très faible coloration des granulations des éosinophiles tant en coloration ordinaire qu'après coloration de Giemsa, gênant fortement leur reconnaissance, alors même qu'une accumulation focale d'éosinophiles est un symptôme morphologique essentiel de nombreuses maladies inflammatoires ou tumorales. Cette perte de coloration

serait une conséquence de la réaction imidazolée survenant entre le glyoxal et le groupe guanidium de l'arginine [66]. Un mécanisme de même nature pourrait expliquer la difficile reconnaissance des cellules de Paneth.

- la perte du fer de l'hémosidérine observée au niveau de deux échantillons hépatiques probablement secondaire à la libération du fer de ses complexes formés avec les protéines, en raison du pH acide. On peut rapprocher de ce fait la dissolution partielle des micro calcifications rapportée par Umlas *et al* au niveau des cancers du sein [76].

Nos résultats sont concordants avec ceux de Preto en 1997 [74] et de Titford en 2005 [77], mais contredisent pour partie les affirmations de Dapson qui rapporte de bons résultats avec le glyoxal [66]. Il convient ici de rappeler que ce dernier est le président de la société qui commercialise le fixateur Prefer (Anatech).

- *Conservation de l'antigénicité*

L'immunohistochimie est aujourd'hui indispensable au diagnostic morphologique. Dans notre travail, nous n'avons pas cherché à savoir si des antigènes non détectés après fixation formolique le sont dans les tissus fixés au glyoxal. En revanche, nous avons montré, qu'à conditions identiques, la sensibilité des techniques immunohistochimiques est moindre avec le glyoxal et que certains épitopes, notamment nucléaires, ne sont pas détectés, même après réalisation des pré-traitements recommandés par les fabricants. Nous n'avons pu détecter TTF1 malgré l'essai de quatre modalités de pré-traitements différents et avec des gammes de dilutions allant de 1/1600^{ème} à 1/50^{ème}. Des résultats équivalents sont rapportés dans la littérature, notamment une difficulté de détection des récepteurs hormonaux dans les carcinomes mammaires [76].

- *Effets sur les acides nucléiques*

La réactivité du formaldéhyde avec les acides nucléiques a fait l'objet de nombreux travaux. Le formaldéhyde est connu pour pouvoir réagir avec les groupes amine primaire exocycliques des bases d'une part, ainsi qu'avec les groupes imine endocycliques de celles ne comportant pas de fonction amine primaire d'autre part, pour donner des adduits hydroxyméthyle [78]. Un préalable à la réaction d'addition sur les groupements imine serait la déprotonation de ces derniers, d'où l'influence, dans ce cas, du pH. Les

constantes d'équilibre des réactions d'addition avec les groupements imine sont cinq fois plus basses que celles observées avec les amines primaires. La température influence les vitesses de réaction, mais intervient également sur l'étendue de ces dernières, puisque les constantes d'équilibre dépendent de la température. Par exemple, si, à une concentration donnée d'adénine en solution à +20°C, 50% des adénines ont réagi, ce chiffre tombe à 20% quand la réaction est réalisée à +100°C. Plusieurs variétés de dimères dont les bases sont reliées par des ponts méthyléniques ont pu être identifiées. Les mécanismes incriminés dans leur formation sont les mêmes que ceux décrits pour les protéines, c'est-à-dire la formation réversible d'un dérivé imine protoné peu stable, suivie de la formation d'un pont méthylénique. Il exerce ainsi une action dénaturante faible, mise à profit pour la séparation électrophorétique des ARN en fonction de leur masse moléculaire, de façon indépendante de leur conformation. Le développement de pont intercaténaire avec l'ADN en solution ne peut se développer que si ce dernier est dénaturé. Les réactions d'addition sur les bases font, en effet, intervenir les groupements fonctionnels amine primaire ou imine qui participent, par ailleurs, à la formation des liaisons hydrogène stabilisant la double hélice. Ces liaisons doivent être rompues pour que les réactions d'addition puissent se développer. Par ailleurs, l'attaque des nucléophiles sur le carbonyle du formaldéhyde se fait selon un angle optimum de 107°. Ceci n'est possible qu'après dénaturation, l'empilement des bases dans les molécules non dénaturées exerçant un effet d'encombrement stérique significatif. Le formaldéhyde et le méthanol présent dans une majorité des solutions de formol par leur capacité de déstabilisation des liaisons hydrogène peuvent participer à la dénaturation de la double hélice. Lors de la fixation, les adduits de formaldéhyde sur la molécule d'ADN et les ponts intercaténaux ne se forment que lentement, lorsque la fixation est réalisée à température ambiante du laboratoire. Le traitement de nucléohistones par du formaldéhyde se traduit par la formation de complexes où les interactions protéines/ADN ne sont plus simplement ioniques comme dans les nucléohistones natives. L'existence d'une réticulation ADN / histones est indiquée par le fait qu'après traitement par la pronase de tels complexes fixés, 4% des protéines de départ sédimentent avec l'ADN lors de centrifugation en gradient de CsCL [79]. Ce pourcentage correspond à un acide aminé pour chacune des quatre bases. Les histones H1 sont les plus aisément pontées à l'ADN. Pour une durée de fixation identique et une concentration identique de fixateur, les pontages ADN / protéines sont mis à profit lors des techniques d'immunoprécipitation chromatiniennne [80]. Enfin, il a récemment été montré que les étapes de déshydratation qui suivent la fixation sont délétères pour l'ADN. L'éthanol transforme les adduits hydroxyméthyle en adduits éthoxyméthyle, avec dépurination irréversible et fragmentation.

Les phénomènes d'encombrements stériques jouent un rôle moins important pour l'ARN. La sensibilité des ribonucléosides aux attaques électrophiles n'est pas identique [81]. Dans le cas d'octamères homopolymériques synthétiques Ra8, Ru8, Rg8 et Rc8, incubés *in vitro* pendant 16 heures dans du formol à 10% (v/v), le taux de conversion varie de 40% pour l'adénine à 4% pour l'uracyl. Des adénines subissent une dimérisation. Des modifications identiques sont observées dans le cas d'ARN extraits de tissus fixés *in vivo*. Dans ce cas, cependant, les modifications paraissent moins nombreuses. Puisque les adénines sont les bases les plus sensibles aux attaques électrophiles, il est probable que les ARNm soient les plus intensément modifiés. Cette hypothèse est compatible avec l'observation que la négativité d'une technique d'hybridation *in situ* à l'aide de sondes poly T sur des coupes de tissus fixés au formol ne témoigne pas obligatoirement de l'hydrolyse des ARNm et ne permet pas de prédire l'échec de l'hybridation avec une sonde complémentaire d'une cible ARNm spécifique.

Dans la mesure où le glyoxal réagit avec les mêmes groupements fonctionnels que le formaldéhyde et forme des adduits similaires (si ce n'est la formation d'imidazole à partir de l'arginine), une analyse rapide pourrait conduire à penser que la qualité des acides nucléiques extraits de tissus fixés avec ces deux fixateurs est similaire. Le glyoxal est cependant un meilleur dénaturant et, du fait de cette propriété, est couramment utilisé pour détruire les structures secondaires et tertiaires des ARN dans les techniques de Northernblot. Il est, de plus, nécessaire de tenir compte de l'acidité des solutions de glyoxal à l'origine d'une hydrolyse chimique d'une part et de la lenteur de diffusion tissulaire et de la cinétique de réaction de ce fixateur avec les protéines à l'origine d'une hydrolyse enzymatique par inhibition retardée des activités ADNasiques et ARNasiques d'autre part. Ceci explique vraisemblablement la fragmentation de l'ADN observée dans notre travail, avec absence d'amplification de fragments de taille supérieure à 100pb à partir de l'ADN extrait de tissu fixé au glyoxal, qui s'avère donc impropre aux études moléculaires. Des résultats similaires de non amplification des cibles ADN des cellules lymphoïdes B et T sont rapportés dans la littérature avec le fixateur Prefer (Anatech) [82].

A notre connaissance, aucune étude systématique des effets du glyoxal sur la faisabilité de l'hybridation *in situ* n'a été publiée. Les données de la littérature sont fragmentaires et se limitent à des constatations d'échecs [83][84]. Notamment, dans une revue générale récente, Suzuki rapporte l'expérience d'une perte totale des ARN [85]. Par ailleurs, Tubbs *et al* signalent une impossibilité quasiment constante d'évaluer le statut Her2 dans les cancers du sein par FISH [82]. Dans les rares cas où un signal était observé, ce dernier

était faible et l'analyse souvent gênée par une auto-fluorescence des préparations, phénomène que nous avons également constaté.

Notre travail confirme ces rares données retrouvées dans la littérature sur la faisabilité des techniques d'hybridation sur des prélèvements fixés à partir de glyoxal. Notre étude a consisté à comparer les résultats d'hybridation ADN-ADN réalisée sur des coupes de tissus divers, fixés soit au formol, soit au glyoxal 4%-éthanol 10% pH4, soit dans du Glyo-fixxTM. Les hybridations obtenues dans des conditions identiques de réalisation se sont constamment révélées de qualité moindre tant en terme d'intensité du signal que de conservation de la micro anatomie. Une prolongation du temps de révélation de l'activité phosphatasique n'a pas amélioré le signal. Les explications possibles sont multiples. Il ne s'agit probablement pas d'une inhibition de l'hybridation par modification des acides nucléiques ou d'une réticulation trop intense. L'hypothèse d'une hydrolyse des acides nucléiques cibles par des DNases ou RNases incomplètement inhibées du fait de la lenteur de diffusion et de cinétique de réaction et d'une hydrolyse chimique due au pH acide paraît la plus vraisemblable.

Conclusion

Le classement du formaldéhyde dans la catégorie des cancérigènes pour l'homme stimule la recherche de fixateurs alternatifs moins dangereux, mais dont les propriétés seraient au moins équivalentes à celles du formol. Le glyoxal, dialdéhyde présentant une très faible pression de vapeur, paraît en première analyse un substitut intéressant. Il est utilisé par plusieurs laboratoires aux Etats-Unis et en France.

Notre étude démontre, cependant, que le glyoxal ne peut prétendre au statut de substitut du formaldéhyde en tant que fixateur polyvalent pour l'anatomie pathologique et que sa généralisation conduirait à un bouleversement des standards diagnostiques actuellement définis par la communauté internationale. Il est, en particulier, nécessaire d'insister sur les points suivants :

1. Potentiellement moins toxique en raison d'une pression de vapeur faible, le glyoxal n'est cependant pas dénué de toute nocivité. Les risques 'Cancérogènes, Mutagènes ou Reprotoxiques' encourus par les professionnels sont peu étudiés. Parce que la valeur limite d'exposition professionnelle définie pour le glyoxal est basse (0,1 mg/m³), les mesures de protection collective et individuelle réglementaires à mettre en œuvre pour son emploi sont similaires à celles exigées pour le formol.
2. La composition des substituts commercialisés à base de glyoxal est tenue secrète exposant ainsi la communauté des pathologistes à la survenue de modifications cryptiques de formule ou de rupture de marché.
3. Le remplacement du formol par une solution à base de glyoxal entraîne un surcoût, en raison d'une part du prix élevé des substituts commercialisés (un litre de GlyofixxTM revient à 14,21€ HT, un litre de glyoxal 4% à 69,70€ HT, alors que le prix d'un litre de formol tamponné à 10% est de 4,20€ HT) et des coûts, difficilement estimables, liés à la nécessaire adaptation des techniques. De plus, comme nous l'avons dit précédemment, les laboratoires ne pourraient faire l'économie d'une installation de systèmes de protection pour le personnel exposé (installation de sorbonnes ou captages inducteurs disposés au niveau de la source d'émission de pollution...).
4. La lenteur de la cinétique de diffusion et du processus de réaction explique que le glyoxal soit un mauvais conservateur des pièces anatomiques. Il se révèle aussi un piètre biocide. Il peut être utilisé pour les biopsies de petit volume.

5. La morphologie est inégalement conservée et des repères essentiels au diagnostic sont perdus (mauvaise détectabilité des hématies, des éosinophiles et des cellules de Paneth, perte du fer et dissolution de microcalcifications).
6. En dépit d'affirmations de fabricants, de nombreux antigènes sont mal détectés en l'absence de pré-traitements. Ces derniers entraînent parfois des altérations majeures de la micro-anatomie. Même après pré-traitements, certains antigènes sont mal détectés (récepteurs hormonaux) ou non détectables (TTF1). Les acides nucléiques sont mal conservés rendant impossibles les techniques d'hybridation *in situ* et l'extraction de ces molécules à partir de tissus fixés.

Au total, notre travail conduit à penser que les conséquences pour les patients d'un changement de référentiel au profit du glyoxal seraient sans commune mesure avec les risques associés à l'utilisation du formol qui, rappelons le, sont faibles.

Références bibliographiques

1. Bonnard N., Falcy M., Pasquier E., Protois J.C., *Aldéhyde formique et solutions aqueuses*. Fiche toxicologique FT7 INRS., 2006.
2. Vincent R., *Caractérisation de l'exposition professionnelle au formaldéhyde en France*. 2007, INRS, Centre de Lorraine.
3. Vincent R., *Inventaire des agents chimiques CMR utilisés en France en 2005*. INRS - Hygiène et sécurité au travail - Cahiers de notes documentaires, 2006. 205: p. 83-96.
4. Arts J. H., Rennen M. A., de Heer C., *Inhaled formaldehyde: evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity*. Regul Toxicol Pharmacol, 2006. 44(2): p. 144-60.
5. International Agency for Research on Cancer, I.A.R.C., *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxy-2-propanol*. 2006: Lyon.
6. Monticello T.M., Miller F.J., Morgan K.T., *Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subchronic inhalation of formaldehyde*. Toxicol Appl Pharmacol, 1991. 111(3): p. 409-21.
7. Monticello T.M., Swenberg J.A., Gross E.A., Leininger J.R., Kimbell J.S., Seilkop S., Starr T.B., Gibson J.E., Morgan K.T., *Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells*. Cancer Res, 1996. 56(5): p. 1012-22.
8. Binetti R., Costamagna F.M., Marcello I., *Development of carcinogenicity classifications and evaluations: the case of formaldehyde*. Ann Ist Super Sanita, 2006. 42(2): p. 132-43.
9. International Agency for Research on Cancer, I.A.R.C., *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Wood dust and formaldehyde*. 1995: Lyon.
10. Hauptmann M., Lubin J.H., Stewart P.A., Hayes R.B., Blair A., *Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries*. Am J Epidemiol, 2004. 159(12): p. 1117-30.
11. Pinkerton L.E., Bloom T.F., Hein M.J., Ward E.M., *Mortality among a cohort of uranium mill workers: an update*. Occup Environ Med, 2004. 61(1): p. 57-64.

12. Coggon D., Harris E.C., Poole J., Palmer K.T., *Extended follow-up of a cohort of british chemical workers exposed to formaldehyde*. J Natl Cancer Inst, 2003. 95(21): p. 1608-15.
13. Olsen J.H., Jensen S.P., Hink M., Faurbo K., Breum N.O., Jensen O.M., *Occupational formaldehyde exposure and increased nasal cancer risk in man*. Int J Cancer, 1984. 34(5): p. 639-44.
14. Vaughan T.L., Strader C., Davis S., Daling J.R., *Formaldehyde and cancers of the pharynx, sinus and nasal cavity: I. Occupational exposures*. Int J Cancer, 1986. 38(5): p. 677-83.
15. Vaughan T.L., S.P.A., Teschke K., Lynch C.F., Swanson G.M., Lyon J.L., Berwick M., *Occupational exposure to formaldehyde and wood dust and nasopharyngeal carcinoma*. Occup Environ Med, 2000. 57(6): p. 376-84.
16. Roush G.C., Walrath J., Stayner L.T., Kaplan S.A., Flannery J.T., Blair A., *Nasopharyngeal cancer, sinonasal cancer, and occupations related to formaldehyde: a case-control study*. J Natl Cancer Inst, 1987. 79(6): p. 1221-4.
17. West S., Hildesheim A., Dosemeci M., *Non-viral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in the Philippines: results from a case-control study*. Int J Cancer, 1993. 55(5): p. 722-7.
18. Armstrong R.W., Imrey P.B., Lye M.S., Armstrong M.J., Yu M.C., Sani S., *Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: occupational exposures to particles, formaldehyde and heat*. Int J Epidemiol, 2000. 29(6): p. 991-8.
19. Hildesheim A., Dosemeci M., Chan C.C., Chen C.J., Cheng Y.J., Hsu M.M., Chen I.H., Mittl B.F., Sun B., Levine P.H., Chen J.Y., Brinton L.A., Yang C.S., *Occupational exposure to wood, formaldehyde, and solvents and risk of nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001. 10(11): p. 1145-53.
20. Collins J.J., Acquavella J.F., Esmen N.A., *An updated meta-analysis of formaldehyde exposure and upper respiratory tract cancers*. J Occup Environ Med, 1997. 39(7): p. 639-51.
21. Coglianò V.J., Grosse Y., Baan R.A., Straif K., Secretan M.B., El Ghissassi F., *Meeting report: summary of IARC monographs on formaldehyde, 2-*

- butoxyethanol, and 1-tert-butoxy-2-propanol*. Environ Health Perspect, 2005. 113(9): p. 1205-8.
22. Marsh G.M., Youk A.O., *Reevaluation of mortality risks from nasopharyngeal cancer in the formaldehyde cohort study of the National Cancer Institute*. Regul Toxicol Pharmacol, 2005. 42(3): p. 275-83.
 23. Marsh G.M., Youk A.O., Morfeld P., *Mis-specified and non-robust mortality risk models for nasopharyngeal cancer in the National Cancer Institute formaldehyde worker cohort study*. Regul Toxicol Pharmacol, 2007. 47(1): p. 59-67.
 24. Duhayon S., Hoet P., Van Maele-Fabry G., Lison D., *Carcinogenic potential of formaldehyde in occupational settings: a critical assessment and possible impact on occupational exposure levels*. Int Arch Occup Environ Health, 2008. 81(6): p. 695-710.
 25. Hayes R.B., Blair A., Stewart P.A., Herrick R.F., Mahar H., *Mortality of U.S. embalmers and funeral directors*. Am J Ind Med, 1990. 18(6): p. 641-52.
 26. Collins J.J., *Formaldehyde exposure and leukaemia*. Occup Environ Med, 2004. 61(11): p. 875-6.
 27. Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail, A.F.S.S.E.T., *Rapport du groupe de travail Afsset "Valeurs Guide de qualité d'Air Intérieur"*. 2007.
 28. Office of Environmental Health Hazard Assessment, O.E.H.H.A., *Determination of Acute Reference Exposure Level for Airborne Toxicants. Acute Toxicity Summary. Formaldehyde*. 1999.
 29. Office of Environmental Health Hazard Assessment, O.E.H.H.A., *Determination of Chronic reference Exposure Level for Airborne Toxicants. Chronic Toxicity Summary. Formaldehyde*. 1999.
 30. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, A.T.S.D.R., *Toxicological Profile for Formaldehyde*. U.S Department of Health and Human Services. Public Health Service. 1999.
 31. Baker J. R., *Fixation in cytochemistry and electron-microscopy*. J Histochem Cytochem, 1958. 6(5): p. 303-8.

32. Gerston K.F., Blumberg L., Tshabalala V.A., Murray J., *Viability of mycobacteria in formalin-fixed lungs*. Hum Pathol, 2004. 35(5): p. 571-5.
33. Metropol, INRS, *Aldéhydes Fiche 001/V01/01*. 2007.
34. National Institute for Occupational Safety and Health, N.I.O.S.H., *Formaldehyde: method 3500*, in *Manual of Analytic Methods*. 1994.
35. Jargot D., Castel B., Hecht C., Langlois E., *Evaluation et comparaison des systèmes utilisés pour le prélèvement et le dosage des aldéhydes dans l'air*. INRS - Hygiène et sécurité au travail - Cahiers de notes documentaires, 2007. 1er trimestre 2007: p. 17-27.
36. Vincent R., Kauppinen T., Toikkanen J., Pedersen D., Young R., Kogevinas M., *CAREX, Système international d'information sur l'exposition professionnelle aux agents cancérigènes en Europe*. INRS - Cahiers de Notes Documentaires 1999. 176: p. 49-58.
37. *Direction de l'animation de la recherche des études et des statistiques. DARES. Les expositions aux risques professionnels. Les produits chimiques. Résultats SUMER 2003*. 2006. 118.
38. Vincent R., Jeandel B., *COLCHIC-occupational exposure to chemical agents database: current content and development perspectives*. Appl Occup Environ Hyg, 2001. 16(2): p. 115-21.
39. Vincent R., Jeandel B., *Exposition professionnelle au formaldéhyde en France: informations fournies par la base de données COLCHIC*. INRS - Hygiène et sécurité au travail - Cahiers de notes documentaires, 2006. 203: p. 19.
40. Ying C.J., Yan W.S., Zhao M.Y., Ye X.L., Xie H., Yin S.Y., Zhu X.S., *Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class*. Biomed Environ Sci, 1997. 10(4): p. 451-5.
41. Koda S., Kumagai S., Ohara H., *Environmental monitoring and assessment of short-term exposures to hazardous chemicals of a sterilization process in hospital working environments*. Acta Med Okayama, 1999. 53(5): p. 217-23.
42. Saternus K.S., Kernbach-Wighton G., *On the contamination of ambient air by preparations carried out with a band-saw*. Forensic Sci Int, 1999. 104(2-3): p. 163-71.

43. Burgaz S., Cakmak G., Erdem O., Yilmaz M., Karakaya A. E., *Micronuclei frequencies in exfoliated nasal mucosa cells from pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde*. Neoplasma, 2001. 48(2): p. 144-7.
44. Vaz E., Rebuffaud J., Malandin J., Proust B., *Exposition du personnel aux vapeurs de formaldéhyde*. Journal de médecine légale droit médical, 2001. 44(7-8): p. 552-556.
45. Sari-Minodier I., Orsière T., Auquier P., Pompili J., Gelin C., Patellis C., Gagazian G., François N., Botta A., *Le test des micronoyaux dans l'évaluation du risque mutagène: étude auprès de 10 salariés exposés au formaldéhyde*. Arch. mal. prof, 2001. 62(2): p. 75-82.
46. Shaham J., Gurvich R., Kaufman Z., *Sister chromatid exchange in pathology staff occupationally exposed to formaldehyde*. Mutat Res, 2002. 514(1-2): p. 115-23.
47. Shaham J., Bomstein Y., Gurvich R., Rashkovsky M., Kaufman Z., *DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde*. Occup Environ Med, 2003. 60(6): p. 403-9.
48. Proietti L., Sandona P.B., Longo B., Gulino S., Duscio D., *[Occupational exposure to formaldehyde at a service of pathologic anatomy]*. G Ital Med Lav Ergon, 2002. 24(1): p. 32-4.
49. Perdelli F., Spagnolo A.M., Cristina M.L., Sartini M., Dalleria M., Ottria G., Orlando P., *[Occupational exposure to formaldehyde in three pathology departments]*. Ann Ig, 2006. 18(6): p. 481-90.
50. Ghasemkhani M., Jahanpeyma F., Azam K., *Formaldehyde exposure in some educational hospitals of Tehran*. Ind Health, 2005. 43(4): p. 703-7.
51. Yousefi V., *Formaldehyde levels in embalmers and personnel in anatomy and pathology departments*. S Afr Med J, 1998. 88(9): p. 1056.
52. Shaham J., Bomstein Y., Melzer A., Ribak J., *DNA-Protein Crosslinks and Sister Chromatid Exchanges as Biomarkers of Exposure to Formaldehyde*. Int J Occup Environ Health, 1997. 3(2): p. 95-104.
53. Orsiere T., Sari-Minodier I., Iarmarcovai G., Botta A., *Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes*. Mutat Res, 2006. 605(1-2): p. 30-41.

54. Orsiere T., Sari-Minodier I., Iarmarcovai G., Botta A., *Risque génotoxique et exposition au formaldéhyde en laboratoire d'anatomo-pathologie: métrologie atmosphérique et biogénotoxicologie*. Arch. mal. prof. env, 2006. 67(4): p. 617-625.
55. Goyer N., Bégin D., Beaudry C., Bouchard M., Carrier G., Lavoué J., Noisel N., Gérin M., *Guide de prévention-Le formaldéhyde en milieu de travail*, IRSST, Editor. 2006.
56. *Décret n°2001-97 du 1er février 2001 établissant les règles particulières de prévention des risques cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR)*. 2001.
57. *Décret n°2003-1254 du 23 décembre 2003 relatif à la prévention du risque chimique et modifiant le code du travail*. 2003.
58. *Circulaire n°12 DRT du 24 mai 2006 relative aux règles générales de prévention du risque chimique et aux règles particulières à prendre contre les risques d'exposition aux agents cancérogènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction*. 2006.
59. Bonnard N., Clavel T., Falcy M., Hesbert A., Jargot D., Protois J.C., Schneider O., *Glyoxal et solutions aqueuses*. FICHE TOXICOLOGIQUE FT229 INRS, 2005.
60. Cotham W.E., Metz T.O., Ferguson P.L., Brock J.W., Hinton D.J., Thorpe S.R., Baynes J.W., Ames J.M., *Proteomic analysis of arginine adducts on glyoxal-modified ribonuclease*. Mol Cell Proteomics, 2004. 3(12): p. 1145-53.
61. Kielhorn J., Pohlenz C., Schmidt S., Mangelsdorf I., *Glyoxal. Concise international chemical assessment document; 57*. World Health Organization Geneva, 2004.
62. Aalto-Korte K., Makela E.A., Huttunen M., Suuronen K., Jolanki R., *Occupational contact allergy to glyoxal*. Contact Dermatitis, 2005. 52(5): p. 276-81.
63. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, A.C.G.I.H., *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices 2004*. 2004.
64. Janigan D.T., *The effects of aldehyde fixation on acid phosphatase activity in tissue blocks*. J Histochem Cytochem, 1965. 13(6): p. 476-83.

65. Dapson R., *Effects of fixation on routine, special and immunohistochemical stains: introduction to a symposium for the Biological Stain Commission*. Biotech Histochem, 2007: p. 1-2.
66. Dapson R.W., *Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval*. Biotech Histochem, 2007. 82(3): p. 161-6.
67. van Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuurin E., Garcia-Sanz R., van Krieken J.H., Droese J., Gonzalez D., Bastard C., White H.E., Spaargaren M., Gonzalez M., Parreira A., Smith J.L., Morgan G.J., Kneba M., Macintyre E.A., *Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936*. Leukemia, 2003. 17(12): p. 2257-317.
68. Bonnardel P., *Le Coefficient Kappa.*, http://kappa.chez-alice.fr/Kappa_fleiss.htm.
69. Stroup N.E., Blair A., Erikson G.E., *Brain cancer and other causes of death in anatomists*. J Natl Cancer Inst, 1986. 77(6): p. 1217-24.
70. Cleary T.J., Morales A.R., Nadji M., Nassiri M., Vincek V., *Antimicrobial activity of UMFix tissue fixative*. J Clin Pathol, 2005. 58(1): p. 22-5.
71. Vardaxis N.J., Hoogeveen M.M., Boon M.E., Hair C.G., *Sporicidal activity of chemical and physical tissue fixation methods*. J Clin Pathol, 1997. 50: p. 429-433.
72. Whipple Earl B., *The structure of glyoxal in water*. Journal of American Chemical Society, 1970. 92(24): p. 7183-7186.
73. Energy Beam Sciences, *The Microwave Companion for Histology*, P. McArdle, Editor. 2006.
74. Preto P., Lyon H., *Commercial formalin substitutes for histopathology*. Biotech Histochem, 1997. 72(5): p. 273-82.
75. Plénat F., Antunes L., Haller T., Piet-Ounnoughene M., Klein-Monhoven N., Champigneulle J., Chenal P., Bland V., Garcia-Pimenta F., Labouyrie E., *La fixation formolée à l'aube du troisième millénaire*. Ann Pathol, 2001. 21(1): p. 29-47.

76. UmLas J., Tulecke M., *The effects of glyoxal fixation on the histological evaluation of breast specimens*. Hum Pathol, 2004. 35(9): p. 1058-62.
77. Titford M.E., Horenstein M.G., *Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology*. Arch Pathol Lab Med, 2005. 129(4): p. 502-6.
78. Plénat F., Montagne K., Weinbreck N., Corby S., Champigneulle J., Antunes L., Bonnet C., Maire C., Monhoven N., *Les conséquences moléculaires de la fixation et de l'inclusion : exemple des acides nucléiques et des protéines*. Ann Pathol, 2006. 26(1): p. 8-21.
79. Brutlag D., Schlehuber C., Bonner J., *Properties of formaldehyde-treated nucleohistone*. Biochemistry, 1969. 8(8): p. 3214-8.
80. Kuras L., *Characterization of protein-DNA association in vivo by chromatin immunoprecipitation*. Methods Mol Biol, 2004. 284: p. 147-62.
81. Masuda N., Ohnishi T., Kawamoto S., Monden M., Okubo K., *Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples*. Nucleic Acids Res, 1999. 27(22): p. 4436-43.
82. Tubbs R.R., Hsi E.D., Hicks D., Goldblum J., *Molecular pathology testing of tissues fixed in prefer solution*. Am J Surg Pathol, 2004. 28(3): p. 417-9.
83. Yaziji H., Gown A.M., *Testing for HER-2/neu in breast cancer: is fluorescence in situ hybridization superior in predicting outcome?* Adv Anat Pathol, 2002. 9(6): p. 338-44.
84. Dako, *Special Issue: IHC, Standardization*. Connection, 2007. 10.
85. Suzuki I., Motokawa T., *In situ hybridization: an informative technique for pigment cell researchers*. Pigment Cell Res, 2004. 17(1): p. 10-4.
86. Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. 7: p. 3.

Annexes

ANNEXE 1**Etude rétrospective non publiée sur la place du formol dans la littérature**
(N. Marcon)

Afin d'apprécier le « poids » du formaldéhyde en Anatomie Pathologique, une étude bibliographique rétrospective a été menée à partir de revues médicales spécialisées. Les revues analysées relèvent essentiellement de l'anatomie pathologique, clinique et expérimentale (15 revues) et pour certaines de médecine spécialisée, telle que la dermatologie, la néphrologie, la neurologie (5 revues).

Les différents fixateurs, cités dans les paragraphes 'Matériels et méthodes' de chaque article d'une revue donnée sur une période donnée ont été répertoriés. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

REVUES	PERIODE	FIXATEURS (NOMBRE)	FIXATEURS AVEC FORMOL		FIXATEURS SANS FORMOL		Détails fixateurs avec FORMOL													Détails fixateurs sans FORMOL			
			NBR	%	NBR	%	F	B	A	BH	DB	B5	IBF	Sch	St	K	M	Fe	Z	C	GF	Autres	
ANNALES DE PATHOLOGIE	2000-2007	77 (4)	77	100	0	0	62	8	6		1												
AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY	2006-2007	181(3)	181	100	0	0	178	2			1												
	2002	100 (4)	100	100	0	0	94	3		1		2											
HISTOPATHOLOGY	2006-2007	91 (2)	91	100	0	0	90		1														
	2002	75 (4)	75	100	0	0	70	2		1		2											
MODERN PATHOLOGY	2005-2007	81 (3)	81	100	0	0	78	2				1											
	2004	122 (5)	120	98,5	2	1,5	109	8	2		1								2				
HUMAN PATHOLOGY	2007	20 (1)	20	100	0	0	20																
	2002	15(2)	14	93	1	7	14															1*	
VIRCHOWS ARCHIVES	2000-2007	197 (12)	192	97,5	5	2,5	172	7	4			3		2	2	1	1		2	1		2**	
DIAGNOSTIC PATHOLOGY	2006-2007	25 (1)	25	100	0	0	25																
JOURNAL OF PATHOLOGY	2000-2007	50 (2)	50	100	0	0	49	1															
PATHOLOGY CASE REVIEWS	2000-2007	34 (1)	34	100	0	0	34																
PATHOLOGY INTERNATIONAL	2000-2007	635 (4)	635	100	0	0	629	2	1			3											
CYTOPATHOLOGY	2000-2007	73 (4)	71	97,5	2	2,5	65	2	4											2			
DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY	2001-2007	171 (8)	166	97,5	5	2,5	152	8	2			3	1							2	2	1***	
EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY	2002-2007	148 (1)	148	100	0	0	148																
ARCHIVES OF PATHOLOGY AND LABORATORY MEDICINE	2000-2007	752 (11)	746	99	6	1	699	15		5		26	1						1		1	4****	
JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY	2006-2007	162 (2)	162	100	0	0	160	2															
	2002	58 (2)	58	100	0	0	57		1														
IMMUNOLOGY	2000-2007	120 (4)	120	100	0	0	108	1	1			10											
AMERICAN JOURNAL OF DERMATOPATHOLOGY	2000-2007	232 (3)	232	100	0	0	227	4				1											
JOURNAL OF AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY	2005-2007	138 (4)	137	99	1	1	127	9										1		1			
KIDNEY INTERNATIONAL	2006-2007	150 (6)	137	91	13	9	125	9	1		2								1	12			
JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY	1990-2006	16 (2)	16	100	0	0	15	1															
TOTAL		3723 (23)	3688	99%	35	1%	3507	86	23	7	5	51	2	2	2	1	1	1	6	18	3	8	

Fixateurs avec Formol : F Formol ; B Bouin ; A AFA ; BH Bouin Hollande ; DB Duboscq-Brasil ; B5 fixateur B-5 ; IBF fixateur IBF ; Sch Solution de Schaefer ; St Solution de Stieve ; K fixateur de Karnovsky ; M Méthacrylate ; Fe fixateur de Feketes

Fixateurs sans Formol : Z : Solution de Zenker ; C : Carnoy et Méthyl Carnoy ; GF : Glyo-fixxTM ; Autres : * 1 Solufix ; ** 1 Cleland, 1 Zinc fixative ; *** 1 Prefer ; **** 1 Omnifix, 1 Histochoice, 1 STF (Streck Tissu Fixative), 1 Histofix

Résultats de l'étude bibliographique rétrospective menée dans 20 revues sur les fixateurs utilisés

ANNEXE 2

Techniques d'inclusion des tissus et de préparation des coupes histologiques

□ Inclusion des tissus

L'automate du laboratoire, V.I.P (Sakura, Bayer, Paris, France) débutant par un premier bain de formol, l'ensemble des échantillons prélevés, fixés dans le formol, le Glyo-Fixx™ et dans les solutions à base de glyoxal, ont fait l'objet d'une inclusion à la main.

Afin de compenser l'absence d'agitation, qui est présente à chaque étape de l'inclusion en automate, les temps de déshydratation et d'imprégnation dans la paraffine ont été augmentés.

Les différentes phases de l'inclusion manuelle sont résumées dans le tableau suivant.

SOLUTION	DUREE	TEMPERATURE
Ethanol 95°	2 h 45	température ambiante
Ethanol 100°	2 h 45	température ambiante
Toluène	2 h 45	température ambiante
Paraffine	nuit	56°C

Inclusion en paraffine des échantillons fixés dans les solutions à base de glyoxal, le formol et le Glyo-Fixx™.

□ Préparation des coupes, montage et déparaffinage des lames

Les coupes sont réalisées à partir des blocs d'inclusion sur un microtome puis étalées sur lames à l'eau albumineuse. Elles sont ensuite séchées pendant une heure sur une platine chauffante à 40°C puis placées à l'étuve soit pendant une heure à 50°C, soit une nuit à 37°C. Les coupes sont alors déparaffinées par immersion dans trois bains successifs de toluène pendant dix minutes chacun puis réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante pendant dix minutes chacun (alcool absolu → alcool à 95%) et enfin immergées dans de l'eau distillée.

Pour certaines techniques immunohistochimiques nécessitant un pré-traitement (par la chaleur ou enzymatique), les coupes sont étalées à l'eau distillée sur des lames traitées à l'aminoéthyltriéthoxysilane (lames POLYSINE™, VWR International), la suite de la préparation étant identique à celle précédemment décrite.

NB: liste des réactifs en Annexe 8

ANNEXE 3**Techniques du miroir d'argent et du réactif de Schiff****□ Miroir d'argent****✓ Solution de Jones**

<u>Solution mère :</u>	Héxaméthylène tétramine	475 mL
	Nitrate d'argent à 5%	25 mL

<u>Borax à 5%</u>	Tétraborate de sodium	25g
	Eau distillée	500mL

Solution de travail (Solution extemporanée)

	Solution mère d'argent méthanémine	15 mL
	Eau distillée	15 mL
	Solution aqueuse de Borax à 5 %	6 mL

✓ Chlorure d'or à 0,5%

- Chlorure d'or	1g
- Eau distillée	200mL

✓ Hyposulfite de Na à 5%

Thiosulfate de Na	50g
Eau distillée	1000mL

□ Technique de Schiff**✓ Réactif de Schiff (Na₂SO₃) : prêt à l'emploi (Merck)****✓ Métabisulfite de sodium à 10%**

- Métabisulfite de sodium à 1%	48 mL
- Acide chlorhydrique 1N	40 mL
- Eau distillée	800 mL

NB: liste des réactifs en Annexe 8

ANNEXE 4

Colorations histochimiques

□ **Colorations morphologiques**

✓ ***Hématoxyline-éosine-safran***

▪ *Protocole :*

- déparaffinage des lames et réhydratation
- Hématoxyline 4 min
- Eau distillée 4 min
- Alcool chlorhydrique 10 sec
- Eau courante 3 min
- Eau courante 3 min
- Eosine 3 min
- Eau courante 3 min
- Ethanol 96 % 3 min
- Ethanol 100 % 3 min
- Safran 5 min
- Ethanol 100 % 3 min
- Ethanol 100 % 3 min
- Toluène 3 min
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

<u>Alcool chlorhydrique</u>	Ethanol 100 %	2000 mL
	Eau distillée	2000 mL
	Acide chlorhydrique	10 mL

Eosine Solution aqueuse d'érythrosine à 1 %
Acidifier par 20µl d'acide acétique pour 300 mL avant usage

Safran Solution alcoolique de safran à 1 %
Faire sécher 10 g de safran à 37° pendant 24 h
Ajouter 1000 mL d'éthanol absolu
Laisser infuser à l'étuve
Conservation indéfinie à l'étuve à 37°C.

✓ ***Trichrome de Masson***

▪ *Protocole :*

- Amener les coupes à l'eau
- Hématoxyline 5mn
- Eau courante 3mn
- Rouge ponceau 17mn
- Eau courante 0,5mn
- Acide phosphomolybdique 5mn
- Bleu d'aniline 2mn30
- Eau acétifiée 4mn
- Ethanol 100 % 3mn
- Toluène 3mn
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Rouge ponceau : Fuchsine acide à 2% 1 volume
Ponceau xylidine à 1% 2 volumes

Fuchsine acide à 2% Fuchsine acide 20g
Eau distillée 1000mL

Ponceau de xylidine à 1% Ponceau de xylidine 10g
Eau distillée 990mL
Acide acétique 10mL

Acide phosphomolybdique Acide phosphomolybdique 10g
Eau distillée 1000mL

Bleu d'aniline Faire bouillir 100 mL d'eau distillée
Ajouter 1 g de bleu d'aniline
Retirer du feu
Ajouter 2,5 mL d'acide acétique glacial
Laisser refroidir et filtrer

Eau acétifiée Acide acétique 50mL
Eau distillée 4950mL

✓ **Coloration de Giemsa différencié**

▪ *Protocole*

- Amener les coupes à l'eau

- Diluer la solution stock de Giemsa au 1/5 avec de l'Hépès 0,03M pH6 (15mL de giemsa + 60mL d'hépès)
- Coloration dans des racks verticaux 1 heure
- Rincer les lames à l'eau distillée
- Différenciation dans 100mL d'eau distillée additionnée de 4 gouttes d'acide acétique glacial (prendre une pipette de 1mL)
 - pour les ganglions 2 min 30
 - pour les PBO 15 secondes
- Continuer la différenciation dans l'éthanol à 96° 10 min
- 2 bains d'isopropanol 2 x 2 min
- Toluène
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Hépès 0,03M Hépès 7,14 g
 Eau distillée 1000 mL
 Ajuster à pH 6,0

Giemsa Prêt à l'emploi

✓ **Bleu de Toluidine**

▪ *Protocole :*

- Amener les coupes à l'eau
- Bleu de toluidine 10 minutes
- Rincer à l'eau courante
- Ethanol 96 % passage
- Ethanol absolu passage
- Toluène
- Monter à l'eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Bleu de toluidine : Bleu de toluidine 10 g
 Eau distillée 1000 mL

Fixateur : Ethanol absolu 500 mL
 Formaldéhyde à 40 % 500 mL

□ **Mise en évidence d'éléments minéraux**

✓ **Coloration de Perls**

▪ *Protocole :*

- Amener les coupes à l'eau
- Utiliser un portoir en plastique
- Solution extemporanée 10mn
- Eau distillée passage
- Kernechtrot 10mn
- Eau distillée passage
- Ethanol à 70 % passage
- Ethanol à 96 % 5mn
- Ethanol à 100 % 5mn
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Solution extemporanée : Mélanger à parties égales :

Solution aqueuse de ferrocyanure de K à 2 % 50 %

Solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 2 % 50 %

Ferrocyanure de K à 2% Ferrocyanure de K 10g
 Eau distillée 500mL

Acide chlorhydrique à 2% Eau distillée 980mL
 Acide chlorhydrique 20mL

Kernechtrot Kernechtrot 0,5g
 Sulfate d'aluminium 25g
 Eau distillée 500mL
 Chauffer jusqu'à ébullition et filtrer

□ **Mise en évidence des fibres conjonctives**

✓ **Coloration de Rouge Sirius Hématoxyline**

▪ *Protocole :*

- Rouge sirius 30 min
- Eau courante bien rincer
- Acide picrique saturé 30 min
- Eau courante bien rincer
- laisser sécher

- Toluène
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Solution de Rouge sirius* Sirius red 0,1 g
 Sol saturée d'acide picrique 100 mL

Tampon PBS un sachet 9,6g
 Eau distillée 1000mL

*Ne préparer que 100 mL car la solution est instable et la changer toutes les 3 semaines

✓ **Coloration de Jones**

▪ *Protocole :*

- Utiliser un portoir en plastique
- Acide périodique 30 mn
- Eau distillée Passage
- Solution de travail 1h à 56°C (l'image doit devenir brun foncé)
- Eau distillée Passage
- Chlorure d'or 3 mn
- Eau distillée Passage
- Hyposulfite de Na 3 mn
- Eau distillée Passage
- Hématoxyline 2 mn
- Eau distillée Passage
- Eosine 30 secondes
- Eau distillée passage
- Ethanol à 70% passage
- Ethanol à 96% 5 min
- Ethanol à 100% 5 min
- Toluène
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Acide périodique Acide orthopériodique 5g
 Eau distillée 1000mL

Solution mère Sol. Aqueuse d'héxaméthylènetétramine à 3 % 475 mL
 Sol. Aqueuse de nitrate d'argent à 5 % 25 mL

Il se forme un précipité blanc qui se dissout immédiatement par agitation. Cette solution se conserve un mois au réfrigérateur.

Héxaméthylène tétramine à 3% : Héxaméthylène tétramine 30g
Eau distillée 1000mL

Nitrate d'argent à 5% : Nitrate d'argent 10g
Eau distillée 200mL

Solution de travail Solution extemporanée
Solution mère d'argent méthanémine 15 mL
Eau distillée 15 mL
Solution aqueuse de Borax à 5 % 6 mL

Borax à 5% Tétraborate de sodium 25g
Eau distillée 500mL

Chlorure d'or à 0,5% Chlorure d'or 1g
Eau distillée 200mL

Hyposulfite de Na à 5% Thiosulfate de Na 50g
Eau distillée 1000mL

Eosine à 1% Erythrosine 10g
Eau distillée 1000mL
Acidifier avec 5µl d'acide acétique pour 70mL

✓ **Coloration de Gordon sweets**

▪ **Protocole :**

- Amener les lames à l'eau
- Permanganate sulfurique 10mn
- Eau distillée Passage
- Acide oxalique Blanchir
- Eau distillée Passage
- Alun de fer 15mn
- Eau distillée Passage
- Nitrate d'argent ammoniacal 3mn
- Eau distillée Passage

- Formol	1mn (les lames doivent noircir)
- Eau distillée	Passage
- Chlorure d'or	3mn
- Eau distillée	Passage
- Hyposulfite de Na	3mn
- Eau distillée	Passage
- Kernechtrot	4mn
- Eau distillée	Passage
- Ethanol 70%	Passage
- Ethanol 96%	5mn
- Ethanol 100%	5mn
- Toluène	
- Monter à l'Eukitt	

▪ *Préparation des solutions :*

<u>Permanganate de K à 0,5 %</u>	Permanganate de K	7,5 g
	Eau distillée	1500 mL

<u>Permanganate sulfurique</u>	A préparer extemporanément	
	Permanganate de K à 0,5 %	50 mL
	Acide sulfurique à 3 %	3 mL

<u>Acide sulfurique à 2,5%</u>	Eau distillée	485mL
	Acide sulfurique	15mL

<u>Acide oxalique à 5%</u>	Acide oxalique	50g
	Eau distillée	1000mL

<u>Alun de fer à 2,5%</u>	Alun de fer	25g
	Eau distillée	1000mL

Nitrate d'argent ammoniacal Solution hebdomadaire

Dans 20 mL de nitrate d'argent à 10 % ajouter, goutte à goutte, de l'ammoniaque jusqu'à dissolution du précipité. Ajouter 20 mL de soude à 3%, puis de nouveau de l'ammoniaque jusqu'à dissolution du nouveau précipité. Compléter à 200 mL avec de l'eau distillée.

<u>Nitrate d'argent à 10%</u>	Nitrate d'argent	50g
-------------------------------	------------------	-----

	Eau distillée	500mL
<u>Soude à 3%</u>	Hydroxyde de sodium	6g
	Eau distillée	200mL
<u>Formol</u>	Formaldéhyde	240 mL
	Eau distillée	800 mL
	Carbonate de calcium en excès	env 3 spatules
<u>Chlorure d'or à 0,5%</u>	Chlorure d'or	1g
	Eau distillée	200mL
<u>Hyposulfite de sodium à 5%</u>	Thiosulfate de sodium	50g
	Eau distillée	1000mL
<u>Kernechtrot</u>	Kernechtrot	1g
	Sulfate d'aluminium	50g
	Eau distillée	1000mL
	Chauffer à ébullition et filtrer	

✓ **Coloration de Weigert**

▪ *Protocole :*

Contre-coloration au picro indigo carmin (méthode de VAN GIESON)

- Amener les lames à l'eau
- Solution de Weigert 30 à 60 mn
- Eau courante Passage
- Alcool chlorhydrique à 1% Environ 10 secondes en agitant
- Eau distillée Passage
- Picro indigo carmin 10 mn
- Eau courante Passage
- Ethanol à 70% 5 mn
- Ethanol à 96% 5 mn
- Ethanol à 100% 5 mn
- Toluène
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Solution de Weigert Eau distillée bouillante 1000mL

Fuch sine basique	10 g
Résorcinol	20 g

Précipiter le colorant par 150 mL d'une solution de chlorure de fer III à 30 %

Laisser bouillir quelques instants en agitant

Filtrer sur papier à chaud

Jeter le filtrat et ne conserver que le filtre et la boue noirâtre qu'il contient

Dissoudre le précipité dans 1000 mL d'éthanol à 95° additionné de 20 mL d'acide chlorhydrique

Filtrer à nouveau

<u>Chlorure de fer III à 30%</u>	Chlorure de fer III	45g
	Eau distillée	150mL

<u>Alcool chlorhydrique</u>	Acide chlorhydrique	10 mL
	Ethanol à 70°	1000 mL

<u>Picro-indigo-carmin</u>	Indigo-carmin	2g
	Sol saturée d'acide picrique	500 mL

❑ Mise en évidence des glucides

✓ **Coloration de PAS**

▪ *Protocole :*

- Déparaffiner et réhydrater les coupes
- Acide périodique 5mn
- Eau courante 2mn
- Réactif de Schiff 59mn
- Métabisulfite de Na 7mn
- Eau courante 5mn
- Hématoxyline 3mn
- Eau courante 10s
- Alcool chlorhydrique 3mn
- Eau courante 3mn
- Ethanol à 96% 3mn
- Ethanol à 100% 5mn
- Safran 5mn
- Ethanol à 100% 3mn
- Toluène 3mn

- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Acide périodique Acide périodique 5 g
 Eau distillée 1000 mL

Réactif de Schiff Prêt à l'emploi

Métabisulfite de Na Métabisulfite de Na à 10 % 48 mL
 Acide chlorhydrique N/1 40 mL
 Eau distillée 800 mL

Métabisulfite de Na à 10% Métabisulfite de Na 100g
 Eau distillée 1000mL

Acide chlorhydrique N/1 HCL pur 93,5 mL
 Eau distillée 1000 mL

Alcool chlorhydrique à 0,25% Ethanol à 100% 2000mL
 Eau distillée 2000mL
 Acide chlorhydrique 10mL

Safran Safran 10g
 Ethanol à 100% 1000mL
 Laisser infuser à l'étuve à 37°C

✓ **Bleu Alcian**

▪ *Protocole :*

- Déparaffiner et réhydrater les coupes

- Bleu alcian 30 mn
 - Eau courante Passage
 - Kernechtrot 10 mn
 - Eau courante Passage
 - Ethanol à 70% Passage
 - Ethanol à 96% 5 mn
 - Ethanol à 100% 5 mn

- Toluène

- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

<u>Bleu alcian</u>	Bleu alcian	0,5g
	Eau distillée	485mL
	Acide acétique	15mL

<u>Kernechtrot</u>	Kernechtrot	0,5g
	Sulfate d'aluminium	25g
	Eau distillée	500mL
	Chauffer jusqu'à ébullition et filtrer	

□ **Mise en évidence des pigments**

✓ **Coloration de Fontana**

▪ *Protocole :*

- Déparaffiner et réhydrater les coupes
- Eau distillée
- Solution de Fontana 1h à 56°C
- Eau distillée
- Chlorure d'or 10 mn
- Eau distillée
- Hyposulfite de sodium 5 mn
- Eau distillée
- Kernechtrot 5 mn
- Eau distillée
- Alcool 95° passage
- Alcool 100° passage
- Toluène
- Monter à l'Eukitt

▪ *Préparation des solutions :*

Solution mère de Fontana Nitrate d'argent à 5%

Solution de travail extemporanée

Solution mère 100 mL

Ajouter goutte à goutte de l'ammoniaque jusqu'à dissolution du précipité formé

Ajouter goutte à goutte de la solution mère jusqu'à obtention d'un liquide opalescent, persistant à l'agitation, sans dégagement d'ammoniaque

Chlorure d'or à 0,5%

Chlorure d'or 1g
Eau distillée 200mL

Hyposulfite de sodium à 5%

Thiosulfate de sodium 50g
Eau distillée 1000mL

Kernechtrot

Kernechtrot 0,5g
Sulfate d'aluminium 25g
Eau distillée 500mL
Chauffer jusqu'à ébullition et filtrer

NB: liste des réactifs en Annexe 8

Soit : 9mL d'acide citrique 0,1M
41mL de citrate de sodium
100mL de Tris 0,25M
compléter à 1L avec de l'eau distillée
Vérifier le pH (environ 9,25)

□ **Technique immunohistochimique faisant appel au couple anticorps secondaire biotinylé/streptavidine peroxydase**

✓ ***Incubation de l'anticorps primaire***

Les coupes sont recouvertes d'une solution d'anticorps primaire dans un tampon PBS 0,1M pH 7,4 contenant 3 % (m/v) d'albumine sérique bovine, 0,1 % (m/v) d'azide de sodium (m/v), 0,06 % (m/v) de n-éthyl-maléïmide et 20 % (v/v) de glycérol, puis incubées une nuit, en chambre humide, à 4°C et à l'abri de la lumière.

✓ ***Incubation de l'anticorps secondaire biotinylé***

Après deux rinçages brefs à la pissette avec un tampon PBS-Tween, les coupes sont incubées dans une solution d'anticorps secondaire biotinylé : chèvre anti-IgG de souris (Dako E 433) si l'anticorps primaire est monoclonal et chèvre anti-IgG de lapin (Dako E 432) si l'anticorps primaire est polyclonal, les deux étant dilués au 1/200 dans un tampon PBS-Tween.

✓ ***Inhibition de l'activité peroxydasique endogène***

Après deux rinçages brefs à la pissette avec un tampon PBS-Tween, les coupes sont incubées 20 minutes à température ambiante dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6% (v/v) dans de l'eau déminéralisée, afin d'inhiber l'activité peroxydasique endogène.

✓ ***Révélation***

Après deux rinçages brefs à la pissette avec un tampon PBS-Tween, les coupes sont incubées pendant 50 minutes à température ambiante dans une solution de streptavidine-peroxydase au 1/150 (réactif Dako P397) dans un tampon PBS-Tween.

Après deux lavages dans un tampon PBS-Tween, l'activité peroxydasique est révélée à l'aide des réactifs du kit de révélation Vector® Novared™. La solution de révélation est préparée en ajoutant à 5 mL d'eau, de façon successive avec agitation et homogénéisation entre chaque ajout, 3 gouttes du réactif n°1, 2 gouttes du réactif n°2, 2 gouttes du réactif n°3 et enfin 2 gouttes du réactif n°4 (peroxyde d'hydrogène). Cette solution de révélation, pouvant être conservée à l'abri de la lumière et au frais, est déposée sur chaque coupe. La révélation s'effectue à l'abri de la lumière pendant 5 minutes et est arrêtée par un rinçage des lames à la pissette suivi de l'immersion de ces dernières dans l'eau.

✓ **Contre-coloration**

Cette contre-coloration s'effectue à l'hématoxyline de Harris, diluée au 1/2, pendant une minute. Les coupes sont alors rincées à l'eau courante et bleuies dans un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,2.

Enfin, les coupes sont déshydratées par passage dans l'éthanol (95°, absolu) puis dans le toluène avant montage à l'Eukitt®.

□ **Technique dans laquelle l'anticorps primaire est détecté à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à des micro-polymères de peroxydase (Novolink™ Polymer, Novocastra)**

✓ **Incubation de l'anticorps primaire**

Comme dans la technique classique, les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans un tampon PBS 0,1M pH 7,4 contenant 3 % (m/v) d'albumine sérique bovine, 0,1 % (m/v) d'azide de sodium, 0,06 % (m/v) de n-éthyl-maléimide et 20 % (v/v) de glycérol, pendant une nuit, en chambre humide, à 4°C et à l'abri de la lumière.

✓ **Blocage des peroxydases endogènes**

Après deux rinçages brefs à la pissette avec un tampon PBS-Tween, les coupes sont incubées pendant 20 minutes à température ambiante dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 6% (v/v) dans de l'eau déminéralisée, afin d'inhiber l'activité peroxydasique endogène.

✓ **Incubation du polymère**

En premier lieu, une goutte d'un adjuvant post anticorps primaire (Novocastra™ Post Primary Block) est déposée sur chaque coupe pendant 30 minutes, afin d'accroître la pénétration du réactif polymère suivant.

Le polymère conjugué à la peroxydase (Novolink™ Polymer) est ensuite déposé sur les coupes qui sont incubées à température ambiante pendant 30 minutes.

✓ **Révélation**

Après deux lavages dans un tampon PBS-Tween, l'activité peroxydasique est révélée à l'aide du kit de révélation Vector® Novared™ de la même façon que précédemment décrite.

✓ **Contre coloration**

La contre-coloration s'effectue à l'hématoxyline de Harris, diluée au 1/2, pendant une minute. Les coupes sont ensuite rincées à l'eau courante et bleuies dans un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,2.

Après déshydratation par passage dans l'éthanol (95°, absolu) puis dans le toluène, les coupes sont montées à l'Eukitt.

ANNEXE 6**Microscopie électronique****□ Tampon cacodylate 0,1M**

Dissoudre 21,405g de cacodylate de sodium dans 1 litre d'eau distillée.
Ajuster le pH à 7,2 avec de l'acide chlorhydrique pur (36N)

□ Acétate d'uranyle

Acétate d'uranyle à saturation dans l'alcool à 50%

Centrifuger au moment de la coloration (5 minutes à 2000 tours/mn)

Laisser agir 5 minutes au noir et à température ambiante

Rincer à l'eau ou à l'alcool à 50°

Sécher

□ Citrate de Plomb (solution de Reynolds)**✓ Solutions mères :**

Nitrate de plomb à 33,1% dans l'eau distillée (8,275g pour 25mL)

Tri-sodium citrate à 29,4% dans l'eau distillée (7,35g pour 25mL)

Soude N : 4% dans l'eau distillée (1g pour 25mL)

✓ Solution de travail : à préparer au moment de l'emploi.

Eau distillée : 4mL

Nitrate de plomb : 0,5mL

Citrate de sodium : 0,75mL

Mélanger pour obtenir un précipité blanc.

Ajouter 1mL de Soude N et agiter pour obtenir un liquide limpide .

Mettre une goutte de cette solution dans un verre de montre, le tout posé sur des pastilles de soude. Poser les grilles sur cette goutte et laisser agir 6 minutes au noir.

Rincer à l'eau distillée et sécher.

❑ **Bleu de Toluidine**

Solution de Borax (di-sodium tétraborate) à 1% dans l'eau distillée.

Solution de Bleu de Toluidine à 1% dans Borax.

Filtrer.

Laisser les coupes semi-fines sur lames sur une platine à 100° au moins 5 minutes.

Déposer le colorant sur les coupes.

Laisser agir 10 à 20 secondes et rincer à l'eau courante puis sécher.

❑ **Acide osmique à 1%**

Casser l'ampoule d'acide osmique (500mg) dans un flacon.

Ajouter 50mL de tampon cacodylate 0,1M.

Agiter

Envelopper dans du papier noir.

Laisser dissoudre au réfrigérateur en remuant de temps en temps, au moins 2 jours si possible.

Filtrer et conserver en flacon teinté et bouché au réfrigérateur.

NB: liste des réactifs en Annexe 8

ANNEXE 7**Biologie Moléculaire et Hybridation in situ****□ Gel d'acrylamide/bisacrylamide (29/1) à 6% dans 0,5x de TBE**

- Faire le montage des plaques de verre à l'aide du système DUAL GEL CASTER de HOEFER.
- Préparer le gel d'acrylamide/bisacrylamide (29/1) à 6% dans 0,5x de TBE :
(pour 10 mL de gel : 2mL acrylamide/bisacrylamide (29/1) à 30% + 0,5 mL de TBE 10x + 7,5 mL d'eau milli Q).
- Préparer le mélange dans un tube de type falcon 50 et ajouter les agents de polymérisation : APS à 10% (70 mL) et Temed (6mL).
- Couler le gel entre les plaques à l'aide d'une seringue de 10 mL et d'une aiguille 19G, insérer le peigne et laisser polymériser environ 45 minutes.
- Réaliser le montage des plaques sur la cuve d'électrophorèse verticale Hoefer SE 250 commercialisée par Amersham Biosciences. Remplir les bacs inférieur et supérieur de tampon TBE x0,5.

□ Préparation des solutions de travail**✓ TBS**

Tris HCl 1M pH 7,6	50mL
NaCl 5M	30mL
Eau milliQ	920mL
Ajuster le pH à 7,6	

✓ TBST

Ajouter 1mL de Tween au tampon TBS

✓ Tampon pH 9,4

Tris HCl 1M pH 8	100mL
NaCl 5M	20mL
MgCl ₂ 1M	50mL
Eau milliQ	830mL

✓ Milieu d'hybridation

Formamide	5mL
Sulfate de dextran	1g
SSC 20x	1mL

Chauffer jusqu'à dissolution du dextran sur agitateur. Laisser refroidir et ajuster le pH à 7. Compléter à 7mL avec de l'eau milliQ (environ 1mL).

✓ Protéinase KSolution mère

Tris HCl 1M	50mL
Eau milliQ	950mL
CaCl ₂	0,147g

Solution fille

Dilution au 1/1000^{ème} de la solution mère dans du tampon Tris HCl 0,1M et EDTA 50mM pH 8 soit :

Tris HCl 1M pH 8	100mL
EDTA 0,5M	100mL
Eau milliQ	800mL

A 1mL de solution fille, ajouter 1mg de Protéinase K

□ Réalisation technique des sondes d'ADN génomique humain total pour hybridation in situ**✓ Extraction de l'ADN et purification :**

L'extraction de l'ADN est réalisée à l'aide du kit d'extraction *MagneSil KF, Genomic System – Promega sur KingFisher mL*. Les différentes étapes de cette extraction d'ADN sont présentées dans le paragraphe suivant.

✓ Marquage de l'ADN

Principe : on ajoute un cocktail d'hexanucléotides synthétiques dont les séquences correspondent à toutes celles qui sont mathématiquement possibles. Il s'en trouve obligatoirement quelques-unes qui s'hybrident avec la sonde. Ces petits oligonucléotides

hybridés à la sonde servent alors d'amorce pour le fragment de Klenow de la DNA polymérase qui reconstitue le second brin. Comme un des hexanucléotides est marqué, le brin néosynthétisé est marqué. La digoxigénine est choisie comme traceur parce qu'elle n'est pas présente dans les tissus ce qui évite le bruit de fond que l'on peut observer avec les sondes marquées à la biotine.

Réalisation : après vérification de la pureté de la solution d'ADN par spectrophotométrie UV et estimation de la concentration d'ADN par mesure de l'absorbance à 260 nm, l'ADN est fragmenté puis marqué de la façon suivante :

1 µg d'ADN dissous dans 15 mL d'eau milliQ) est dénaturé par chauffage de la solution pendant dix minutes à 95°C. La solution est ensuite refroidie par immersion du tube dans de l'azote liquide.

Les sondes sont alors synthétisées pendant seize heures à 37°C en ajoutant au milieu :

- 2 mL d'hexanucléotide Mix 10x conc (Roche)
- 2 mL d'une solution de digoxigénine Dig DNA labeling Mix 10x conc (Roche)
- 1 mL de Klenow enzyme [9 U/ mL] (Promega)

La synthèse est stoppée en ajoutant 2 mL d'EDTA 0,2 M.

L'ADN ainsi marqué peut être utilisé sans purification préalable.

❑ **Extraction de l'ADN**

✓ **Contenu du Kit de purification et préparation des réactifs**

Cinq réactifs, à conserver à température ambiante, sont fournis :

1- Solution de billes paramagnétiques recouvertes de silice	40 mL
2- Tampon de lyse KF	160 mL
3- Solution de lavage saline	200 mL
4- Solution de lavage alcoolique	220 mL
5- Eau distillée sans nucléase	2 x 25 mL

Des réactifs supplémentaires, non inclus dans le kit, sont nécessaires :

- Ethanol 96-100%
- Isopropanol

Seule la solution de lavage alcoolique est préparée, en ajoutant 110 mL d'éthanol à 96-100% à 110 mL d'alcool isopropylique au 220 mL de la solution de lavage alcoolique du kit.

✓ **Préparation des échantillons**

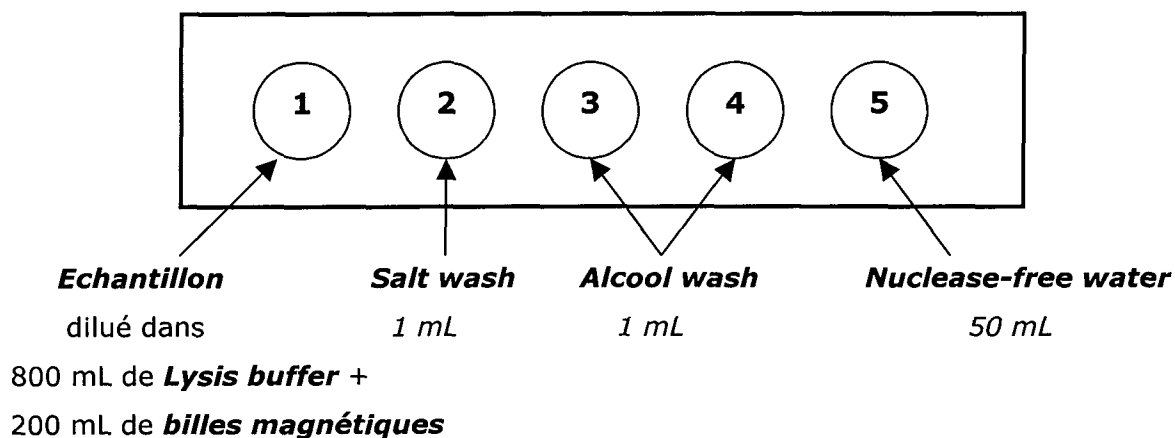
Dans un premier temps, l'ADN est extrait de coupes de tissu fixé inclus en paraffine. Vingt à vingt-cinq coupes (en fonction de la surface de ces dernières) à 10 µm sont recueillies dans un tube Eppendorf. Pour déparaffiner ces dernières, 400 mL de toluène sont ajoutés dans le tube Eppendorf. Après avoir laisser agir le toluène 5 minutes, le tube est centrifugé 5 minutes à 10 000g. Le surnageant est ensuite éliminé. L'extraction de la paraffine est parachevée en incubant, deux fois de suite, 5 minutes, les coupes dans une solution à égal volume de toluène et d'un tampon pK (400 mL chaque), les incubations étant suivies d'une centrifugation à 10 000g et d'une élimination du surnageant. Vingt mL de protéinase K à 10 mg/mL et 20 mL de SDS sont alors ajoutés et le tube mis à incuber une nuit dans un bain-marie à 55°C.

Pour le tissu congelé, trente coupes à 30 µm sont placées dans un tube Eppendorf, auxquelles sont ajoutés 90 mL de tampon pK, 5 mL de protéinase K et 5 mL de SDS. Le tube est placé une nuit dans un bain-marie à 55°C.

✓ **Protocole de purification**

Après avoir mis l'automate sous tension, le programme '*Genomic_DNA_mL_1*' est sélectionné. L'échantillon, dilué au préalable dans 800 mL de tampon de lyse, est déposé en totalité dans le puits 1 de la barrette-échantillon. Deux cents mL de *billes magnétiques*, bien vortexées, sont déposées dans le même puits. Sont ensuite déposés respectivement 1 mL de solution de lavage saline dans le puits n°2, 1 mL de solution de lavage alcoolique dans les puits n°3 et n°4 et 50 mL d'eau distillée sans nucléase dans le dernier puits (n°5).

Une barrette à mélanger par barrette-échantillon est positionnée sur l'appareil. Un plateau échantillons-réactifs est alors placé dans l'appareil et reçoit la (les) barrette(s)-échantillon(s). Le programme sélectionné '*Genomic_DNA_mL_1*' est alors mis en route. L'extraction est réalisée en trente minutes. L'ADN libéré lors de la lyse se lie à la silice portée par les billes paramagnétiques (puits n°1) ; les billes, auxquelles est fixé l'ADN, sont lavées dans le tampon de lavage (puits n°2) ; deux lavages successifs du complexe billes-ADN sont réalisés dans la solution alcoolique (puits n°3 et n°4) ; la solution éthanolique est alors éliminée par évaporation (10 minutes) ; l'ADN purifié est alors élué de la silice (eau distillée sans nucléase, puits n°5) et les billes sont larguées dans le tampon de lavage (puits n°2). L'ADN purifié, présent dans le surnageant du dernier puits (n°5), est prêt à l'emploi pour PCR ou autre analyse.



□ **Extraction de l'ARN**

✓ **Préparation des échantillons**

Environ trente coupes à 30 µm de tissu inclus en paraffine sont recueillies dans un tube Eppendorf. Pour retirer la paraffine, 400 mL de toluène sont ajoutés dans le tube. Après avoir laissé agir 5 minutes, le tube est centrifugé pendant 5 minutes à 10 000g. Cette étape est répétée une fois, avant de commencer l'extraction par la première phase d'homogénéisation.

✓ **Phase d'homogénéisation**

Cette première étape consiste à homogénéiser les 50 à 100 mg de tissus récupérés dans 1 mL de Trizol, le volume de l'échantillon ne devant pas excéder 10% (v/v) du volume de Trizol utilisé.

✓ **Phase de séparation**

L'échantillon homogénéisé est incubé 5 minutes à température ambiante, pour obtenir une dissolution complète des nucléoprotéines. 0,2 mL de chloroforme par mL de Trizol sont alors ajoutés. Après une agitation manuelle vigoureuse de 15 secondes, puis une incubation de 3 minutes à température ambiante, le tube est centrifugé 10 minutes à 12 000g à 4°C. La phase aqueuse supérieure et incolore est prélevée (environ 60% du volume initial de Trizol).

✓ Phase de précipitation

La phase aqueuse est alors transférée dans un nouveau tube, à laquelle sont ajoutés 0,5 mL d'alcool isopropylique par mL de Trizol. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, le tube est centrifugé à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C.

✓ Lavage de l'ARN

Après cette centrifugation, le surnageant est éliminé. Le culot est alors lavé à l'aide de 1 mL d'éthanol à 75% par mL de Trizol. Après avoir mélangé en vortexant, le tube est centrifugé à 7 500g pendant 5 minutes à 4°C.

✓ Redissolution de l'ARN

Après la centrifugation, le culot obtenu est séché à l'air pendant 15 minutes, puis dissous dans 30 mL d'eau milli Q filtrée, dépourvue de RNAses. Le tube est alors incubé au bain-marie à 65°C pendant 10 minutes.

Enfin, un traitement par la DNase est effectué en ajoutant 1 mL de DNase pour les 30 mL d'ARN. Le tube est alors placé dans un thermocycleur à 37°C pendant 1 heure, puis à 65°C pendant 10 minutes.

□ Utilisation des puces AGILENT RNA 6000 NANO série II**✓ Réactifs**

- RNA Dye concentrate (bleu) : 1 µL
- RNA 6000 nano marqueur (vert) : 80 µL
- RNA Gel Matrix (rouge) : 65 µL
- RNA 6000 ladder for quantification of RNA samples 150 ng/µL : 1 µL, fourni dans le kit
- Eau distillée stérilisée filtrée : 1 mL
- Echantillons d'ARN de référence : yeast RNA 10 mg/mL
- Produit RNaseZap Ambion référence 9780.9782

✓ Appareils

- BIOANALYSEUR 2100 Agilent
- « Chip Priming Station »
- Vortex Mixer IKA

- Centrifugeuse pour tubes eppendorf
- Bain-marie à 70°C
- Puce RNA6000 LabChip série II
- Pucés de nettoyage des électrodes

✓ **Préparation des échantillons d'ARN**

La concentration des échantillons en ARN doit être préalablement évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm. Une dilution des échantillons est réalisée pour obtenir une concentration de 50 à 400 ng/μL, car un excès de matériel peut provoquer une distorsion des capillaires, pouvant être préjudiciable à la migration des échantillons. Les dilutions sont conservées dans la glace, jusqu'à utilisation. Avant d'être déposés sur la puce, les échantillons subissent une dénaturation à 75°C pendant 3 minutes puis sont centrifugés quelques secondes.

✓ **Protocole**

Quelques remarques préliminaires, quant à la réalisation technique :

- Le port de gants indispensable pendant la manipulation
- L'utilisation de matériel « nuclease-free »
- La conservation des réactifs à 4°C, hors utilisation
- Les puces une fois préparées doivent être utilisées dans les 5 minutes

▪ *Décontamination des électrodes*

Cette étape doit être réalisée avant et après chaque utilisation, par deux puces de nettoyage spécifiques, une pour la solution de RNase et l'autre pour l'eau.

▪ *Préparation du mélange gel-colorant*

Avant de débuter la préparation, les solutions doivent être placées à température ambiante pendant au minimum 30 minutes, afin d'éviter les échanges thermiques au sein de la puce pendant l'analyse.

Le gel est d'abord filtré : le tube de gel (bouchon rouge) est vortexé quelques secondes ; puis 550 μL de gel sont placés dans la partie supérieure d'une colonne de filtration spin filter et centrifugés à 1500 g pendant 10 minutes. Ce gel filtré peut alors être conservé et utilisé pendant plusieurs mois.

Pour la réalisation du mélange gel-colorant, 65 μ L de gel filtré sont placés dans un Eppendorf stérile. Le tube Dye (bouchon bleu) est vortexé au minimum 10 secondes, avant d'ajouter 1 μ L de Dye concentré vortexé au gel filtré. Ce mélange est vortexé avant centrifugation à 13000 rpm pendant 10 minutes. Ce mélange peut être conservé 5 jours, à 4°C et dans l'obscurité.

- *Montage de la puce dans la Chip Priming Station*

Tout le matériel nécessaire doit être prêt, car la puce est utilisable dans les 5 minutes maximum qui suivent le montage.

La Chip Priming Station est sortie de sa boîte, le bouchon transparent est retiré.

Tous les points suivants sont alors vérifiés : orifice du bouchon blanc non bouché, joint blanc dépourvu de traces de dépôt de gel, absence de poussières à l'orifice du joint blanc, position haute du taquet de blocage de la seringue, position C du socle de la station.

La seringue est fermement vissée avec son support noir.

Une nouvelle RNA chip est placée dans son logement de la Chip Priming Station.

9 μ L du mélange gel-dye sont prélevés et injectés au fond du puits marqué 'G', le piston de la seringue doit être sur 1 mL.

La Chip Priming Station est fermée sans à coup.

Le piston est pressé jusqu'à ce qu'il soit retenu par le clip. Après 30 secondes précisément, le clip est actionné pour relâcher le piston, qui revient alors progressivement à l'équilibre. Le volume auquel le piston remonte seul est noté car c'est un bon indicateur de l'absence de micro fuites d'air au niveau du joint (normalement au dessus de 0,8 mL). Le piston est alors ramené manuellement à 1 mL.

La Chip Priming Station est ouverte délicatement.

9 μ L du mélange gel-dye sont pipetés dans chacun des 2 puits marqués 'g'.

5 μ L de RNA 6000 Nano Marker sont déposés au fond du puits du ladder marqué d'une échelle et au fond des puits échantillons.

- *Chargement des échantillons*

Les échantillons et le marqueur de PM (1,2 μ L d'un aliquot de marqueur de PM ladder Ambion conservé à -80°C) sont dénaturés par chauffage au bain marie à sec à 70°C pendant 2 minutes avant d'être déposés dans la glace et centrifugés. Ils sont ensuite conservés à température ambiante dans un portoir.

1 μ L de marqueur de PM (ladder) est déposé dans le fond du puits spécifique du PM et 1 μ L de chaque échantillon dans le fond des puits correspondants (1 à 12).

La puce est vortexée dans l'appareil Vortex mixer pendant 1 minute exactement, pour éliminer d'éventuelles bulles d'air et homogénéiser les mélanges au sein de chaque puits.

- *Lancement du programme*

La puce est placée dans le Bioanalyseur 2100 Agilent.

Après avoir cliqué sur l'icône Assay, le type d'analyse RNA désiré est choisi (procaryote/eucaryote, nano/pico, total/messenger). Dans la rubrique « Data acquisition parameters », le nombre d'échantillons déposés sur la puce est renseigné (de 1 à 12).

Le run démarre après avoir cliqué sur l'icône start. Un run de 12 échantillons dure environ 30 minutes, temps pendant lequel l'appareil ne doit pas être touché et ne doit pas bougé. Différentes opérations se succèdent avant de pouvoir visualiser les profils, en cliquant sur Data dans le menu gauche 'Contexts'.

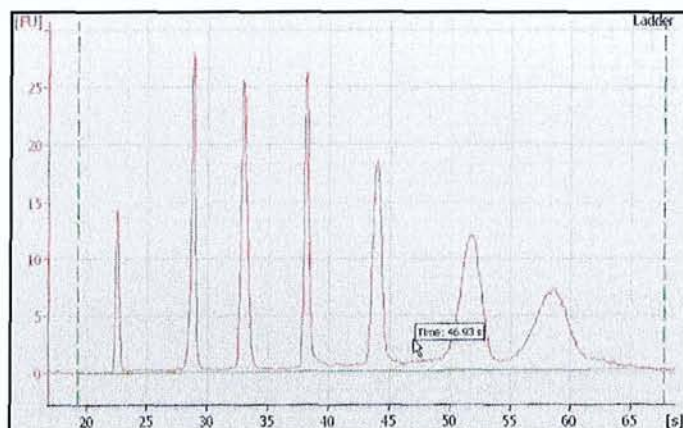
Dès que le run est terminé, la puce est retirée sans attendre et les électrodes du Bioanalyseur sont nettoyées. La puce peut être conservée à l'abri de la lumière, pendant 30 minutes maximum, pour un éventuel second run, suite à un problème informatique ou autre lors du premier run.

- ✓ **Analyse qualité**

Les analyses des résultats se font dans le menu Data en 3 étapes :

- *Contrôle du ladder ou marqueur de PM*

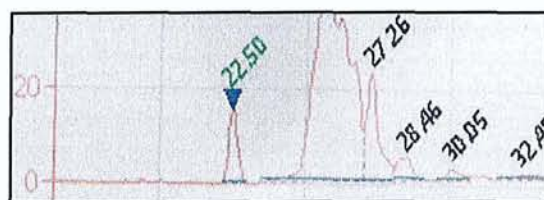
Le profil du ladder doit impérativement être de la qualité de celui présenté sur la figure suivante. En effet, la qualité du ladder détermine la qualité générale de la puce, prouvant le bon fonctionnement de la migration et attestant l'absence de contamination (RNAses) dans la préparation. Ce profil sert également de support à l'analyse semi-automatique des profils des échantillons (quantification, détermination de la taille et des types de populations d'ARN ribosomaux).



Profil de ladder optimal sur puce Agilent Nano

▪ *Alignement du pic 'marker'*

Le pic correspondant au marker interne, présent dans chaque échantillon (ladder compris), sort en premier, entre 20 et 25 secondes, et permet d'aligner les profils entre eux. Son intensité de fluorescence est liée à la qualité du mélange gel-dye et à l'âge du mélange (intensité de fluorescence entre 10 et 30 pour un mélange frais).



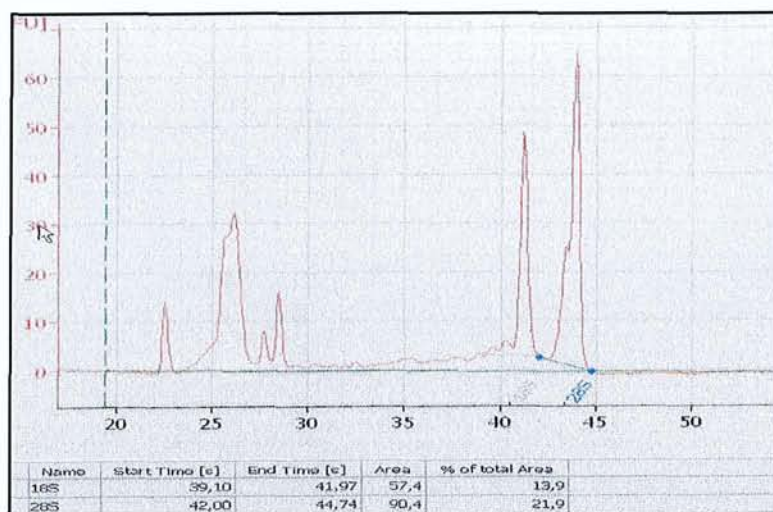
Alignement du pic marker présent dans chaque échantillon, compris entre 20 et 25 secondes.

▪ *Analyse des échantillons*

L'analyse des résultats se fait en étudiant tous les onglets placés en bas de la fenêtre du profil de l'échantillon.

- 'Results' : dans cet onglet, les résultats à vérifier sont :
 - la concentration totale d'ARN et sa cohérence avec les données obtenues en mesure d'absorbance (mais résultats en général plus faibles sur le Bioanalyseur)
 - le ratio 28S/18S (eucaryote) ou 23S/16S (procaryote). La valeur optimale est 2. Plus la qualité baisse, plus ce ratio diminue.
 - La valeur du RIN, comprise entre 1 et 10.
- 'Peak Table' : ce tableau donne la liste de tous les pics détectés.

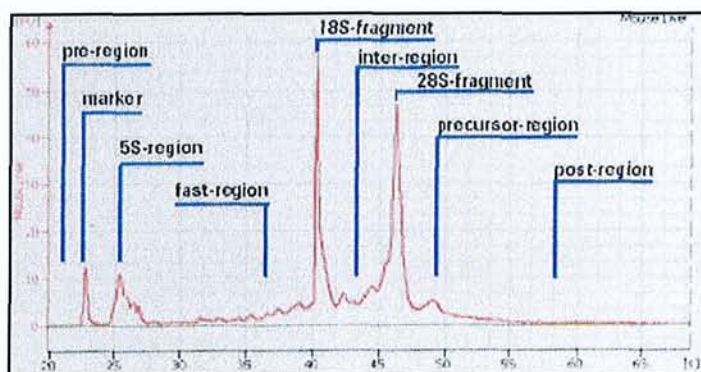
- 'Fragment Table' : ce tableau donne la liste des ARN ribosomaux détectés, avec possibilité de correction des bornes et d'ajout de populations manquantes si nécessaire.
- 'Errors' : les lignes affichées indiquent les zones de l'électrophorégramme qui gênent le calcul du RIN.
- 'Legend' : donne le nom de l'échantillon.



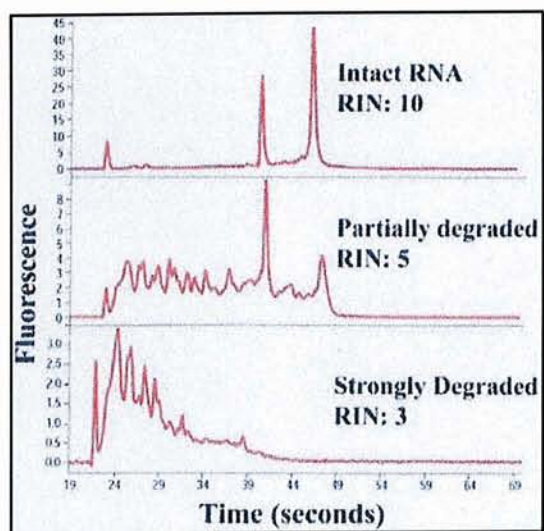
Exemple d'échantillon de bonne qualité générale :

intensités élevées, présence des 2 populations ribosomiques, bornes de détermination des pics correctes.

L'apport du logiciel 2100 Expert est le calcul automatique du critère de qualité RIN (RNA Integrity Number). Ce calcul intègre l'ensemble du profil et pas uniquement le ratio des pics ribosomaux [86]. Il s'agit d'un critère objectif du niveau de qualité des ARN, dont la valeur est comprise entre 1 et 10. Plus la qualité de l'ARN est bonne, plus la valeur de RIN est proche de 10. A l'inverse, un RIN égal à 1 correspond à un ARN totalement dégradé.



Zones utilisées dans le calcul du RIN.

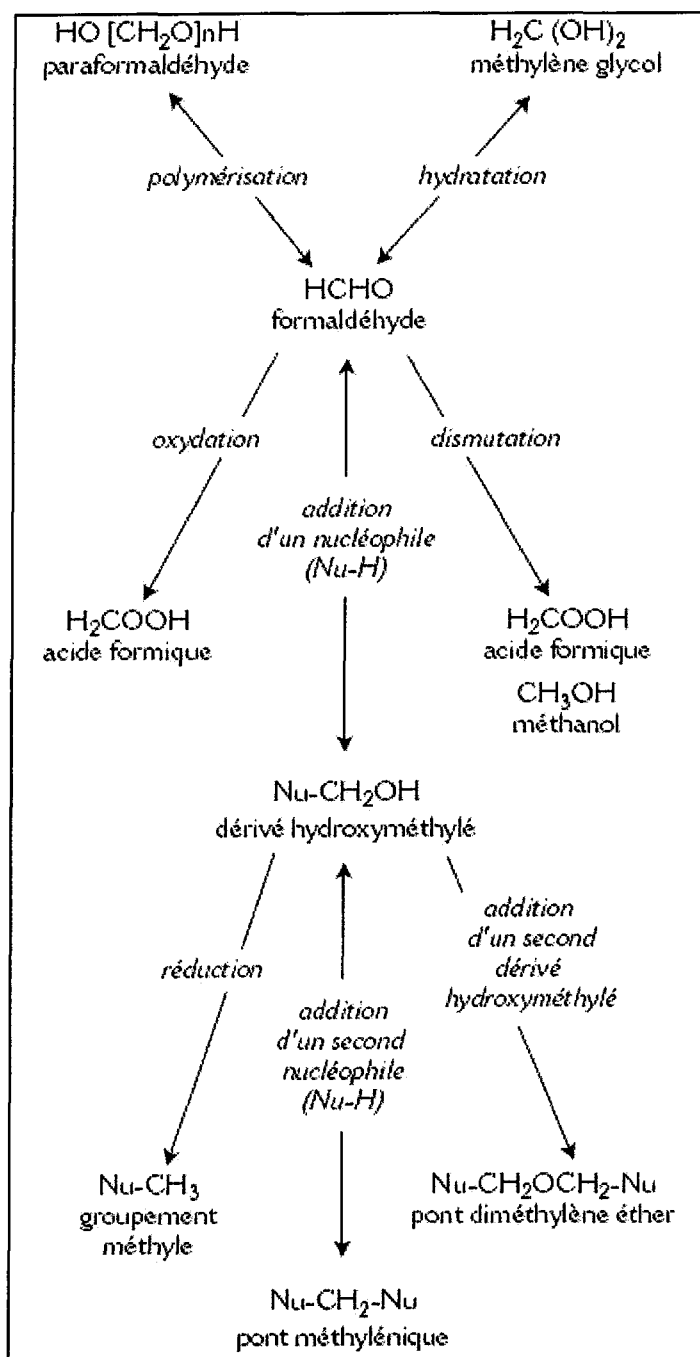


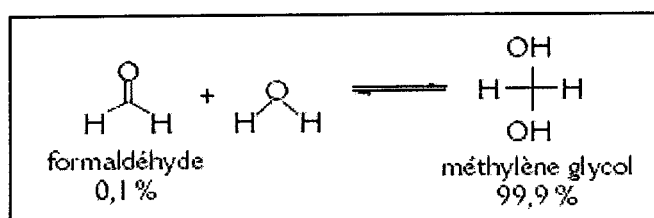
Corrélation RIN-Qualité de l'ARN.

ANNEXE 8**Liste des réactifs**

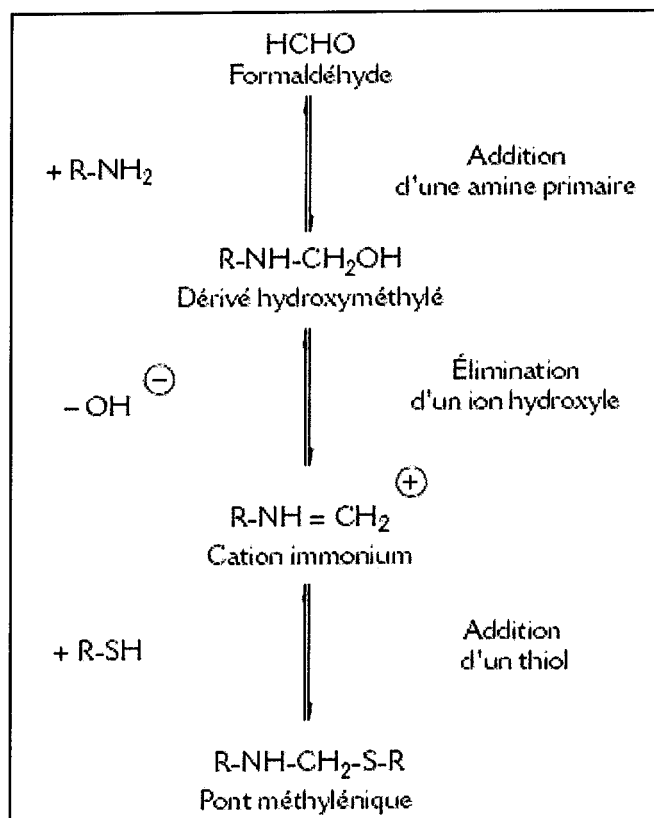
REACTIFS	REFERENCES	FOURNISSEURS
Acétate d'uranyle	28851.29	VWR
Acide citrique monohydraté	1.00244.0500	VWR
Acide acétique	20104298	VWR
Acide chlorhydrique 36%min RP normapur	20252290	VWR
Acide molybdo phosphorique	20 616 184	VWR
Acide orthopériodique	20592181	VWR
Acide osmique	20551076	VWR
Acide oxalique normapur	20 562 234	VWR
Acide picrique en solution saturée	80456	SIGMA
Acide sulfurique 95% normapur	20700243	VWR
Alcool ethylique 95°	83804.360	VWR
Alcool ethylique absolu	83813.360	VWR
Antidigo :AP	1093274	ROCHE
Bleu d'aniline (soluble dans l'eau)	21999183	VWR
Bleu de toluidine	80008660	VWR
Cacodylate de sodium	8.20670.0100	MERCK
Carbonate de calcium	22300-290	VWR
Carmin d'indigo	104724	MERCK
Caséine	RPN 3023	Amersham LIFE SCIENCE
Chlorure de Fer III	1.03943.0250	VWR
Chlorure de sodium	27800291	VWR
Chlorure d'or	26069081	VWR
Disulfite de sodium	481287	CARLO ERBA
DNA C (DNA genomic salmon testes)	D 9156	SIGMA
EDTA 0,5 M pH 8,0	EU0084-A	EUROMEDEX
Erythrosine B	1159360025	VWR
Eukitt	05347510	LABONORD
Formamide	1814320	BOEHRINGER
Formamide déionisé	F-9037	BOEHRINGER
Fuchsine acide	40360	RAL
Fuchsine basique	313230-0100	GURR

REACTIFS	REFERENCES	FOURNISSEUR
Giemsa	FR.09265	OXOID
Hématoxyline de Harris stabilisée	07907935	LABONORD
Hepes free acid minimum 99.5 %	H 4034	SIGMA
Héxaméthylène tétramine	8.18712.0100	VWR
Hydroxyde de sodium	28232294	VWR
Kernechtrot	5189	MERCK
NBT-BCIP	1681451	ROCHE
Nitrate d'argent	21 572 235	VWR
Nitrate de Plomb	1.07398.0100	MERCK
Paraffine	05881615	SIEMENS
PBS sans Ca et Mg solution 10X en poudre	34923	FISCHER BIOBLOCK
Ponceau de xylidine	P2395-25g	SIGMA
Potassium hexacyanoferrate (II)	1049840500	VWR
Potassium permanganate	26910237	VWR
Proteinase K	161 519	ROCHE
Réactif de schiff	9033	MERCK
Résorcinol	102808	MB BIOMEDICAL
Rouge sirius	365548-5g	SIGMA
Safran en poudre	F/SAFRAN	MICROM
Sodium tétraborate décahydraté	27727231	VWR
Soude N	28252.29	VWR
Sulfate de dextran	D 8906	SIGMA
Sulfate d'aluminium	21070-297	VWR
Sulfate ammonium de Fer (III)	21094233	VWR
Thiosulfate de sodium	27909296	VWR
Tri-sodium citrate	5720	LABOSI
Toluène	528231	CARLO ERBA
Tween 20	194841	MP BIOMEDICAL

ANNEXE 9**Interactions chimiques**□ **Avec le formol*****Propriétés chimiques du formaldéhyde***

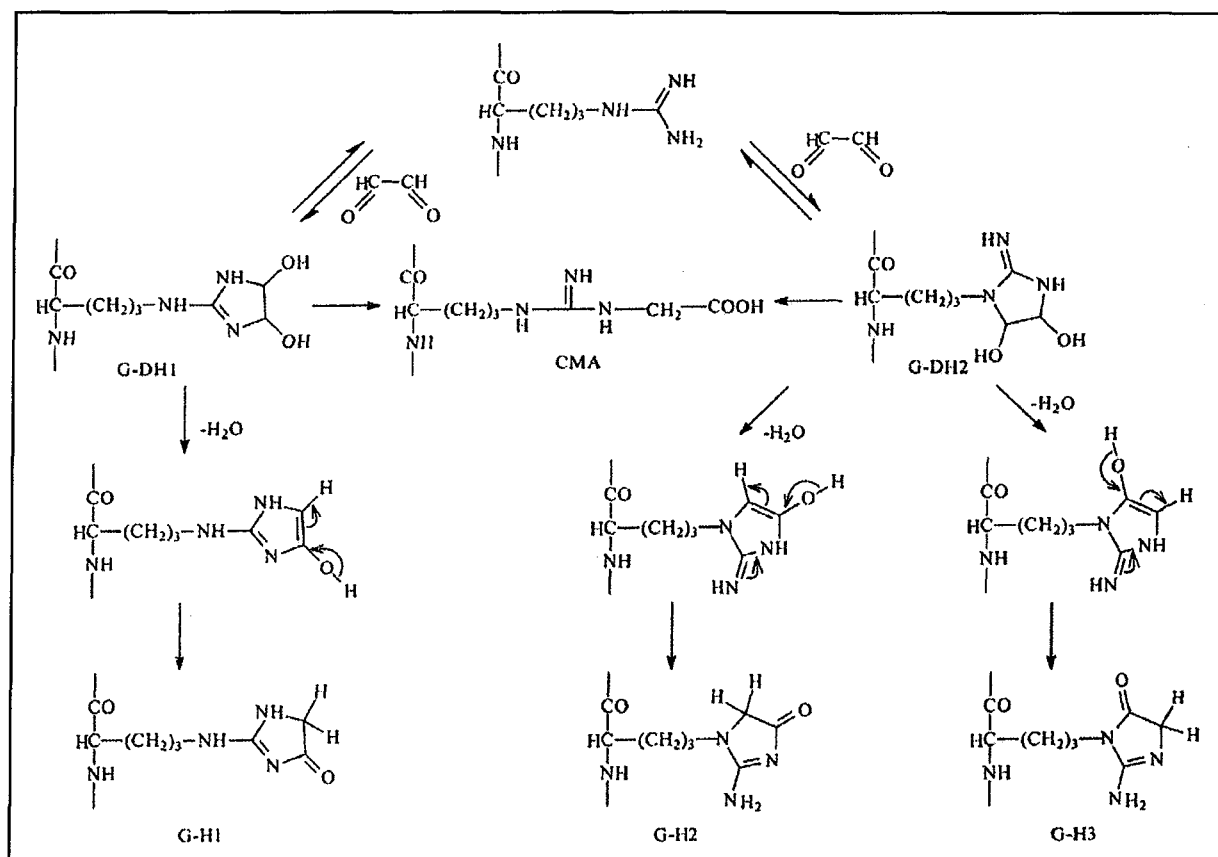


Réaction d'hydratation du formaldéhyde



Mécanismes de formation de ponts inter et intramoléculaires

□ **Avec le glyoxal**



Formation de dérivés dihydroxyimidazolidines (G-DH1 et G-DH2), de dérivés hydroimidazolones (G-H1, G-H2 et G-H3) et d'adduits N^ω-(carboxyméthyl)arginine (CMA) par réaction du glyoxal avec les résidus arginine des protéines [60].

VU

NANCY, le 5 mai 2008
Le Président de Thèse

Professeur F. PLENAT

NANCY, le 13 mai 2008
Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le 19 mai 2008

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1

Professeur J.P. FINANCE

RESUME DE LA THESE :

Le formol, utilisé dilué au 1/10^{ème} ou sous forme de fixateurs composés de formules variées, représente à l'heure actuelle l'agent fixant le plus employé en pathologie. C'est à partir de prélèvements fixés par des liquides à base de formaldéhyde qu'ont été établies les sémiologies macroscopiques et microscopiques d'une majorité de maladies et définis le plus grand nombre des paramètres pronostiques et prédictifs de la réponse thérapeutique. Le formol n'est, cependant, pas un fixateur idéal. Il présente notamment des risques pour la santé et a récemment été classé par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) comme cancérigène pour l'homme. La réglementation impose sa substitution si la mesure est techniquement possible. Ceci a conduit de nombreux fabricants à commercialiser des substituts qui, tout en étant « inoffensifs », présenteraient les qualités attendues d'un fixateur polyvalent pour l'histologie. Il s'agit, le plus souvent, de fixateurs composés à base de glyoxal. Dans notre travail, les propriétés fixatrices de plusieurs solutions de glyoxal ont été comparées à celles correspondantes du formol. Sur la plupart des points étudiés (respect de la microanatomie et de l'antigénicité, conservation des acides nucléiques, aptitude à conserver les pièces opératoires, biocidie, etc), les solutions de glyoxal se sont révélées très inférieures au formol. Elles ne peuvent donc être recommandées comme fixateur polyvalent.

TITRE EN ANGLAIS :

Glyoxal : a possible formaldehyde substitute in Pathology ?

THESE :

MEDECINE SPECIALISEE – ANNEE 2008

MOTS CLEFS :

Fixation, formaldéhyde, glyoxal, substitut, pathologie

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR :

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE-LES-NANCY Cedex