

## Nouveaux fixateurs en anatomie pathologique

Eudeline Alix

► **To cite this version:**

Eudeline Alix. Nouveaux fixateurs en anatomie pathologique : Etude comparative de 3 fixateurs non formolés FineFix, RCL2, Ethacarn. Biologie cellulaire. 2010. <hal-01360391>

**HAL Id: hal-01360391**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01360391>**

Submitted on 5 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

présenté par

Eudeline ALIX

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Nouveaux fixateurs en anatomie pathologique :  
Etude comparative de 3 fixateurs non formolés  
FineFix, RCL2, Ethacarn

soutenu le 15 décembre 2010 devant le jury suivant :

Pr Xavier RNOT : Président

Pr Françoise THIVOLET-BEJUI : Tuteur scientifique

Pr Jean-Marie EXBRAYAT : Tuteur pédagogique

Pr Jacqueline TROUILLAS : Rapporteur

Dr Philippe ROCHAIX : Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Professeur Françoise **Thivolet-Bejui**

Centre de Pathologie et Neuropathologie Est (HCL), 59 bd Pinel 69677 BRON Cedex

Francoise.thivolet-bejui@chu-lyon.fr

et de

Professeur Jean Marie **Exbrayat**

Laboratoire de Reproduction et Développement Comparé, Faculté Catholique de Lyon, 25 rue du Plat, 69288 Lyon cedex02

Jmexbrayat@univ-catholyon.fr

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Nouveaux fixateurs en anatomie pathologique : Etude comparative de 3 fixateurs non formolés :  
FineFix, RCL2, Ethacarn

Eudeline ALIX

Le formol est depuis plus d'un siècle le fixateur de référence dans les laboratoires d'anatomie pathologique. Or depuis quelques années le classement de ce fixateur comme carcinogène par l'OMS a conduit à une modification de la réglementation française mettant en avant la nécessité de diminuer le taux d'exposition à ce fixateur. Avec l'essor de la biologie moléculaire dans les années 90, l'étude des acides nucléiques sur les prélèvements fixés par le formol et ses dérivés s'avère difficile, la cryoconservation est alors préférée pour les études moléculaires. Mais après une quinzaine d'année d'application, le coût et les contraintes de ce système de conservation par le froid se sont révélés trop importants. Mon travail s'intègre dans un projet national visant à tester la substitution de la cryoconservation pour les études moléculaires, voir idéalement au remplacement du formol par de nouveaux fixateurs. Pour cela, trois fixateurs non formolés (FNF) (le Finefix, l'Ethacarn et le RCL2) ont été testés d'une part pour les techniques histologiques et d'autre part pour les techniques de biologie moléculaire.

L'analyse morphologique après coloration à l'HPS a permis de diagnostiquer l'ensemble des tumeurs pulmonaires et cérébrales lors de la fixation par un FNF, avec cependant une conservation moins bonne de la résolution chromatiniennne et de l'aspect général du cytoplasme lors de la fixation par le FineFix. L'analyse des immunomarquages a montré une intensité de marquage globalement plus forte dans le cas des fixateurs non formolés en comparaison de la fixation formolée.

La conservation des acides nucléiques après fixation non formolée a été évaluée quantitativement et qualitativement. La disponibilité des acides nucléiques, évaluée par les rendements d'extraction, est identique entre les FNF et la cryoconservation. La pureté des ADN extraits semble meilleure lors de la fixation par le RCL2. Les ADN présentent, quelque soit le FNF, un haut poids moléculaire comparable à celui obtenu après cryoconservation. A l'instar des ADN, la disponibilité des ARN est semblable entre les fixateurs non formolés et la cryoconservation. En revanche, la qualité des ARN après fixation par le FineFix est moindre en comparaison des deux autres fixateurs non formolés et de la cryoconservation. La fixation par l'Ethacarn aboutit aussi dans quelques cas à la conservation d'ARN de moindre qualité par

rapport à la cryoconservation. L'ensemble des résultats montre que la conservation tissulaire par le FineFix, quoique déjà utilisé dans certains laboratoires d'anatomie pathologique, est moins bonne en comparaison de celle par l'Ethacarn et le RCL2, tout en restant correcte. La distinction entre ces 2 derniers FNF, moins évidente, donne l'avantage au RCL2.

Avant le remplacement définitif du formol et de la cryoconservation par un FNF, plusieurs points doivent être vérifiés, telle que la stabilité des prélèvements après plusieurs années et la non toxicité des ces nouvelles substances.

**MOTS-CLES :** Fixateur, Formol, FineFix, Ethacarn, RCL2, cryoconservation, immunohistochimie, ADN, ARN, tumeurs pulmonaires, tumeurs cérébrales.

## TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

### Introduction.....11

### Rappels bibliographiques.....13

## PARTIE A : Tumeurs broncho-pulmonaires et cérébrales et l'implication de la biologie moléculaire dans leur évaluation.....13

### I- Tumeurs broncho-pulmonaires.....13

I-1- Classification histopathologique des tumeurs broncho-pulmonaires.....	13
I-1-1- Carcinomes épidermoïdes ou malpighiens.....	14
I-1-2- Adénocarcinomes.....	14
I-1-3- Carcinomes à petites cellules .....	15
I-1-4- Carcinomes à grandes cellules .....	15
I-1-5- Tumeurs carcinoïdes .....	16
I-2- Immunomarquages pour le diagnostic des tumeurs broncho-pulmonaires.....	16
I-2-1- Cytokératines.....	16
I-2-2- Facteur de transcription thyroïdienne 1.....	17
I-2-3- Marqueurs neuro-endocrines.....	17

### II- Tumeurs du système nerveux central.....18

II-1- Classification histopathologique des tumeurs du système nerveux central.....	18
II-1-1- Gliomes.....	19
II-1-1-a Astrocytomes .....	19
II-1-1-b- Glioblastomes.....	20
II-1-1-c- Oligodendrogliomes et oligoastrocytomes.....	20
II-1-1-d- Ependymomes.....	21
II-1-2- Tumeurs neuronales : gangliocytomes et gangliogliomes.....	21
II-1-3- Méningiomes.....	22
II-1-4- Schwannomes et neurofibromes : tumeurs de la gaine des nerfs.....	22
II-2- Immunomarquages pour le diagnostic des tumeurs du SNC.....	23
II-2-1- Immunomarquages des gliomes.....	23
II-2-2- Immunomarquages des tumeurs neuronales.....	23
II-2-3- Autres immunomarquages classiquement utilisés.....	24

### III- Implication de la biologie moléculaire en anatomie pathologique...24

III-1- Apport de la biologie moléculaire aux diagnostics tumoraux.....	24
III-2- Apport de la biologie moléculaire aux pronostics tumoraux.....	25
III-3- Apport de la biologie moléculaire à la prédiction thérapeutique.....	25
III-4- EGFr et tumeurs pulmonaires.....	26
III-4-1- Mutations du gène de l'EGFr.....	26
III-4-2- EGFr : facteur pronostique.....	26
III-4-3- EGFr : facteur prédictif.....	26
III-5- Délétions de 1p19q et tumeurs cérébrales.....	27
III-5-1- Délétions 1p et 19q.....	27
III-5-2- 1p19q : facteur diagnostique des oligoastrocytomes.....	27
III-5-3- 1p19q : facteur pronostique et prédictif des oligoastrocytomes .....	28

<b>PARTIE B : Fixation et cryoconservation.....</b>	<b>29</b>
<b>I- Formaldéhyde, formol et dérivés.....</b>	<b>29</b>
I-1- Historique des fixateurs formolés.....	29
I-2- Mécanismes de fixation.....	30
I-2-1- Mécanismes de fixation des protéines.....	30
I-2-2- Mécanismes de fixation des acides nucléiques.....	31
I-2-3- Mécanismes de fixation entre les protéines et les acides nucléiques.....	32
I-3- Cinétique de fixation.....	33
I-4- Influence de la fixation formolée sur l'analyse des protéines.....	33
I-5- Influence de la fixation formolée sur l'analyse des acides nucléiques.....	34
I-5-1- Action du fixateur et altérations des acides nucléiques.....	34
I-5-2- Effet de la composition du fixateur sur les acides nucléiques.....	36
I-5-3- Effet du pH du fixateur sur les acides nucléiques.....	36
I-5-4- Effet de la température de fixation.....	36
I-5-5- Effet du temps de fixation.....	37
I-5-6- Effet de la conservation des prélèvements formolés et paraffinés.....	37
<b>II- Cryoconservation.....</b>	<b>38</b>
II-1- Création des tumorothèques.....	38
II-2- Mécanisme physique de congélation.....	38
II-3- Avantages de la congélation.....	39
II-3-1- Pour les techniques histologiques.....	39
II-3-2- Pour les techniques moléculaires.....	39
II-4- Inconvénients de la congélation.....	39
II-4-1- Vitesse de congélation.....	39
II-4-2- Stabilité de la température.....	40
II-4-3 Morphologie tissulaire.....	40
II-5- Recommandations de l'HAS pour la cryoconservation.....	40
II-6- Contraintes d'utilisation pour les laboratoires à visée diagnostique.....	41
II-6-1- Coût d'achat et d'entretien.....	41
II-6-2- Surveillance des températures.....	42
II-6-3- Manipulation à risque de l'azote.....	42
II-6-4- Normes des locaux de stockage.....	42
II-6-5- Formation du personnel.....	43
<b>III- Fixateurs non formolés.....</b>	<b>43</b>
III-1- Prérequis nécessaires aux nouveaux fixateurs.....	44
III-2- Fixateur aldéhyde non formolé : le glyoxal.....	44
III-3- Fixateurs alcooliques.....	45
III-3-1- Mécanismes de fixation.....	45
III-3-2- FineFix.....	46
III-3-3- Le RCL2.....	46

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique  
AFA : alcool-formol-acide acétique  
ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé  
ARN : acide ribonucléique  
CD : cluster de différenciation  
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer  
CK : Cytokératine  
CMR : Agents cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction  
CPE : Centre de Pathologie Est  
DAB : Diaminobenzidine  
EDTA : *Ethylendiaminotetraacetic acid*

EGTA : *Ethylenglycotetraacetic acid*  
EMA : *Epithelial Membrane Antigen*  
EGFr: *Epidermal Growth Factor receptor*  
GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein*  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HCL : Hospices Civils de Lyon  
HER1 : *Human Epidermal Receptor 1*  
HPS : Hématoxyline Phloxine Safran  
HRP: Peroxydase de raitfort  
INCa : Institut National de lutte contre le Cancer  
ITK: Inhibiteur du domaine tyrosine kinase  
NCAM : *Neural Cell Adhesion Molecule*  
NeuN : *protein Neuronal Nuclei*  
NF : Neurofilament  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
SEM : Erreur Standard de la moyenne  
SNC : Système Nerveux Central  
TC : Prélèvements tumoraux cérébraux  
TMA : *Tissu MicroArray*  
TP : Prélèvements tumoraux pulmonaires  
TTF1 : Facteur de Transcription Thyroïdienne 1

Le diagnostic anatomopathologique est réalisé depuis plus d'un siècle sur des prélèvements fixés par le formol ou par un dérivé formolé. En 2004, le classement du formol en «agent cancérigène de classe I pour l'homme» par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a conduit les autorités françaises en 2007 à appliquer les « règles de prévention des risques d'exposition aux agents cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR) de catégorie 1 ou 2 » pour l'utilisation du formol [1-3]. La législation conduit à la baisse du taux d'exposition toléré pour le personnel médical et paramédical. De plus, le développement en anatomie pathologique des analyses moléculaires à visée diagnostique et pronostique a mis en évidence un déficit de conservation des macromolécules d'ADN, d'ARN, et des protéines dans les prélèvements fixés au formol [4]. La cryoconservation est une méthode alternative pour pallier ce problème de préservation des macromolécules. Des banques de prélèvements congelés à visée sanitaire, appelées tissuthèques ou tumorothèques, ont ainsi vu le jour et permettent l'application des techniques moléculaires à fort impact pronostique et prédictif sur les prélèvements conservés. Cependant la cryoconservation est un processus nécessitant de l'espace et un équipement spécifique onéreux et difficile à mettre en œuvre dans les laboratoires d'anatomie pathologique. Ces constatations ont conduit à la recherche d'un fixateur non formolé pouvant s'affranchir de la toxicité du formol, de la mauvaise conservation des macromolécules, et de la difficulté d'utilisation de la cryoconservation.

La découverte d'un fixateur « idéal » permettrait la réalisation de banques de tissus fixés et paraffinés de bonne qualité pour le diagnostic et l'analyse moléculaire des pathologies tumorales. En 2004, l'INCa a soutenu un projet national multicentrique piloté par le Dr Rochaix (CHU Toulouse) pour l'étude de la préservation des échantillons tumoraux par des nouveaux fixateurs non formolés. Cette étude regroupe les services d'anatomie pathologique de l'Institut Claudius Regaud de Toulouse (Dr Rochaix), coordinateur de l'étude, de l'Hôpital Henri Mondor de Créteil (Dr Leroy), de l'Institut Paoli Calmettes de Marseille (Pr Xerri), de l'hôpital de Montpellier (Pr Baldet) et des Hôpitaux Louis Pradel et Pierre Wertheimer des Hospices Civils de Lyon (Pr Thivolet-Bejui). La participation à cette étude de plusieurs centres d'anatomie pathologique a pour objectif de diversifier les recrutements tumoraux en fonction de la spécialité de chaque centre et, d'évaluer la reproductibilité inter-laboratoire des résultats observés. La centralisation des résultats doit permettre de conclure sur l'effet des fixateurs non formolés sur un large panel de tumeurs. Ce travail multicentrique aboutira à la rédaction d'une recommandation nationale afin d'uniformiser les méthodes de fixation aussi bien des pièces opératoires que des biopsies au sein des services d'anatomie pathologique français.

Au Centre de Pathologie Est des HCL, les inclusions portent sur des prélèvements tumoraux pulmonaires et cérébraux. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de recherche EPHE, travail au cours duquel j'ai réalisé l'étude comparative de trois fixateurs non formolés à base d'alcool : le FineFix, l'Ethacarn et le RCL2. J'ai testé ces fixateurs, sur les prélèvements tumoraux, à l'aide des techniques classiques d'anatomie pathologique et par des approches de biologie moléculaire.

# PARTIE A

## Tumeurs broncho-pulmonaires et cérébrales et implication de la biologie moléculaire dans leur évaluation

### I- Tumeurs broncho-pulmonaires

Le cancer broncho-pulmonaire est un problème majeur de santé publique. En France, entre 1978 et 2005, l'incidence du cancer broncho-pulmonaire est passée chez l'homme de 16 000 à 24 000 nouveaux cas par an et pour la femme de 1 600 à 6 700 [5, 6]. Durant cette même période, le nombre de décès a évolué de 15 000 à 21 000 décès chez l'homme et de 2 000 à 5 600 décès chez la femme. Au niveau mondial, le cancer broncho-pulmonaire est au quatrième rang des décès par cancer, soit un million de mort par an. Ces données montrent une augmentation constante de l'incidence et du taux de mortalité par cancer broncho-pulmonaire au cours des dernières décennies. La part masculine reste prépondérante dans la plupart des pays du monde avec 80 à 85% des cas ou des décès. Dans les pays industrialisés, on note ces dernières années une augmentation de l'incidence du cancer broncho-pulmonaire et de la mortalité chez la femme due à l'augmentation du tabagisme féminin, alors qu'une décroissance s'amorce chez l'homme. Malheureusement, l'efficacité thérapeutique n'ayant pas évolué de façon significative au cours des 30 dernières années, la survie reste de l'ordre de 10 % des patients à 5 ans [7].

Après une introduction sur la classification histopathologique des tumeurs broncho-pulmonaires, leur sex-ratio et leurs causes, chaque type tumoral sera décrit. Afin d'aider à la compréhension de cette classification, la figure 1 rappelle l'anatomie et l'histologie du poumon et la figure 2 schématise la classification des tumeurs broncho-pulmonaires. Le chapitre se terminera par l'explication de l'utilisation des immunomarquages dans le diagnostic des tumeurs broncho-pulmonaires.

#### I-1- Classification histopathologique des tumeurs broncho-pulmonaires

Les tumeurs broncho-pulmonaires sont constituées à 99 % par des carcinomes, c'est-à-dire des tumeurs malignes des épithéliums de revêtement [8, 9]. En histopathologie, les carcinomes broncho-pulmonaires sont subdivisés en 5 principaux types : i) les carcinomes épidermoïdes ou malpighiens, ii) les adénocarcinomes, iii) les carcinomes à petites cellules, iv) les carcinomes à grandes cellules et, v) les tumeurs carcinoïdes.

La fréquence des carcinomes broncho-pulmonaires varie seulement pour les carcinomes épidermoïdes et pour les adénocarcinomes. En effet, les carcinomes épidermoïdes représentent 44 % des tumeurs broncho-pulmonaires primitives chez l'homme et seulement 25 % chez la femme. Inversement les adénocarcinomes sont plus fréquents chez la femme (42 %) que chez l'homme (28 %).

##### I-1-1- Carcinomes épidermoïdes ou malpighiens

Les carcinomes épidermoïdes ou malpighiens sont des tumeurs épithéliales malignes [9]. Ces tumeurs sont proximales car elles se développent surtout au niveau des bronches souches ou de leurs principales branches. Macroscopiquement, elles peuvent avoir l'aspect d'un bourgeon endobronchique obstructif ou d'une volumineuse masse excavée occupant la totalité d'un lobe. Ces tumeurs naissent à partir des cellules épithéliales bronchiques ciliées qui, sous l'influence du tabac, se transforment par un phénomène de métaplasie en cellules malpighiennes qui se cancérisent. Les cellules tumorales sont caractérisées par la présence de ponts d'union intercellulaires et d'une kératinisation extracellulaire en « perles de kératine », plus ou moins développée, appelée « globes cornés ». Ces caractéristiques varient en fonction du degré de différenciation de la tumeur. Des plages de nécrose et d'hémorragies sont fréquentes. Il existe quatre formes de carcinomes épidermoïdes : i) « papillaires », ii) « à cellules claires », iii) « à petites cellules » et, iv) « basaloides ».

##### I-1-2- Adénocarcinomes

Les adénocarcinomes sont des tumeurs épithéliales malignes à différenciation glandulaire [9]. Développés généralement à la périphérie du poumon, ils sont lobulés et bien limités. Les adénocarcinomes peuvent provenir d'une part des cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et bronchiolaire et d'autre part des glandes bronchiques. Ils peuvent aussi provenir des cellules de Clara bronchiolaires et des pneumocytes de type II des alvéoles pulmonaires. Les adénocarcinomes sont définis par leur architecture. De plus, ils sont plus ou moins différenciés en fonction de leur caractère sécrétant. Les phénomènes de nécrose et d'hémorragie sont moins fréquents que pour les carcinomes

épidermoïdes précédemment décrits.

Il existe quatre sous-types d'adénocarcinomes qui sont par ordre de fréquence décroissante : i) les adénocarcinomes acineux constitués de cellules cylindriques regroupées en tubules ou en acini, ii) les adénocarcinomes papillaires agencés en papilles dotées d'un stroma fibrovasculaire qui remplace l'architecture alvéolaire normale, iii) les carcinomes bronchiolo-alvéolaires constitués de cellules tumorales cylindriques qui prolifèrent le long des parois alvéolaires et respectent la structure originale des alvéoles, iv) les adénocarcinomes solides constitués de vastes lobules sans acini, tubes ou papilles. Le sous-type le plus fréquent est l'adénocarcinome mixte qui associe plusieurs sous-types différents.

### **I-1-3- Carcinomes à petites cellules**

Les carcinomes à petites cellules sont des tumeurs épithéliales neuro-endocrines de haut grade de malignité [9]. Macroscopiquement, ce sont des tumeurs qui se développent au niveau des bronches souches et des bronches lobaires. Elles sont caractérisées par des petites cellules rondes ou ovales, moins de trois fois la taille d'un lymphocyte, avec un cytoplasme insignifiant d'où le nom de cellules en « grains d'avoine ». La chromatine est finement granulaire dite en « poivre et sel » et le nucléole inexistant. L'index mitotique est très élevé. Par conséquent, ces tumeurs envahissent rapidement et largement la paroi bronchique et le parenchyme pulmonaire.

### **I-1-4- Carcinomes à grandes cellules**

Les carcinomes à grandes cellules sont des tumeurs épithéliales indifférenciées [9]. Elles sont dépourvues des caractéristiques des carcinomes à petites cellules, des carcinomes épidermoïdes et des adénocarcinomes. Le diagnostic est fait par exclusion. Ces tumeurs sont constituées de cellules de grande taille aux noyaux volumineux et aux nucléoles proéminents. Les limites cytoplasmiques sont nettes et les cytoplasmes abondants. Elles sont souvent nécrotiques. Il existe plusieurs sous-types dont le plus important est le carcinome neuro-endocrine à grandes cellules, tumeurs de haut grade de malignité [9, 10]. Les cellules sont de grande taille, environ trois fois la taille des lymphocytes, avec un cytoplasme abondant. Les nucléoles sont fréquemment visibles. Les cellules sont agencées en lobules souvent rétractés ou en rosette. La nécrose centro-lobulaire est fréquente. Les autres sous-types de carcinomes neuro-endocrines à grandes cellules sont : i) les basaloïdes, ii) les lymphoépithéliomes, iii) ceux à cellules claires et, iv) ceux de phénotype rhabdoïde.

### **I-1-5- Tumeurs carcinoïdes**

Les tumeurs carcinoïdes sont des tumeurs de bas grade de malignité ou de grade intermédiaire [9]. Elles sont issues des cellules neuro-endocrines du poumon. Macroscopiquement, elles peuvent avoir l'aspect d'un bourgeon endobronchique proximal infiltrant la paroi bronchique ou d'une masse bien limitée périphérique. Les cellules sont polygonales, uniformes avec une chromatine fine et un nucléole presque inexistant. Leur cytoplasme est peu ou modérément éosinophile. Elles prolifèrent sous forme de cordons, d'îlots, travées ou acini. Il existe deux sous-types de tumeurs carcinoïdes : i) typique si le nombre de mitoses est inférieur à 2 pour  $2 \text{ mm}^2$  sans nécrose tumorale, ii) atypique si le nombre de mitoses est compris entre 2 et 10 pour  $2 \text{ mm}^2$  et/ou s'il existe de la nécrose tumorale.

## **I-2- Immunomarquages pour le diagnostic des tumeurs broncho-pulmonaires**

En pratique quotidienne, les immunomarquages sont nécessaires, voire indispensables, pour certains diagnostics [11]. Ils servent dans le diagnostic différentiel : i) entre une lésion tumorale ou non tumorale, ii) entre la nature épithéliale, conjonctive ou hématopoïétique d'une tumeur indifférenciée et, iii) entre la nature primitive ou métastatique d'un adénocarcinome en indiquant l'organe d'origine de cette tumeur. L'immunomarquage peut être prescrit sur des biopsies de qualité non optimisée où les critères morphologiques sont ininterprétables (petite taille de la biopsie ou prolifération tumorale écrasée). Les immunomarquages importants dans le diagnostic des carcinomes broncho-pulmonaires reposent sur la détection de diverses cytokératines, du facteur de transcription thyroïdienne 1 (TTF1) et des marqueurs neuro-endocrines.

### **I-2-1- Cytokératines**

Les cytokératines (CK) constituent les filaments intermédiaires des cellules épithéliales [12]. Elles sont regroupées en deux groupes : le groupe I composé des cytokératines acides et le groupe II composé des cytokératines basiques et neutres [13]. Une combinaison de ces deux groupes est exprimée dans les cellules épithéliales normales et lors de la transformation maligne de ces cellules. Associées à la morphologie tumorale, les cytokératines permettent d'affirmer la

nature épithéliale des tumeurs. Par exemple, il existe un anticorps, le KL1, qui met en évidence un panel de cytokératine [14]. L'immunomarquage anti-CK5/6 permet l'identification des carcinomes épidermoïdes par rapport aux adénocarcinomes et aux carcinomes neuro-endocrines [15]. D'autres cytokératines permettent de déterminer l'origine tissulaire des cellules tumorales. Par exemple, l'expression combinée ou non, de la CK7 et de la CK20 est spécifique de certains organes [15-17]. Ainsi, les métastases pulmonaires d'adénocarcinomes coliques n'expriment que la CK 20, alors que les adénocarcinomes pulmonaires primitifs n'expriment que la CK7.

### **I-2-2- Facteur de transcription thyroïdienne 1**

Le facteur de transcription thyroïdienne 1 (TTF1) est un facteur nucléaire de transcription impliqué dans l'embryogenèse du poumon et de la thyroïde [11, 16-19]. Dans le poumon normal adulte, il est exprimé par les pneumocytes de type II et les cellules de Clara. Le TTF1 est spécifique des adénocarcinomes d'origine pulmonaire et thyroïdienne et, permet de différencier un adénocarcinome primitif pulmonaire d'une métastase.

### **I-2-3- Marqueurs neuro-endocrines**

Les tumeurs neuro-endocrines expriment 3 critères de différenciation spécifiques : le CD 56, la synaptophysine et la chromogranine A [20, 21]. Le CD56 ou NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) est une glycoprotéine qui intervient dans l'adhésion intercellulaire des cellules neurales et des cellules neuro-endocrines. La synaptophysine est une glycoprotéine membranaire présente dans les vésicules présynaptiques des neurones et des cellules neuro-endocrines. La chromogranine A est une protéine prohormone largement exprimée dans les granules de sécrétion des cellules endocrines, neuro-endocrines et des neurones. Un seul marqueur positif est suffisant pour faire le diagnostic de tumeur neuro-endocrine. L'immunomarquage doit être spécifique. Cependant, certaines exceptions demeurent : i) 20 % des carcinomes à petites cellules n'expriment pas de marqueurs neuro-endocrines; ii) certains adénocarcinomes et carcinomes épidermoïdes peuvent présenter un marqueur neuro-endocrine positif avec moins de 20 % de cellules tumorales marquées.

## **II- Tumeurs du système nerveux central**

Les tumeurs du système nerveux central (SNC) se situent, par leur fréquence, au 15<sup>ème</sup> rang des cancers chez l'homme et chez la femme, avec 4 120 nouveaux cas estimés en 2005 [6]. Elles représentent 1,3 % des nouveaux cas diagnostiqués de cancer par an. Le sex-ratio est de 1,4 en faveur des hommes. En 2005, 3 019 décès ont été répertoriés, situant ainsi les tumeurs du SNC au 14<sup>ème</sup> rang des décès par cancer en France. Malgré leur faible incidence par rapport aux cancers pulmonaires et mammaires, les tumeurs du SNC ont des conséquences particulières de par leur localisation confinée dans la boîte crânienne ou la moelle épinière. En effet, malgré le caractère bénin de certains types tumoraux, ces tumeurs peuvent induire des évolutions cliniques graves voire mortelles.

Ce chapitre rappelle la classification des tumeurs du système nerveux et les immunomarquages utiles au diagnostic histopathologique.

### **II-1- Classification histopathologique des tumeurs du système nerveux central**

La classification complexe des tumeurs primitives du SNC est basée sur l'histogenèse de ce dernier. En effet, le SNC dérive d'une formation neuro-ectodermique appelée gouttière neurale. Cette dernière se ferme en tube neural bordé de deux crêtes neurales. Les cellules du tube neural ont deux voies d'évolution possibles : elles deviennent : i) soit des cellules gliales regroupant les astrocytes, les oligodendrocytes et les épendymocytes, ii) soit des neurones. Les cellules des crêtes neurales sont à l'origine des méninges du SNC et des cellules de Schwann. L'histogenèse du SNC explique que les tumeurs primitives du SNC soient des tumeurs neuro-épithéliales et pas des tumeurs épithéliales, ni conjonctives.

Les tumeurs développées à partir des cellules gliales sont des gliomes. Certaines tumeurs du SNC peuvent renfermer des neurones tumoraux dits « ganglionnaires ». Elles sont appelées gangliocytomes lorsque les neurones constituent la totalité de la population cellulaire et gangliogliomes lorsque des cellules tumorales neuronales et gliales sont mélangées. Issues des crêtes neurales, les cellules méningées peuvent être à l'origine des méningiomes, les cellules de Schwann des schwannomes (ou neurinomes) et des neurofibromes.

Le SNC est aussi le siège d'autres tumeurs primaires (les tumeurs embryonnaires neuro-ectodermiques, les tumeurs non neuro-ectodermiques comme les tumeurs germinales, les tumeurs hématopoïétiques et conjonctives) et de tumeurs secondaires (les métastases). Ces tumeurs ne feront pas l'objet de cette étude.

Le diagnostic histopathologique des tumeurs cérébrales est toujours être corrélé à l'âge de survenue et à la



topographie des tumeurs. Il comprend aussi un grade pronostique de I à IV en fonction des critères de malignité de la tumeur. Les tumeurs de grade I sont de bon pronostic et celles de grades IV sont de très mauvais pronostic.

## **II-1-1- Gliomes**

Les cellules gliales sont à l'origine des gliomes qui représentent plus de la moitié des tumeurs neuro-épithéliales [22]. Ces gliomes sont classés selon le type et la proportion des cellules gliales composant la tumeur et selon les signes de malignité : densité cellulaire, atypies cellulaires et nucléaires, mitoses, vaisseaux et nécrose tumorale. Les gliomes regroupent : i) les astrocytomes, ii) les glioblastomes, iii) les oligodendrogliomes, iv) les oligoastrocytomes et, v) les épendymomes.

### **II-1-1-a- Astrocytomes**

Les astrocytes non tumoraux n'ont pas de cytoplasme bien distinct sur les coupes histologiques colorées par la coloration trichromique HPS [22]. Leurs noyaux sont ovales à ronds. Ils ont une chromatine de taille intermédiaire et un petit nucléole. Les astrocytes sont à l'origine des astrocytomes de 3 types : pilocytiques, diffus et anaplasiques.

Les astrocytomes pilocytiques sont des tumeurs de grade I dont la cellularité est faible à modérée. Ils sont constitués, d'une part, par des astrocytes pilocytiques à prolongements bipolaires qui se regroupent en faisceaux avec des fibres de Rosenthal, conglomérat de gliofibrilles et, d'autre part, par des cellules clarifiées avec des microkystes et des corps granuleux. Les noyaux peuvent être polymorphes ou hyperchromatiques. Il peut exister une prolifération vasculaire et une infiltration leptoméningée sans que cela soit des signes de malignité. Les mitoses sont rares et il n'y a pas de plages de nécrose.

Les astrocytomes diffus sont des tumeurs de grade II avec un degré de différenciation cellulaire important. Dans ces tumeurs, ils existe 2 types d'astrocytes : gémistocytiques et fibrillaires. Les astrocytes gémistocytiques sont caractérisés par un abondant cytoplasme éosinophile au noyau excentré à la chromatine dense et au nucléole bien visible. Si le nombre de cellules gémistocytaires est supérieur à 20 %, ces astrocytomes diffus sont dits gémistocytiques. Les astrocytes fibrillaires sont caractérisés par un cytoplasme mal visible sur un fond fibrillaire, créant l'impression de noyau nu. La densité cellulaire et les atypies nucléaires permettent la distinction avec les astrocytes normaux. Ces astrocytomes diffus sont alors dits fibrillaires. Les astrocytomes diffus ont une croissance lente comme les astrocytomes pilocytiques, cependant ils ont tendance à progresser vers une forme maligne d'astrocytomes dits anaplasiques, voire d'évoluer vers les glioblastomes.

Les astrocytomes anaplasiques sont des tumeurs malignes de grade III, caractérisées par une grande densité cellulaire et par la présence de mitoses, et qui peuvent évoluer en glioblastomes. Les astrocytes tumoraux présentent des atypies nucléaires importantes : un pléomorphisme nucléaire (taille et forme des noyaux irrégulières) et une chromatine dispersée et grossière.

### **II-1-1-b- Glioblastomes**

Les glioblastomes [22] sont des tumeurs malignes de grade IV de très mauvais pronostic pouvant apparaître rapidement *de novo*. Ils sont dits glioblastomes primaires. Les glioblastomes secondaires se développent lentement à partir d'astrocytomes diffus ou d'astrocytomes anaplasiques. Ces tumeurs sont caractérisées par un pléomorphisme cellulaire : les cellules tumorales peuvent être petites et peu différenciées ou de morphologie astrocytaire jusqu'à une taille géante. Les glioblastomes présentent des atypies nucléaires et une activité mitotique élevée. Des plages de nécrose tumorale et la prolifération vasculaire et endothéliale sont les éléments indispensables au diagnostic.

### **II-1-1-c- Oligodendrogliomes et Oligoastrocytomes**

Les oligodendrogliomes sont des tumeurs dérivées des oligodendrocytes [22]. Les oligodendrocytes ont une fonction de myélinisation des axones dans la substance blanche et une fonction de soutien au niveau de la substance grise où ils se regroupent autour des neurones. Les oligodendrogliomes se développent surtout dans la substance blanche des hémisphères cérébraux. Ces tumeurs sont constituées de nappes homogènes de cellules tumorales. Les noyaux sont ronds, uniformes avec une chromatine finement granuleuse avec deux petits renforcements chromatiniens en « bouton de chemise ». Lors des colorations HPS de routine, leurs cytoplasmes apparaissent vacuolisés avec un halo clair périnucléaire. Bien que résultant d'un artefact de coloration, cette caractéristique est une aide au diagnostic. Les membranes cellulaires sont bien délimitées. Un réseau de petits vaisseaux anastomosés se forme au sein de la tumeur ainsi que des foyers de calcifications microscopiques. Actuellement aucun marqueur immunohistochimique ne caractérise les oligodendrogliomes. Généralement d'évolution relativement bénigne, ils sont dits de bas grade ou grade II. Cependant

certaines oligodendrogliomes peuvent être anaplasiques de grade III, si ils présentent un pléomorphisme nucléaire, un index mitotique élevé, de la nécrose, et une prolifération endothéliale intravasculaire, correspondant à une croissance rapide.

Les oligoastrocytomes ou gliomes mixtes sont des tumeurs associant un contingent tumoral oligodendroglial et un contingent tumoral astrocytaire. Ils peuvent acquérir des caractères malins (augmentation de la cellularité, atypies nucléaires, pléomorphisme et forte activité mitotique) et devenir anaplasiques. La présence de vaisseaux proliférants et de nécrose les classe en grade III.

#### **II-1-1-d- Ependymomes**

Les épendymomes sont des tumeurs provenant des épendymocytes qui bordent le système ventriculaire [22]. Les cellules tumorales sont piriformes et leurs noyaux sont ronds ou ovales avec une chromatine fine et un petit nucléole. Elles se disposent en pseudo-rosettes autour des vaisseaux sanguins avec des zones périvasculaires riches en fibrilles gliales et dépourvues de noyaux. Des petits foyers tumoraux ébauchant des tubes épithéliaux peuvent exister au sein de la tumeur et rappeler la structure ventriculaire. Les épendymomes sont de grade II ou III.

#### **II-1-2- Tumeurs neuronales : gangliocytomes et gangliogliomes**

Les gangliocytomes sont des tumeurs de grade I composées de cellules ganglionnaires matures tumorales aussi appelés neurones ganglionnaires [22]. Ces neurones sont larges, multipolaires et arrangés irrégulièrement. Ils peuvent présenter des caractères dysplasiques et dysmorphiques et reposent sur un stroma glial non tumoral.

Dans certaines tumeurs, ces neurones ganglionnaires sont combinés à des cellules tumorales gliales. On parle alors de gangliogliomes. Les neurones tumoraux, en quantité variable, sont regroupés en amas mélangés avec des cellules gliales, surtout des astrocytes d'apparence pilocytique. Ces amas sont entourés de fibres de réticuline et la nécrose tumorale est généralement absente. Ces tumeurs sont de grade I ou III.

#### **II-1-3- Méningiomes**

Les méningiomes sont des tumeurs, le plus souvent bénignes, naissant des cellules de la leptoméninge [22]. Il existe diverses formes de méningiomes : i) méningothéliaux, ii) fibreux ou fibroblastiques, iii) transitionnels ou mixtes et, iv) psammomateux.

Le type méningothélial est formé de cellules ressemblant aux cellules arachnoïdiennes . Ses cellules tumorales sont uniformes avec un noyau ovale et une chromatine fine. Il peut exister des inclusions cytoplasmiques et intranucléaires. Le type fibreux/ fibroblastique est constitué par des faisceaux de cellules dans une matrice riche en collagène. Le type transitionnel ou mixte est l'association d'une composante méningothéliale et d'une composante fusiforme riche en « tourbillon » cellulaire. Les méningiomes psammomateux possèdent de nombreux foyers de calcification appelés psammomes ou calcosphérites au centre d'enroulements cellulaires.

#### **II-1-4- Schwannomes et neurofibromes : tumeurs de la gaine des nerfs**

Les schwannomes ou neurinomes sont des tumeurs des nerfs périphériques, composées de cellules de Schwann néoplasiques [22]. Celles-ci ont des cytoplasmes fusiformes éosinophiles sans limite cellulaire discernable. Deux zones cellulaires s'alternent en proportion variée. La zone A d'Antoni est une zone compacte à forte densité cellulaire où les noyaux des cellules tumorales fusiformes peuvent prendre une disposition de palissades qui forment les nodules de Verocay. La zone B d'Antoni est une région tumorale dégénérative d'aspect lâche et vacuolisée qui peut contenir des lipides.

Les neurofibromes sont des tumeurs des nerfs périphériques, le plus souvent bénignes, naissant des cellules périnerveuses. Ils peuvent rester confinés à l'intérieur de nerfs larges maintenus par l'épinerve, ou diffuser dans le derme sous-jacent et les tissus mous dans le cas de nerfs fins. Les neurofibromes sont composés en grande partie par des cellules de Schwann mélangées à des fibroblastes dans une matrice de fibres de collagène, noyées dans une substance mucoïde. Ces cellules tumorales sont plus petites que celles contenues dans les schwannomes. Les noyaux peuvent être atypiques, mais les mitoses sont rares.

#### **II-2- Immunomarquages pour le diagnostic des tumeurs du SNC**

Les immunomarquages utilisés pour le diagnostic des gliomes reposent sur la détection de la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), de l'EMA (*Epithelial Membrane Antigen*), de la vimentine, et la protéine S100 (*PS100*).

D'autres immunomarquages aident au diagnostic des tumeurs d'origine neuronale par détection des neurofilaments (*NF*), du NeuN (*Neuronal Nuclei*), de la synaptophysine et de la chromogranine A. La prolifération tumorale peut être estimée par l'immunomarquage anti-Ki67 et la nature endothéliale de cellules est mise en évidence par l'immunomarquage anti-CD 34.

### **II-2-1- Immunomarquages des gliomes**

La GFAP est le principal filament intermédiaire des astrocytes matures dans le système nerveux central et des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique [23, 24]. Les astrocytomes et les glioblastomes présentent un marquage positif. La GFAP est absente des oligodendrocytes et des épendymocytes normaux. Cependant, elle peut être exprimée par leurs tumeurs respectives, l'oligodendrogliome et l'épendymome. Les méningiomes n'expriment pas la GFAP et les schwannomes l'expriment rarement.

### **II-2-2- Immunomarquages des tumeurs neuronales**

La protéine NeuN est une protéine nucléaire qui se fixe à l'ADN. Son immunomarquage est détectable spécifiquement dans les cellules tumorales qui présentent une différenciation neuronale [25]. Il en est de même pour les immunomarquages ciblant les neurofilaments (*NF*), la synaptophysine et la chromogranine A. Les *NF* sont les filaments intermédiaires des neurones au niveau des axones et des dendrites [26]. La synaptophysine et la chromogranine A, présentées dans le cadre des tumeurs pulmonaires neuroendocrines, sont aussi utilisées dans le diagnostic des tumeurs cérébrales [27]. En effet, les neurones de la substance grise présentent un marquage granulaire et diffus de la synaptophysine au niveau du neuropile, zone d'enchevêtrement des axones et des dendrites, en revanche les corps cellulaires sont négatifs. Les gangliogliomes et les gangliocytomes présentent un marquage intense à la périphérie des corps cellulaires. L'immunomarquage est négatif dans les gliomes sauf dans les glioblastomes. La chromogranine A marque les neurones ganglionnaires tumoraux des gangliocytomes et des gangliogliomes.

### **II-2-3- Autres immunomarquages classiquement utilisés**

L'immunomarquage anti-Ki67 permet l'évaluation de la prolifération des cellules tumorales [28]. Cet immunomarquage met en évidence un antigène situé dans le nucléole en dehors de la phase G0 du cycle cellulaire (phases G1, S, G2 et M). L'index de prolifération est le pourcentage de cellules marquées par rapport à la totalité des cellules tumorales présentes. Ce marqueur est utilisé comme facteur pronostic. Dans les méningiomes, une forte corrélation existe entre l'index de prolifération et le grade.

Le CD34 est une glycophosphoprotéine membranaire exprimée par les cellules endothéliales et notamment au sein du tissu cérébral en développement et adulte. A l'exception des cellules précurseurs lors de la neurulation, les cellules neuroépithéliales n'expriment pas le CD34. Le CD34 est exprimé dans les gangliogliomes et les gangliocytomes, mais pas dans les neurones inclus dans les oligodendrogliomes ou les astrocytomes.

## **III- Implication de la biologie moléculaire en anatomie pathologique**

L'application récente de la biologie moléculaire dans les laboratoires d'anatomie pathologique est essentielle pour l'analyse des tumeurs afin : i) de servir au diagnostic en affinant la classification de la tumeur, ii) d'indiquer des hypothèses pronostiques et, iii) de prédire les réponses du patient aux thérapeutiques proposées [29]. La progression des techniques de biologie moléculaire a aussi permis de déterminer une trentaine de gènes de prédisposition héréditaire au développement d'un cancer. Moins de 10 % des cancers humains sont le résultat de ces prédispositions, mais le risque de développer le cancer est alors de 70 %.

### **III-1- Apport de la biologie moléculaire aux diagnostics tumoraux**

Les progrès de la biologie moléculaire ont permis une amélioration du diagnostic tumoral en affinant la classification à l'aide des caractéristiques génétiques spécifiques de certaines tumeurs. Par exemple, les délétions de séquence d'ADN 1p et 19q sont utilisées dans le diagnostic des oligodendrogliomes. La valeur diagnostic de ces anomalies génétiques sera expliquée dans le paragraphe III-5.

### **III-2- Apport de la biologie moléculaire aux pronostics tumoraux**

Le pronostic des tumeurs est classiquement réalisé à partir de critères clinicopathologiques tels la taille de la tumeur, son

type histologique, son degré de différenciation, son grade histologique, l'envahissement ganglionnaire et la présence de métastases. Cependant ces facteurs anatomopathologiques peuvent être insuffisants pour prévoir l'évolution clinique d'un cancer. Certains gènes impliqués dans les cancers et l'étude de leur mutation, sont susceptibles de donner des informations sur l'évolution de la pathologie. On parle alors de « marqueurs pronostiques moléculaires » ou de « signatures génomiques pronostiques » [30]. La présence ou l'absence d'une mutation donnera un pronostic différent, selon le gène et cela indépendamment de l'effet du traitement [8]. Ainsi, une augmentation de l'expression des gènes de synthèse et de réparation de l'ADN dans les cancers pulmonaires non à petites cellules est corrélée avec un meilleur pronostic. A l'opposé, si dans les marges saines de ce type de tumeur, il existe des mutations du gène de la protéine suppresseur de tumeur p53 ou des amplifications du proto-oncogène c-Myc, on a un risque plus important de récurrence de la tumeur.

### **III-3- Apport de la biologie moléculaire à la prédiction thérapeutique**

L'altération de certains gènes est responsable de la sensibilité ou de la résistance de la tumeur à un traitement spécifique. Ces altérations sont dites « marqueurs prédictifs » ou « signatures prédictives » et permettent d'anticiper la réponse individuelle des patients aux différentes options thérapeutiques existantes [30]. Ces marqueurs réduisent ainsi le nombre de patients traités inutilement et permettent d'économiser des thérapies lourdes et onéreuses, induisant des effets secondaires non négligeables. A titre d'exemple, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFr) est un très bon facteur prédictif des tumeurs du poumon. Cet exemple est détaillé dans le paragraphe ci-dessous.

### **III-4- EGFr et tumeurs pulmonaires**

L'EGFr (*Epidermal Growth Factor receptor*), également nommé HER1 (*Human Epidermal Receptor 1*), est un récepteur glycoprotéique transmembranaire à activité tyrosine kinase [8, 31, 32]. La fixation de son ligand, le facteur de croissance épithélial (*EGF*), sur le domaine extracellulaire du récepteur induit une dimérisation du récepteur et une autophosphorylation de son domaine intracellulaire tyrosine kinase, qui initie la transduction de signaux intracellulaires aboutissant en particulier à la stimulation de la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose.

#### **III-4-1- Mutations du gène de l'EGFr**

Le gène de l'EGFr, localisé sur le chromosome 7, est constitué de 28 exons et code pour une protéine de 170 kDa. Ce gène est sujet à des mutations somatiques retrouvées uniquement dans les adénocarcinomes [31, 32]. Au niveau des exons 19 à 21, qui codent pour le domaine catalytique tyrosine kinase intracellulaire, se trouvent les 3 mutations principales du gène de l'EGFr. Une délétion d'une vingtaine de paires de base à partir du codon 746 de l'exon 19 est dite E746-750. Une mutation ponctuelle par transition d'une thymine en guanine, au niveau du codon 858 de l'exon 21, est appelée mutation L858R. Ces deux premières mutations aboutissent à l'activation constitutive de la protéine EGFr. Une mutation faux-sens (T790M) dans l'exon 20, qui code pour un domaine spécifique de liaison de l'ATP situé dans le domaine tyrosine kinase, est aussi une mutation activatrice.

#### **III-4-2- EGFr : facteur pronostique**

Les mutations géniques de l'EGFr sont des facteurs pronostiques de la survie des patients atteints d'un adénocarcinome. Cependant les mutations n'ont pas la même valeur pronostique. Par exemple, les patients qui présentent la délétion E746-750 ont une meilleure survie que les patients porteurs de la mutation L858R.

#### **III-4-3- EGFr : facteur prédictif**

Au cours des années 90, des inhibiteurs du domaine tyrosine kinase (ITK) de l'EGFr ont été développés (gefitinib<sup>®</sup> et erlotinib<sup>®</sup>). 10 % des patients atteints d'adénocarcinome présentent une réponse aux traitements thérapeutiques par un ITK. Ces réponses sont corrélées à des facteurs clinico-histopathologiques particuliers : le statut non fumeur du patient, le sexe féminin, l'origine asiatique et une histologie de type adénocarcinome en particulier le sous-type bronchiolo-alvéolaire. Cependant, ces facteurs cliniques prédisent la réponse aux ITK que dans 30% des cas environ. L'étude immunohistochimique du caractère prédictif de l'EGFr est controversée en raison d'une hétérogénéité des techniques utilisées et du système de notation employé. Dans ce contexte, la recherche des mutations du domaine tyrosine kinase du gène de l'EGFr aboutit à de meilleurs facteurs prédictifs de la réponse aux traitements par ITK. En effet, le taux de réponse positif au traitement est d'environ 60 % en présence de mutations. La mutation E746-750 et la mutation L858R correspondent à presque 90% des mutations retrouvées dans les CPNPC sensibles aux ITK. Ces mutations du

gène EGFr perdent cependant de leur puissance prédictive de réponse aux ITK, si le patient à été préalablement traité par chimiothérapie. A l'opposé, la mutation T790M est une mutation qui empêche les ITK d'interagir sur leur cible. Les tumeurs qui expriment cette mutation T790M, échappent au traitement anti-EGFr.

### **III-5- Délétions de 1p19q et tumeurs cérébrales**

Le diagnostic différentiel entre les astrocytomes et les oligodendrogliomes peut parfois être délicat en raison du recouvrement morphologique de ces deux types de tumeurs et l'absence d'immunomarquage spécifique des oligodendrogliomes. Pourtant la distinction entre ces deux tumeurs gliales est très importante pour la prise en charge thérapeutique et le pronostic de survie du patient. La perte d'hétérozygotie au niveau des chromosomes 1 et 19 a été mise en évidence dans les oligodendrogliomes. Ces anomalies génétiques sont corrélées à une forte valeur diagnostique, pronostique et prédictive de la réponse à la chimiothérapie [33].

#### **III-5-1- Délétions 1p et 19q**

Il existe deux délétions de séquence d'ADN étudiées lors de l'établissement du diagnostic d'oligodendrogliomes : i) la délétion 1p qui correspond à la perte du bras court du chromosome n°1 et, ii) la délétion 19q qui correspond à la perte du bras long du chromosome n°19.

#### **III-5-2- 1p19q : facteur diagnostique des oligoastrocytomes**

La perte 1p/19q a une forte valeur diagnostique. En effet, la délétion 19 q seul est mise en évidence dans les astrocytomes, dans les oligodendrogliomes ainsi que dans les oligoastrocytomes, alors que la perte simultanée 1p et 19q est retrouvée spécifiquement dans les oligodendrogliomes [33].

#### **III-5-3- 1p19q : facteur pronostique et prédictif des oligoastrocytomes**

En plus de leur valeur diagnostique, les délétions 1p et 19q ont une valeur pronostique et prédictive de la réponse à la chimiothérapie [29]. En effet, il existe 4 groupes différents : i) les délétions combinées 1p et 19q correspondent à une survie prolongée et prédisent la réponse positive à la chimiothérapie ; ii) la délétion 1p sans la délétion 19q correspond à une survie plus courte et montre un échappement plus rapidement à la chimiothérapie ; iii) l'absence de délétions 1p mais la présence d'une mutation de la P53 prédit une récurrence très rapide et une survie très courte et ; iv) l'absence de la délétion 1p et de la mutation de TP53 est corrélée à une très faible réponse à la chimiothérapie et une durée de vie très courte.

## **PARTIE B**

### **Fixation et cryoconservation**

La fixation est un procédé de stabilisation des structures tissulaires [4, 34]. Elle joue plusieurs rôles primordiaux : i) elle préserve les composants cellulaires, les protéines, les acides nucléiques et conserve leur emplacement tissulaire; ii) elle prévient l'autolyse; iii) elle stabilise le matériel cellulaire contre les effets délétères potentiels de certaines techniques d'analyse telles que les colorations et les immunohistochimies.

Il existe deux mécanismes de fixation. Le premier est chimique avec deux types de fixateurs : i) les agents pontants représentés par les aldéhydes (formaldéhyde, paraformaldéhyde, glutaraldéhyde) et les oxydants puissants ; ii) les agents coagulants ou précipitants regroupant les solvants organiques déshydratants (alcools et acétone), les sels de cations divalents (sulfate de cuivre, de zinc, et de mercure), les poly-électrolytes et les acides organiques (acide acétique, acide picrique). Le second mécanisme de fixation est physique par congélation.

La première partie de ce chapitre est consacrée à l'action du formol et à ses implications dans l'analyse des macromolécules. La deuxième partie concerne la cryoconservation, ses bénéfices et ses contraintes d'utilisation. L'étude de ces deux procédés de fixation explique l'intérêt actuel pour les fixateurs non formolés qui compose la troisième partie du chapitre.

#### **I- Formaldéhyde, formol et dérivés**

##### **I-1- Historique des fixateurs formolés**

Le formaldéhyde, découvert en 1859 lors d'un essai de synthèse du méthylène glycol, a été définitivement identifié en 1868 par August Wilhelm von Hofmann [4, 34]. En 1889, Auguste Trillat a remarqué le premier que son ajout dans l'urine, la rendait imputrescible. Il a décrit alors diverses applications du formaldéhyde en solution aqueuse comme la conservation des plantes, des cadavres et des pièces anatomiques. Ferdinand Blum a introduit le formaldéhyde comme fixateur en anatomie pathologique dans les années 1890. Aujourd'hui, le formaldéhyde est commercialisé à une concentration 37 % masse/masse ou 40 % masse/volume sous le nom de formol, lui-même dilué au 10<sup>ème</sup> lors de son utilisation en laboratoire. Depuis, le formol est resté le fixateur de référence en anatomie pathologique.

Le formol préserve les protéines, les organites cellulaires et les acides nucléiques. Cependant, le formol seul ne conserve pas les glucides, les oligosaccharides, les glycoprotéines et les lipides [4, 34]. Ces dernières décennies, divers tampons ont été ajoutés au formol pour neutraliser le pH, comme le tampon phosphate, le carbonate de calcium, le carbonate de magnésium, le citrate ou le Tris [35]. D'autres éléments, tels que le mercure, le zinc, l'EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) et l'EGTA (*ethyleneglycoltetraacetic acid*), peuvent être ajoutés pour améliorer la conservation de macromolécules [35]. D'autres éléments peuvent être associés tel que le calcium pour la préservation des lipides [34]. Au total, ces ajouts divers ont donné une multitude de fixateurs formolés dont le plus utilisé reste le formol tamponné aux phosphates mono et di sodique. Deux autres fixateurs formolés sont également très utilisés dans les laboratoires d'anatomie pathologique français : il s'agit du liquide de Bouin et de l'AFA. Le liquide de Bouin a la particularité de comporter en plus du formol, de l'acide picrique et de l'acide acétique dilués dans l'eau. L'AFA, quant à lui, est composé d'éthanol (75 %), de formol (2 %), d'acide acétique (5 %) et d'eau (18 %). Les propriétés des fixateurs sont dues à leur capacité à réagir chimiquement avec les fonctions polaires présentes au niveau des protéines et des acides nucléiques.

## **I-2- Mécanismes de fixation**

### **I-2-1- Mécanismes de fixation des protéines**

Le formaldéhyde (CH<sub>2</sub>O) interagit avec les groupements amines (-NH<sub>2</sub>) terminaux et les fonctions polaires des chaînes latérales des acides aminés [4, 34, 36]. Ces fonctions polaires correspondent aux groupements amine primaire, amide, guanidique, et thiol ainsi que les noyaux imidazole, indole et phénol. Le résidu d'acide aminé le plus sollicité lors de la fixation est celui de la lysine. En effet, la position de sa fonction amine primaire à l'extrémité d'un bras oscillant long de quatre résidus méthylène -(CH<sub>2</sub>)-, rend cette fonction particulièrement accessible aux molécules de formol. Au contraire, le groupement thiol (-SH), fréquemment oxydé sous forme de pont disulfure S-S, a un rôle limité dans la fixation des protéines *in situ*. L'ajout de b-mercaptoéthanol (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH) à la solution de formol rend ainsi accessible les groupements thiol des protéines par réduction des ponts disulfures.

Les groupements polaires des acides aminés possèdent un proton labile qui interagit par addition sur le formaldéhyde. Cette réaction chimique complexe se déroule de la manière suivante : la réaction d'addition produit des dérivés hydroxyméthylés instables rendant l'équilibre réactionnel réversible. Les groupements  $\alpha$ -hydroxyméthyle subissent une déshydratation conduisant à la formation de fonctions imines (-N=C<) très réactives. En conditions favorables, les groupes imines sont le siège d'une attaque par un autre nucléophile, attiré par les charges positives, avec formation de ponts intra ou intermoléculaires. L'addition du formaldéhyde sur des groupes aminés lors de cette première étape, s'effectue à des pH optimum situés entre 6 et 7. La deuxième étape de déshydratation, qui permet la formation des ponts méthylènes, est plus aisée à des pH plus acides (pH 4 à pH 5,5). La réticulation protéique est donc plus efficace avec du formol non neutralisé. Les ponts méthylènes précédemment formés (R-CH<sub>2</sub>-R') se développent toujours entre des chaînes latérales de nature chimique différente. Le cation ammonium issu de l'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine interagit préférentiellement avec l'arginine, l'asparagine, la glutamine, l'histidine, le tryptophane et la cystéine. Les forces de liaison sont cependant différentes : la liaison lysine-cystéine est instable et réversible, alors que les liaisons lysine-arginine et lysine-tyrosine sont respectivement acido-labiles et acido-résistantes, c'est-à-dire sensibles ou résistants aux traitements chimiques. Occasionnellement, des ponts diméthylethers (R-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-R') peuvent être formés. Les ponts intra et intermoléculaires produits par le formaldéhyde conduisent à la réticulation des protéines. Cette réticulation provoque la rétention de protéines hydrosolubles et d'autres macromolécules par piégeage dans le réseau tridimensionnel formé lors de la fixation du tissu [37].

### **I-2-2- Mécanismes de fixation des acides nucléiques**

Les protéines ne sont pas les seules macromolécules interagissant avec le formaldéhyde. Il réagit aussi avec les acides nucléiques (ADN et ARN) au niveau des groupes amines primaires exocycliques [38] et des imines endocycliques

[39] pour les bases ne comportant pas de fonction amine primaire. A l'instar des protéines, l'addition du formaldéhyde sur une base d'un acide nucléique forme dans un premier temps un dérivé  $\alpha$ -hydroxyméthylé (N-CH<sub>2</sub>OH), puis induit la formation réversible d'un dérivé imine protoné peu stable [4, 40-42]. L'attaque électrophile par ce dérivé hydroxyméthyle sur un groupe amine d'une autre base forme un pont méthylène non réversible. Les ponts méthylènes (N-CH<sub>2</sub>-N) sont formés entre les groupes aminés et imines des bases nucléiques d'un même sillon [43].

L'addition sur les cations immonium nécessite leur déprotonation d'où l'influence du pH de fixation [4, 36]. Les groupements imines et amines primaires participent à la formation des liaisons d'hydrogène stabilisant la double hélice d'ADN. L'ADN doit donc être dénaturé et les liaisons hydrogènes rompues pour que les additions puissent se faire. Les adduits de formaldéhyde sur la molécule d'ADN se forment lentement lors de la « respiration » de l'ADN ou plus rapidement en cas de fixation à des températures supérieures à 65°C, température où toute une partie de l'ADN est dénaturée. Le formaldéhyde et le méthanol (CH<sub>3</sub>OH), souvent contenus dans les solutions commerciales de formol, ont la capacité de déstabiliser les liaisons hydrogènes et donc de dénaturer la double hélice d'ADN. Le pontage intra et intermoléculaire des acides nucléiques ne semble jouer cependant qu'un rôle modeste dans leur stabilisation.

Trois autres processus permettent la préservation des acides nucléiques lors de la fixation au formol: i) des interactions électrostatiques avec les protéines fixées, ii) des pontages cationiques dus aux ions calcium et magnésium entre les groupes polaires des acides nucléiques et ceux des protéines, iii) des liaisons covalentes entre acides nucléiques et protéines essentiellement histoniques. Il a été montré que la perte des ARN est plus élevée que celle de l'ADN pendant la fixation et lors des rinçages ultérieurs. Ceci est sûrement dû à la taille plus petite des ARN et à leur localisation cytoplasmique.

Les effets négatifs du traitement des acides nucléiques par le formaldéhyde reposent en partie sur la perte de certaines bases par hydrolyse des liaisons N-glycosidiques situées entre la base et le désoxyribose ou le ribose. Ces sites formés sont appelés sites AP c'est-à-dire apurinique et apyrimidique. Les sites AP laissent un ion carboxonium cyclique fortement instable qui subit rapidement une hydrolyse produisant un 2-deoxy-D-ribose [41-43]. Le formaldéhyde cause aussi des hydrolyses lentes des liaisons phosphodiesters en de courtes chaînes de polydéoxyriboses [43].

### **I-2-3- Mécanismes de fixation entre les protéines et les acides nucléiques**

Le formaldéhyde agit aussi sur l'interaction entre les protéines et les acides nucléiques. Le traitement de nucléohistones par du formaldéhyde provoque des liaisons protéine/ADN. Mais, contrairement aux nucléohistones natives, les liaisons ne sont pas ioniques. La digestion de ce complexe par des protéinases non spécifiques ne permet pas l'obtention de l'ADN pur [4]. Cependant, pour une durée de fixation et une concentration de fixateur identiques, les complexes protéine/ADN sont moins stables que les complexes protéine/protéine [4, 44].

### **I-3- Cinétique de fixation**

La vitesse de fixation dépend de deux paramètres : la vitesse de diffusion ou de propagation du fixateur dans le tissu et la vitesse de la réaction chimique [4, 41, 45]. La vitesse de propagation du front de fixation au sein des tissus obéit à une loi selon laquelle la distance de pénétration (en mm) est égale à la racine carrée du temps écoulé (en heure) multipliée par un coefficient de diffusibilité dépendant du fixateur et de l'organe [45, 46]. La vitesse de diffusion est également proportionnelle à la concentration du fixateur et à la température de fixation. Au cours de la diffusion, le fixateur doit interagir avec les macromolécules. Cette interaction est constituée de 2 étapes : l'addition du formaldéhyde sur une macromolécule et la formation des ponts méthylènes. Cette cinétique de réactions chimiques est considérée comme lente [37]. En 1980, Pearse estime que la fixation est complète seulement après 7 jours pour des prélèvements de taille conventionnelle en anatomie pathologique [47]. Mais plus couramment, on considère la fixation complète entre 24 à 48 heures pour la majorité des prélèvements tissulaires [48-50]. Seules les cellules situées à la périphérie des échantillons sont immédiatement fixées et plus la fixation est courte, plus les échantillons sont fixés de manière hétérogène, au risque d'une moins bonne conservation des cellules profondes. Pour un prélèvement de 4 mm d'épaisseur, la pénétration est complète après 4 heures, en revanche seulement 20 % des molécules de formol sont liées [46]. Il existe donc un intérêt à fixer les prélèvements à +4°C pour ralentir les activités enzymatiques, et à ajouter des inhibiteurs des activités hydrolasiques tels que les chélateurs des cations divalents. Une fixation trop rapide au formol est généralement complétée par l'action fixatrice des alcools utilisés lors des étapes de déshydratation [48].

### **I-4- Influence de la fixation formolée sur l'analyse des protéines**

La réticulation des protéines par l'action du formol modifie les structures tertiaires et quaternaires des protéines induisant la modification de leur antigénicité ou encore la perte de leur activité enzymatique, alors que les structures



primaires et secondaires sont inchangées. Ces modifications macromoléculaires ne peuvent pas être inversées par l'utilisation d'enzyme ou d'agent chaotropique [51, 52]. Par exemple, la digestion par de la protéase d'une albumine fixée au formol provoque la destruction de sa structure primaire mais ne provoque pas la destruction des adduits et des ponts méthylènes formés sous l'action du formol [4]. Lors des techniques d'immunohistochimie, le démasquage antigénique des coupes histologiques par un traitement à la trypsine ne correspondrait pas à l'inversion de la fixation mais à la création de micro-tunnels au sein de la coupe tissulaire facilitant ainsi l'accès des antigènes aux anticorps [4, 53]. Cette notion est cependant controversée par d'autres études qui ont montré l'action de démasquage des enzymes protéolytiques [51, 54]. En revanche, il est certain qu'une hydrolyse accélérée par la chaleur et/ou une catalyse acido-basique (par exemple un traitement à l'HCl) induisent l'inversion au moins partielle de la fixation. Ainsi, le chauffage à 65°C d'une solution de RNase A fixée au formol inverse les pontages inter et intramoléculaires et conduit à une restauration partielle de l'activité de l'enzyme [4, 55, 56].

### **I-5- Influence de la fixation formolée sur l'analyse des acides nucléiques**

L'étude des acides nucléiques a pris une place importante dans le diagnostic. Les ARN, en particulier, sont représentatifs de l'activité des gènes à un moment donné de la vie de la cellule. Les chercheurs ont donc essayé d'utiliser les échantillons fixés et présents en grande quantité dans les laboratoires d'anatomie pathologique pour l'étude du suivi des pathologies tumorales. Cependant les premières études sur les acides nucléiques extraits de ces tissus fixés au formol ont montré une taille réduite des ADN et des ARN obtenus. En moyenne, des fragments d'ADN entre 300 et 500 pb et d'ARN entre 200 pb et 300 pb sont amplifiables par PCR [57-59]. Cependant, l'analyse par électrophorèse en gel d'agarose montre un ADN dégradé sous forme d'une multitude de bandes de faible poids moléculaire [60]. En plus des conditions « nucléase free » nécessaires à la préparation des échantillons, plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer la qualité des acides nucléiques lors de la fixation au formol. Ces facteurs sont l'action du formol, sa composition, son pH, la température et le temps de fixation. La conservation des prélèvements formolés et paraffinés interagit aussi sur la préservation des acides nucléiques.

#### **I-5-1- Action du fixateur et altérations des acides nucléiques**

La fixation au formol provoque une augmentation des mutations observées lors de séquençage d'ADN. Leur fréquence d'apparition est supérieure à celle trouvée dans l'ADN de tissu congelé [41] et elles ne sont pas reproductibles à partir du lysat cellulaire initial. Des amplifications indépendantes à partir du même pool de cellules donnent des mutations différentes. Lors d'une PCR nichée, les mêmes mutations artefactuelles sont obtenues après la PCR interne réalisée à partir des mêmes produits de PCR externe. Les mutations apparaissent donc pendant les premiers cycles de la PCR externe [61]. La fréquence des mutations artefactuelles dépend aussi de la quantité de brins matrices, c'est-à-dire la quantité d'ADN initiale. Actuellement, on considère que la fréquence d'apparition des mutations est le cumul de la fréquence d'erreur de la Taq polymérase, de la fréquence des erreurs dues au dommage de l'ADN et à l'existence de ponts méthylènes [43, 62, 63]. Il apparaît que la *Taq Polymérase* ne reconnaît pas la cytosine des ADN extrait de tissu formolé et incorporerait une adénosine au lieu de la guanine créant dans 96 % des cas des mutations artefactuelles par transition de la cytosine en thymine ou de la guanine en adénine [61]. Les séquences d'ADN lors de fixation au glutaraldéhyde n'ont pas de différence significative avec les séquences de référence [43].

Les sites apuriques et apyrimidiques (AP) et les dérivés N-hydroxyméthylés de l'ADN ne semblent pas interférer avec la technique de PCR. La seule exception est l'apparition d'un nombre important de ces sites AP au niveau de la région d'hybridation des amorces sur le brin d'ADN matrice [43]. En revanche, les dérivés N-hydroxyméthylés de l'ARN peuvent empêcher la réalisation de RT-PCR. En effet, 40 % des adénines des ARN subissent une addition de dérivés N-hydroxyméthylés [40]. La modification des adénines au niveau des queues polyA des ARNm rend inutilisable les amorces oligo dT pour la transcription inverse des ARNm [64, 65]. Cependant, ces ajouts de groupements N-hydroxyméthylés sont réversibles par un traitement à une température de 70°C pendant une heure à deux heures [40, 66]. Cette étape peut être concomitante avec la digestion du tissu par la protéinase K à 70°C lors de l'extraction des acides nucléiques [67].

En revanche, les ponts méthylènes irréversibles entre les bases inhibent, d'une part, la dénaturation de l'ADN double brin et bloquent, d'autre part, l'accès aux ARN conduisant à l'échec de la transcription inverse et à l'échec de l'amplification par PCR. Le formol provoque aussi une scission du squelette phosphodiester de l'ADN qui expliquerait en partie l'existence d'ADN de faible poids moléculaire [43].

Ces effets du formol ont été longtemps méconnus et beaucoup de banques de données font référence à des mutations mises en évidence sur des tissus fixés au formol et qui n'ont pas été recherchées sur les prélèvements frais ou congelés [61, 68].



### **I-5-2- Effet de la composition du fixateur sur les acides nucléiques**

La composition du fixateur formolé, lors d'ajout d'éléments, peut altérer la balance ionique du tissu et diminuer les fonctions des enzymes *Reverse Transcriptases* et *Taq Polymérase*. De même, l'utilisation d'acides pour décalcifier les prélèvements provoque des coupures dans les acides nucléiques et donc réduit la longueur des fragments extraits rendant impossible l'amplification par PCR [35, 69]. En revanche, l'EDTA et l'EGTA, qui en plus d'avoir l'avantage de réduire l'activité des nucléases, peuvent aussi être utilisés comme agents décalcifiants [35].

### **I-5-3- Effet du pH du fixateur sur les acides nucléiques**

Le pH a un rôle important dans le maintien de l'intégrité des acides nucléiques. Les difficultés du formol à pénétrer dans le tissu entraînent une hypoxie des parties profondes du tissu qui est responsable d'une diminution du pH tissulaire. Cet effet a pour conséquence l'extraction d'un faible taux d'acides nucléiques [41, 70]. Il en est de même lors de la fixation par du formaldéhyde à pH acide ou lors de la présence d'acide formique. En effet, le formol est dégradé par la lumière et la température au cours du stockage. Cette dégradation aboutit à la formation d'acide formique qui altère les acides nucléiques et forme des dépôts dans le tissu appelés pigments formoliques. Les tampons associés au formol, comme les sels de phosphate, ralentissent sa transformation mais ne l'empêchent pas [35, 46]. Le formaldéhyde à pH 7,4 n'hydrolyse pas les acides nucléiques ce qui permet d'obtenir un ADN de poids moléculaires relativement haut [43, 71, 72]. L'AFA provoque plus de mutations à pH 3 qu'à pH 7, par augmentation du taux de dépurination, responsable de l'intégration de nucléotides non complémentaires au niveau des sites apuriques et apyrimidiques [41, 43]. En revanche, le pH n'a pas d'influence lors de la fixation par le glutaraldéhyde [43].

### **I-5-4- Effet de la température de fixation**

La taille de l'ADN extrait est directement liée à la température de fixation. Il est montré que la fixation du thymus par du formol 2 % pH 7.0 à 60°C induit la dégradation de l'ADN extrait par rapport à la fixation à 40°C [43]. La dégradation est minimisée à la température de + 4°C en partie grâce à l'inhibition des enzymes [73]. Un traitement à l'EDTA, agent chélateur du  $Ca^{2+}$  et inhibiteur de la DNase, diminue partiellement la dégradation de l'ADN [73]. Les ARN subissent une dégradation liée à la température semblable à celle de l'ADN. A température ambiante, les RNases seraient responsables en partie de la dégradation des ARN au cours de la fixation [41].

### **I-5-5- Effet du temps de fixation**

Le délai de prise en charge du prélèvement depuis sa dévascularisation est responsable d'une partie de la dégradation des ARN sous l'action des nucléases endogènes et l'apparition d'une ischémie liée à l'arrêt de la perfusion sanguine du prélèvement [57]. Ce mécanisme est le même quelque soit le mode de conservation ultérieur des prélèvements. En revanche, le temps de fixation est spécifique du fixateur utilisé. Ainsi pour le formol, le temps d'incubation des prélèvements est un facteur défavorable sur la qualité des ADN et des ARN extraits [41, 74]. Une fixation prolongée d'une semaine provoque la destruction des acides nucléiques [58]. Il est donc nécessaire d'optimiser le temps de fixation : une sous-fixation des prélèvements serait responsable de la dégradation des ARN par un défaut d'inhibition des nucléases et une sur fixation serait responsable de la dégradation par la formation irréversible de ponts méthylènes [66].

### **I-5-6- Effet de la conservation des prélèvements formolés et paraffinés**

Les ARN continuent de se dégrader même après la déshydratation et l'enrobage en paraffine comme le montre l'étude de Cronin *et al* sur les ARN extraits des blocs paraffinés et conservés pendant 1, 6 et 17 ans [59, 75]. Après un an de conservation, des ARN de 2000 pb peuvent être extraits, alors qu'après 6 et 17 ans, les ARN extraits sont en moyenne inférieurs à 300 pb. Cela pourrait être lié à la durée de fixation. En effet, ces tumeurs n'ont été fixées que 5 à 10 heures et les dégradations d'ARN pourraient résulter d'une fixation insuffisante.

Les mises au point des vingt dernières années ont permis d'améliorer les techniques de préparation des échantillons, les conditions de fixation au formol et l'extraction des acides nucléiques à partir de prélèvements formolés. Cela a permis la réalisation des techniques élémentaires de la biologie moléculaire à des fins diagnostiques: PCR et RT-PCR, Southern et Northern blot. Cependant les nouvelles technologies telles que l'oligonucléotide micro-array demandent une qualité d'ADN et d'ARN supérieure non obtenue sur les prélèvements formolés (taille, mutation artéfactuelle,...) [76].

Une alternative a été apportée par l'utilisation de la cryoconservation.

## **II- Cryoconservation**

### **II-1- Création des tumorothèques**

Depuis une quinzaine d'années, la biologie moléculaire a subi une importante avancée technologique. Son développement a conduit à des progrès dans le diagnostic des maladies. A ses débuts, ce domaine technique était restreint aux prélèvements frais. Devant la quantité importante de prélèvements susceptibles de nécessiter une analyse moléculaire en anatomie pathologique et l'inadéquation de la fixation formolée pour ces applications, la méthode de cryoconservation, déjà utilisée en reproduction humaine assistée, a été adaptée aux prélèvements tissulaires. Ce mode de conservation par le froid permet d'affirmer le diagnostic et le pronostic de certains cancers par des techniques de biologie moléculaire et rend plus performant la prise en charge thérapeutique par les nouvelles thérapies ciblées.

Les institutions qui stockent les prélèvements cryoconservés sont appelées biobanques, biothèques ou tumorothèques. Ces structures interviennent dans deux domaines : i) d'une part dans la conservation de prélèvements pathologiques de bonne qualité afin d'affiner le diagnostic anatomopathologique; ii) d'autre part dans le domaine de la recherche cancérologique afin de faciliter les études sur la compréhension et la caractérisation des mécanismes pathogéniques [77, 78].

Dans la majorité des cas, la cryoconservation, indirecte dans un cryotube, consiste en une congélation rapide dans l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$  suivie d'un stockage soit dans des cuves à azote, soit dans des congélateurs à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **II-2- Mécanisme physique de congélation**

La congélation est un processus physique de conservation. A basse température, l'eau se trouve sous deux états : soit une forme cristallisée correspondant à la congélation, soit dans un état amorphe dit vitreux où l'eau non cristallisée a perdu sa fluidité. La cryoconservation par vitrification ne se fait qu'à la surface du prélèvement (sur quelques microns d'épaisseur). En effet, dans les conditions habituelles de congélation, la cristallisation de l'eau débute par la surface du prélèvement. Un abaissement lent de la température aboutit à la formation de cristaux de glace massifs et peu nombreux, situés préférentiellement dans la matrice extracellulaire. Au contraire, un refroidissement rapide conduit à une structure cristalline beaucoup plus fine et idéale pour une bonne conservation de l'intégrité physique de l'échantillon.

### **II-3- Avantages de la congélation**

#### **II-3-1- Pour les techniques histologiques**

Contrairement à la fixation formolée, la cryoconservation permet la préservation de biomolécules sans modification chimique de leur structure. Cet avantage est utilisé en immunohistochimie pour la mise en évidence de protéines dont les épitopes sont masqués par le formol et pour lesquelles les anticorps spécifiques et les méthodes de démasquage n'ont pas été adaptés [79]. La cryoconservation est aussi primordiale en histoenzymologie. En effet, elle évite la perte de l'activité enzymatique qui est observée, dans la majorité des cas, lors de la fixation formolée.

#### **II-3-2- Pour les techniques moléculaires**

La cryoconservation est la technique de choix pour la préservation des acides nucléiques et des protéines. L'étude comparative de Douglas et al [43] a montré que les ADN extraits des tissus cryoconservés ont un poids moléculaire élevé supérieur à 50 kb, alors que les ADN extraits des tissus formolés ont un poids moléculaire bien plus faible. A l'inverse de la fixation formolée, la cryoconservation permet aussi l'extraction des protéines permettant leur étude par diverses techniques (Western blot, électrophorèse bidimensionnelle, ...).

### **II-4- Inconvénients de la congélation**

#### **II-4-1- Vitesse de congélation**

La vitesse de congélation est un facteur important. Par exemple, le dépôt d'un cryotube dans un congélateur  $-80^{\circ}\text{C}$  provoque une congélation trop lente du prélèvement. La mort cellulaire par apoptose se développe. De plus, les activités enzymatiques d'autolyse se produisent jusqu'à des températures de  $-40^{\circ}\text{C}$ . Pour éviter ce phénomène de congélation lente, un refroidissement rapide dans un liquide congelant plus froid, tel que l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ , est recommandé

[80].

#### **II-4-2- Stabilité de la température**

Dans le cas de l'eau pure, la stabilité du système cristallin n'est acquise qu'à des températures inférieures à -130°C. La température de transition vitreuse de l'eau est beaucoup plus élevée dans le cas des tissus. Au dessus de ce seuil, les cristaux de glace sont en équilibre dynamique avec la solution non congelée dans laquelle ils baignent. Pour les prélèvements tissulaires, les vitesses de diffusion moléculaires sont insignifiantes et la composition des tissus est considérée comme stable pour des températures inférieures à -80°C. La conservation à -80°C est donc critique dans le sens où de petites fluctuations de température, lors de l'ouverture du congélateur ou de transferts d'échantillons, peuvent entraîner des phénomènes de fusion et recristallisation délétères pour les tissus. Il peut aussi exister un phénomène semblable dans les anciennes cuves à azote où la température la plus élevée de l'enceinte atteint -70°C [81].

#### **II-4-3 Morphologie tissulaire**

Lors de la congélation, la cristallisation de l'eau pure dans le milieu extracellulaire provoque une concentration des solutés dans les parties non congelées. Ce phénomène provoque une déshydratation cellulaire due à un mécanisme osmotique. Cette rétraction tissulaire peut aller jusqu'à une rupture des membranes plasmiques. Avec une vitesse de congélation lente, les gros cristaux de glace formés provoquent des artefacts. Dans ces conditions, il y a un déficit de la conservation de la morphologie tissulaire. Des cryoprotecteurs sont utilisés pour pallier ces effets. Par exemple, des échantillons sont immergés dans l'isopentane préalablement refroidi dans l'azote liquide. Malheureusement, l'emploi de certains cryoprotecteurs est incompatible avec la réalisation de techniques de biologie moléculaire. De même, l'inclusion des échantillons dans un milieu d'enrobage qui les préserve de la dessiccation et de l'oxydation, est inadaptée aux techniques d'extraction et de PCR.

#### **II-5- Recommandations de l'HAS pour la cryoconservation**

La Haute Autorité de Santé (HAS) donne des recommandations pour une cryoconservation de prélèvements tumoraux cellulaires et tissulaires de bonne qualité destinés aux analyses moléculaires [80]. Pour pallier la dégradation moléculaire survenant dès l'apparition d'une ischémie tissulaire, il est recommandé d'effectuer la congélation dans les 15 minutes suivant la dévascularisation du prélèvement [77]. Si ce délai ne peut pas être respecté, les prélèvements peuvent être conservés dans une solution conservatrice telle que le RNAlater. D'autre part, l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES) préconise l'absence de zone de nécrose dans les prélèvements congelés. Pour cette raison, il est recommandé de réaliser un contrôle morphologique du prélèvement congelé soit par apposition du prélèvement sur lame stérile, soit par fixation et inclusion en paraffine du prélèvement miroir de celui congelé. Cependant, il existe un biais dans le processus de congélation des prélèvements tumoraux. Les tumeurs concernées doivent être de taille suffisante pour permettre le prélèvement d'un fragment sans nuire au diagnostic [75, 82]. Les tumeurs congelées ne représentent donc pas toutes les tumeurs et la congélation n'est pas réalisable sur les biopsies de petite taille.

#### **II-6- Contraintes d'utilisation pour les laboratoires à visée diagnostique**

##### **II-6-1- Coûts d'achat et d'entretien**

L'achat de congélateur à -80°C ou de cuve à azote est un investissement lourd d'environ 10 000 euros pour les laboratoires. Des textes législatifs (décret 88-280 du 24 mars 1988 et décret 2006-6 du 4 janvier 2006) obligent les laboratoires privés et les laboratoires hospitaliers à conserver respectivement les blocs fixés et les documents microscopiques au minimum pendant 10 ans et 20 ans [78]. Il n'existe à l'heure actuelle aucune réglementation au sujet des prélèvements congelés à visée sanitaire, mais les mêmes durées de conservations que les blocs fixés pourraient être appliquées. De plus, l'arrêté du 11 mars 1968 indique que les « dossiers de nature héréditaire susceptibles d'avoir des répercussions pathologiques ou traumatisantes sur la descendance doivent être conservés indéfiniment et, les dossiers de pédiatrie, neurologie, stomatologie et de maladie chronique doivent être conservés 70 ans ». Or les appareils de stockage sont limités en nombre d'échantillons stockables. Il se pose donc un problème de place et de coût, en particulier, si la congélation des prélèvements devient systématique pour les prélèvements tumoraux. Les institutions sont dans l'obligation de se procurer un nombre suffisant de ces équipements onéreux pour respecter les différents décrets et arrêtés. De plus, le stockage en azote liquide nécessite un approvisionnement régulier en azote. Les congélateurs à -80°C sont quant à eux des appareils gourmands en énergie et fragiles en cas de fortes chaleurs et qui nécessitent des

dépannages rapides et efficaces.

## **II-6-2- Surveillance des températures**

La stabilité de la température de congélation est primordiale. Les services doivent mettre en place un enregistrement continu de la température des congélateurs et des cuves à azote, soit par des systèmes d'enregistrement sur disque soit par des systèmes de télésurveillance, afin d'assurer la traçabilité de la chaîne du froid. Un système d'alarme doit être installé ainsi qu'un appareil de secours en état de marche afin de garantir le transfert des prélèvements en cas de défaillance technique et donc le maintien des prélèvements à la température requise.

## **II-6-3- Manipulation à risque de l'azote**

L'utilisation de l'azote comporte trois risques majeurs : le risque de surpression, de brûlure cryogénique et d'asphyxie [81]. L'azote est un composé très volatil. Un litre d'azote liquide se transforme en 680 litres d'azote gazeux. Il existe un risque de surpression lors de la fermeture hermétique des récipients soit dans le cas d'utilisation de récipient inadéquat, soit dans le cas de formation de glace au niveau des bouchons des récipients. Les bouchons des containers doivent seulement être posés sur le col afin de laisser s'évaporer l'azote. Le risque de brûlure cryogénique apparaît par contact ou par projection. Ces brûlures par le froid sont plus dangereuses que les brûlures par le chaud, car les manifestations sont plus insidieuses et aboutissent souvent à des infections locales nécessitant parfois le besoin d'amputer. Un équipement de protection spécifique doit être utilisé lors des manipulations. Il comprend des gants isolants, des lunettes ou des visières pour protéger les yeux et le visage et des surchaussures. Enfin, le risque d'asphyxie est dû à la grande capacité de l'azote à s'évaporer diminuant ainsi la concentration d'oxygène dans l'air ambiant respiré, normalement présente entre 20 et 21 %. Une concentration en oxygène inférieure à 18 % provoque des nausées, des maux de tête, de l'engourdissement et une gêne à la parole. Une diminution de la concentration à moins de 10 % d'oxygène conduit à l'asphyxie rapide en moins de trois minutes suivi par le coma et le décès de la personne.

## **II-6-4- Normes des locaux de stockage**

En raison des risques lors de l'utilisation de l'azote, les lieux de stockage des containers d'azote et les lieux d'utilisation de l'azote sont soumis à des règles strictes. L'accès aux locaux de stockage doit être sécurisé. Les locaux doivent obligatoirement posséder une ventilation à deux vitesses. Ils doivent avoir une température tempérée pour limiter l'évaporation de l'azote sous l'effet de la chaleur. L'air ambiant doit être sec pour éviter la formation de glace sous l'effet de la condensation de l'eau ambiante pouvant aboutir à la fermeture hermétique des containers et donc à une surpression. La porte d'entrée de la pièce doit être vitrée ou posséder un hublot pour permettre la surveillance de l'intérieur de la pièce par des personnes extérieures. Un oxygénomètre doit être présent à l'entrée de la salle pour le contrôle de la concentration en oxygène avant de pénétrer dans la pièce. Ce système est complété par un système d'alarme en deux temps mis en route lors de la baisse de la teneur en oxygène en dessous de 19 % puis en dessous de 17 %. Un matériel de premier secours spécifique est obligatoire à l'entrée de la pièce. Il comprend un masque autonome de ventilation permettant de pénétrer dans la pièce en toute sécurité et de sortir des personnes inanimées, un ballon de ventilation assistée et une bouteille d'oxygène prête à l'emploi afin de réaliser une ventilation artificielle en attendant les secours.

## **II-6-5- Formation du personnel**

La dangerosité de l'azote nécessite que le personnel technique et médical des laboratoires d'anatomie pathologique soit formé dès leur recrutement. De plus, une remise à niveau des précautions d'usage de l'azote et de l'utilisation du matériel de secours tel que les masques autonomes de ventilation, est recommandée chaque année.

L'ensemble de ces règles de bonne pratique de la cryoconservation est difficilement réalisable dans les laboratoires d'anatomie pathologique privés ainsi que dans les services hospitaliers et cliniques de taille réduite non intégrés à des centres de référence.

## **III- Fixateurs non formolés**

A la fin des années 80, des recherches de fixateurs non formolés ont vu le jour. Ce développement de nouveaux fixateurs répondait à la nécessité de remplacer le formol, fixateur inadéquat pour certaines techniques d'immunohistochimie et de biologie moléculaire. La cryoconservation n'était pas encore optimum en anatomie pathologique. Les progrès des techniques de démasquages antigéniques et d'extraction d'acides nucléiques sur les

prélèvements formolés, et l'amélioration de la cryoconservation ont conduit à l'arrêt des recherches de fixateurs non formolés. Dans les années 2000, une deuxième vague d'intérêt pour ces fixateurs est apparue suite à la prise en compte du coût important de la cryoconservation et la reconnaissance du formol comme substance cancérigène.

Ces nouveaux fixateurs sont nombreux, leurs formules variées et leur propriétés très diverses. Ils se composent en plusieurs groupes : les fixateurs aldéhydiques non formolés, les fixateurs à base de chloroforme ou d'acétone et, les fixateurs alcooliques à base d'éthanol ou de méthanol.

### III-1- Prérequis nécessaires aux nouveaux fixateurs

Le choix d'un nouveau fixateur non formolé est nécessairement réalisé sur des critères macroscopiques et morphologiques. Ce fixateur doit être un bon agent de conservation et permettre l'examen macroscopique des pièces anatomiques même après plusieurs mois de conservation. La qualité morphologique des préparations histologiques doit être au moins égale à celle obtenue avec la fixation formolée. La connaissance des interactions fixateur / macromolécules permet d'estimer leurs pertes au cours des étapes de fixation et de déshydratation/inclusion et ainsi d'évaluer les possibilités de réalisation de techniques *in situ* (immunohistochimie, hybridation *in situ*...) et *ex situ* (extraction ADN, ARN et protéines). En effet, un fixateur de qualité doit préserver la constitution chimique et l'architecture tridimensionnelle des biomolécules nécessaires aux techniques d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ*. Une meilleure stabilité de ces biomolécules permettrait la création de banques tissulaires de meilleure qualité que celles composées de tissus formolés [4].

Plusieurs autres facteurs doivent être pris en compte. Pour que le choix reste judicieux, le risque chimique du nouveau fixateur doit être inférieur à celui observé avec le formol. De plus, le formol est connu pour ses propriétés biocides importantes : les pièces fixées sont considérées comme exemptes de dangers biologiques à l'exception des agents transmissibles non conventionnels tels que la protéine prion. L'évaluation des propriétés biocides du substitut sera obligatoire pour la sécurité du manipulateur. Le fixateur doit aussi avoir une composition stable dans le temps et dans les conditions de température et d'humidité des laboratoires.

### III-2- Fixateur aldéhyde non formolé : le glyoxal

Il existe un fixateur aldéhydique alternatif au formol : le glyoxal (CHO-CHO). Ce fixateur à deux carbones possède une vitesse de pénétration plus lente que le formol, mais son poids moléculaire élevé le rend moins volatil que le formol. Dans les conditions habituelles de travail, la pression partielle des vapeurs de glyoxal est inférieure au seuil toxique. Ce fixateur peut donc être substitué au formol pour son caractère moins nocif, avec peu de mise au point pour les techniques *in situ*. En revanche, ce fixateur reste comme tous les fixateurs pontants, de qualité très médiocre pour les techniques *ex situ* (extraction ADN, ARN et protéines).

### III-3- Fixateurs alcooliques

Des études ont montré que la fixation par l'éthanol pur donne une faible qualité des analyses morphologiques avec une rétraction des cellules et une migration des organites à l'intérieur des cellules [48, 83]. Certaines études ont mis en évidence que la qualité des ARN extraits à partir de prélèvements cervicaux fixés à l'alcool 70 % est médiocre, en particulier avec la perte du pic d'ARN 18S lors des études par puce Agilent malgré la fixation et la conservation des blocs à 4°C [84]. D'autres, en revanche, ont montré une meilleure qualité des ARN que lors de la fixation au formol [85].

Afin d'améliorer la conservation des macromolécules, divers mélanges à partir d'éthanol 70% ont été essayés. Ces dix dernières années, un grand nombre de fixateurs non formolés ont été élaborés et certains ont déjà été mis sur le marché. Parmi les fixateurs testés dans notre étude, deux ont déjà fait l'objet d'articles scientifiques : le FineFix et le Rcl2. En revanche, aucune publication n'existe à l'heure actuelle sur l'Ethacarn. Après un rappel sur les mécanismes de fixation alcoolique, ce chapitre donnera un état des lieux des connaissances sur le FineFix et le RCL2.

#### III-3-1- Mécanismes de fixation

Les fixateurs alcooliques ne créent pas de pont méthylène entre les macromolécules. Ils remplacent les molécules d'eau des tissus et des cellules. Cette déshydratation entraîne la rupture des liaisons hydrophiles et hydrophobes des protéines, la modification de leur structure tertiaire et leur coagulation. Les protéines, normalement solubles dans un milieu aqueux, ont surtout des groupements hydrophiles exposés à leur surface externe. Quand l'alcool remplace l'eau dans l'environnement tissulaire, il attire les parties hydrophobes des protéines vers le nouvel environnement induisant une modification de la structure tertiaire des protéines qui s'accompagne de l'inactivation de toutes les enzymes incluant les

protéases. Le retour à une phase soluble est très lent et la plupart des protéines, après coagulation, restent insolubles, même si elles sont remises dans un environnement aqueux. Ce processus serait donc un mécanisme irréversible [48]. Le méthanol a une masse moléculaire plus proche de celle de l'eau que l'éthanol. De ce fait, l'éthanol est un agent déshydratant plus puissant que le méthanol. La fixation par coagulation démarre à une concentration de 50-60 % pour l'éthanol et à une concentration de 80 % pour le méthanol.

### III-3-2- Le FineFix

Le FineFix est un fixateur alcoolique composé d'éthanol à environ 70 %, d'eau distillée, de glycérol, d'alcool polyvinyl et de glucides monomériques [83]. Les premiers résultats d'immunomarquage sur des prélèvements fixés au FineFix ont montré une intensité de marquage plus forte en comparaison des prélèvements fixés au formol. Le FineFix montre : i) une meilleure conservation des propriétés antigéniques du tissu, ii) une capacité d'amplification d'ADN jusqu'à 2400 pb par comparaison à l'amplification moyenne de fragment d'ADN de 300 à 500 pb pour la fixation formolée, iii) une amplification d'ARN de 450 pb avec une réussite de 100 % des techniques de RT-PCR [83].

### III-3-3- Le RCL2

Le RCL2 est un fixateur élaboré au laboratoire de pathologie de l'Institut Claudius Regaud de Toulouse. Il est composé d'éthanol 70 %, d'acide acétique et de tréhalose. Ce dernier est un sucre disaccharidique non réducteur avec la particularité, d'une part, de préserver la structure des protéines lors de la déshydratation et, d'autre part, de protéger les membranes cytoplasmiques lors de la déshydratation ou lors de la congélation [86]. Dans le RCL2, ce sucre sert aussi d'agent osmotique évitant une rétraction trop importante des cellules grâce au maintien de l'équilibre osmotique. L'acide acétique est connu pour diminuer les phénomènes de rétraction dus aux alcools et pour précipiter les protéines. La première étude a montré un taux de pénétration du RCL2 dans les tissus semblable à celui du formol sauf dans les tissus adipeux où le taux diminue. La morphologie tissulaire des prélèvements fixés au RCL2, en particulier les détails cytologiques et nucléaires, ne diffère peu de la morphologie obtenue avec un fixateur formolé [86, 87]. Les détails cytoplasmiques et nucléaires sont respectés [87]. En règle générale, les immunomarquages présentent des intensités similaires à ceux sur prélèvements formolés sauf pour les protéines membranaires plus intensément marquées. Ce phénomène pourrait être expliqué par la présence du tréhalose. Selon ces mêmes études, le rendement d'extraction des protéines globales du foie fixé au RCL2 est compris entre 150 µg et 200 µg de protéine par mg de tissu, soit une fois et demi à deux fois moins que dans la congélation. Il est cependant supérieur à l'extraction de protéines à partir de foie formolé qui donne seulement 2,5 µg de protéine, étant que reconnu que les protéines ne sont pas extraites des tissus fixés à l'AFA. L'extraction d'ADN de tissus fixés au RCL2 montre un rendement semblable à celui de prélèvements congelés. Les fragments extraits sont supérieurs à 20 kpb et le séquençage de fragments d'ADN de 250 pb et de 825 pb ne montre pas d'altération des nucléotides [86, 87]. Le rendement d'ARN extrait après fixation au RCL2 à 4° C est deux fois plus faible que sur prélèvements. L'amplification par RT-PCR d'amplicons de plus de 200 pb est possible [86, 87].

1. *Décret no 2001-97 du 1er février 2001 établissant les règles particulières de prévention des risques cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction et modifiant le code du travail.*
2. *Sous-section 6: Règles particulières de prévention à prendre contre les risques d'exposition aux agents cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction Code du travail. Article R231-56(1 à 12).*
3. *Arrêté du 13 juillet 2006 modifiant l'arrêté du ( janvier 1993 fixant la liste des substances, préparations et procédés cancérigènes au sens du deuxième alinéa de l'article R231-56 du code du travail* Journal officiel de la République Française, 2006. **29 juillet**: p. Texte 12.
4. Plénat, F., et al., *[Molecular consequences of fixation and tissue processing: the examples of nucleic acids and proteins]*. Annales de pathologie, 2006. **26**(1): p. 8-21.
5. Remontet, L., et al., *Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000*. Revue d'épidémiologie et de santé publique, 2003. **51**(1 Pt 1): p. 3-30.
6. Belot, A., et al., *Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005*. Revue d'épidémiologie et de santé publique, 2008. **56**(3): p. 159-75.
7. Martinet, Y., *Le cancer bronchique vu par un pneumologue*. Bulletin de la Division Française de l'AIP, 2005. **41**: p. 5-7.
8. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1367-80.
9. D. Travis, W., *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart - Page 305*. 2004: p. 344.
10. Gustafsson, B.I., et al., *Bronchopulmonary neuroendocrine tumors*. Cancer, 2008. **113**(1): p. 5-21.
11. Copin, M.C., *Apport de l'immunohistochimie au diagnostic d'une tumeur pulmonaire*. Bulletin de la Division Française de l'AIP, 2005. **41**: p. 47-53.
12. Chu, P.G. and L.M. Weiss, *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. Histopathology, 2002. **40**(5): p. 403-39.
13. Buccheri, G. and D. Ferrigno, *Lung tumor markers of cytokeratin origin: an overview*. Lung Cancer, 2001. **34 Suppl 2**: p. S65-9.

14. Viac, J., et al., *Reactivity pattern of a monoclonal antikeratin antibody (KLI)*. J Invest Dermatol, 1983. **81**(4): p. 351-4.
15. Camilo, R., et al., *Expression of p63, keratin 5/6, keratin 7, and surfactant-A in non-small cell lung carcinomas*. Hum Pathol, 2006. **37**(5): p. 542-6.
16. Su, Y.C., Y.C. Hsu, and C.Y. Chai, *Role of TTF-1, CK20, and CK7 immunohistochemistry for diagnosis of primary and secondary lung adenocarcinoma*. Kaohsiung J Med Sci, 2006. **22**(1): p. 14-9.
17. Jerome Marson, V., et al., *Expression of TTF-1 and cytokeratins in primary and secondary epithelial lung tumours: correlation with histological type and grade*. Histopathology, 2004. **45**(2): p. 125-34.
18. Jagirdar, J., *Application of immunohistochemistry to the diagnosis of primary and metastatic carcinoma to the lung*. Arch Pathol Lab Med, 2008. **132**(3): p. 384-96.
19. Yatabe, Y., T. Mitsudomi, and T. Takahashi, *TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas*. Am J Surg Pathol, 2002. **26**(6): p. 767-73.
20. Lantuejoul, S., et al., *Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**(10): p. 1267-76.
21. Howe, M.C., et al., *Neuroendocrine differentiation in non-small cell lung cancer and its relation to prognosis and therapy*. Histopathology, 2005. **46**(2): p. 195-201.
22. N. Louis, D., W. K. Cavenee, and H. Ohgaki, *WHO classification of tumours of the central nervous system*. 2007: p. 309.
23. Bonnin, J.M. and L.J. Rubinstein, *Immunohistochemistry of central nervous system tumors. Its contributions to neurosurgical diagnosis*. J Neurosurg, 1984. **60**(6): p. 1121-33.
24. Eng, L.F., R.S. Ghirnikar, and Y.L. Lee, *Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)*. Neurochem Res, 2000. **25**(9-10): p. 1439-51.
25. Wolf, H.K., et al., *NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(10): p. 1167-71.
26. Gotow, T., *Neurofilaments in health and disease*. Medical electron microscopy : official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan, 2000. **33**(4): p. 173-99.
27. Taupenot, L., K.L. Harper, and D.T. O'Connor, *The chromogranin-secretogranin family*. N Engl J Med, 2003. **348**(12): p. 1134-49.
28. Takei, H., et al., *New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(2): p. 234-41.
29. Hunt, J.L., *Molecular testing in solid tumors: an overview*. Arch Pathol Lab Med, 2008. **132**(2): p. 164-7.
30. Buyse, M., et al., *Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(17): p. 1183-92.
31. de La Motte Rouge, T., et al., *[Clinical and molecular predictors of response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer]*. Annales de pathologie, 2007. **27**(5): p. 353-63.
32. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
33. Aldape, K., P.C. Burger, and A. Perry, *Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma*. Arch Pathol Lab Med, 2007. **131**(2): p. 242-51.
34. Ramos-Vara, J.A., *Technical aspects of immunohistochemistry*. Vet Pathol, 2005. **42**(4): p. 405-26.
35. Hewitt, S.M., et al., *Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue*. Arch Pathol Lab Med, 2008. **132**(12): p. 1929-35.
36. Plénat, F., et al., *[Formaldehyde fixation in the third millennium]*. Annales de pathologie, 2001. **21**(1): p. 29-47.
37. Kiernan, J.A., *Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do*. Microscopy Today, 2000. **1**: p. 8-12.
38. McGhee, J.D. and P.H. von Hippel, *Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases*. Biochemistry, 1975. **14**(6): p. 1281-96.
39. McGhee, J.D. and P.H. von Hippel, *Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases*. Biochemistry, 1975. **14**(6): p. 1297-303.
40. Masuda, N., et al., *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.
41. Srinivasan, M., D. Sedmak, and S. Jewell, *Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids*. Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 1961-71.
42. Loeb, L.A., et al., *Apurinic sites as common intermediates in mutagenesis*. Basic Life Sci, 1986. **38**: p. 341-7.
43. Douglas, M.P. and S.O. Rogers, *DNA damage caused by common cytological fixatives*. Mutat Res, 1998. **401**(1-2): p. 77-88.
44. Brutlag, D., C. Schlehuber, and J. Bonner, *Properties of formaldehyde-treated nucleohistone*. Biochemistry, 1969. **8**(8): p. 3214-8.
45. Start, R.D., et al., *Reassessment of the rate of fixative diffusion*. J Clin Pathol, 1992. **45**(12): p. 1120-1.
46. Buesa, R.J., *Histology without formalin?* Annals of diagnostic pathology, 2008. **12**(6): p. 387-96.
47. Pearse, A.G.E., *Histochemistry, Theoretical and applied* 3th ed. Vol. 1. 1968, Boston: Little Brown and Co.
48. Werner, M., et al., *Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry*. Am J Surg Pathol, 2000. **24**(7): p. 1016-9.
49. Fox, C.H., et al., *Formaldehyde fixation*. J Histochem Cytochem, 1985. **33**(8): p. 845-53.
50. Helander, K.G., *Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue*. Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission, 1994. **69**(3): p. 177-9.
51. Ramos-Vara, J.A., M.A. Miller, and G.C. Johnson, *Usefulness of thyroid transcription factor-1 immunohistochemical staining in the differential diagnosis of primary pulmonary tumors of dogs*. Vet Pathol, 2005. **42**(3): p. 315-20.
52. Mason, J.T. and T.J. O'Leary, *Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and*

- infrared spectroscopic investigation*. J Histochem Cytochem, 1991. **39**(2): p. 225-9.
53. Antunes, L., et al., *Possible role of tissue shrinkage in high-temperature antigen retrieval*. Histopathology, 2006. **48**(4): p. 471-3.
  54. Shi, S.R., R.J. Cote, and C.R. Taylor, *Antigen retrieval techniques: current perspectives*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(8): p. 931-7.
  55. Rait, V.K., T.J. O'Leary, and J.T. Mason, *Modeling formalin fixation and antigen retrieval with bovine pancreatic ribonuclease A: I-structural and functional alterations*. Lab Invest, 2004. **84**(3): p. 292-9.
  56. Rait, V.K., et al., *Modeling formalin fixation and antigen retrieval with bovine pancreatic RNase A II. Interrelationship of cross-linking, immunoreactivity, and heat treatment*. Lab Invest, 2004. **84**(3): p. 300-6.
  57. Godfrey, T.E., et al., *Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 2000. **2**(2): p. 84-91.
  58. Lehmann, U. and H. Kreipe, *Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies*. Methods, 2001. **25**(4): p. 409-18.
  59. Cronin, M., et al., *Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay*. Am J Pathol, 2004. **164**(1): p. 35-42.
  60. Coura, R., et al., *An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue*. J Clin Pathol, 2005. **58**(8): p. 894-5.
  61. Williams, C., et al., *A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens*. Am J Pathol, 1999. **155**(5): p. 1467-71.
  62. Eckert, K.A. and T.A. Kunkel, *DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction*. PCR Methods Appl, 1991. **1**(1): p. 17-24.
  63. Hultman, T., et al., *Bidirectional solid-phase sequencing of in vitro-amplified plasmid DNA*. BioTechniques, 1991. **10**(1): p. 84-93.
  64. Farragher, S.M., et al., *RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(3): p. 435-45.
  65. McGhee, J.D. and P.H. von Hippel, *Formaldehyde as a probe of DNA structure. 3. Equilibrium denaturation of DNA and synthetic polynucleotides*. Biochemistry, 1977. **16**(15): p. 3267-76.
  66. van Maldegem, F., et al., *Effects of processing delay, formalin fixation, and immunohistochemistry on RNA Recovery From Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Sections*. Diagn Mol Pathol, 2008. **17**(1): p. 51-8.
  67. Specht, K., et al., *Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue*. Am J Pathol, 2001. **158**(2): p. 419-29.
  68. Finkelstein, S.D., et al., *Cold-temperature plastic resin embedding of liver for DNA- and RNA-based genotyping*. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 1999. **1**(1): p. 17-22.
  69. Shibata, D., W.J. Martin, and N. Arnheim, *Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology*. Cancer Res, 1988. **48**(16): p. 4564-6.
  70. Kingsbury, A.E., et al., *Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1995. **28**(2): p. 311-8.
  71. Dubeau, L., et al., *Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens*. Cancer Res, 1986. **46**(6): p. 2964-9.
  72. Shedlock, A.M., et al., *Enhanced DNA extraction and PCR amplification of mitochondrial genes from formalin-fixed museum specimens*. BioTechniques, 1997. **22**(3): p. 394-6, 398, 400.
  73. Tokuda, Y., et al., *Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde*. J Clin Pathol, 1990. **43**(9): p. 748-51.
  74. Foss, R.D., et al., *Effects of fixative and fixation time on the extraction and polymerase chain reaction amplification of RNA from paraffin-embedded tissue. Comparison of two housekeeping gene mRNA controls*. Diagn Mol Pathol, 1994. **3**(3): p. 148-55.
  75. Ribeiro-Silva, A., H. Zhang, and S.S. Jeffrey, *RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies*. BMC Mol Biol, 2007. **8**: p. 118.
  76. Frank, M., et al., *Global gene expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded tumor samples: a comparison to snap-frozen material using oligonucleotide microarrays*. Virchows Arch, 2007. **450**(6): p. 699-711.
  77. Institut National du Cancer, I., *Les tumorothèques Hospitalières : Recommandations à l'usage des cliniciens et des chercheurs*. novembre 2006.
  78. AFAQAP, c.O.e.f.d.S.A., *Gestion d'une structure ACP: recommandations et reglementations 2ème version- Août 2008*.
  79. Yamashita, S., *Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry*. Progress in histochemistry and cytochemistry, 2007. **41**(3): p. 141-200.
  80. Haute Autorité de Santé, H., *Recommandations de Bonne Pratique: Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin* Septembre 2009.
  81. Beltramo, P., et al., *Utilisation de l'azote liquide en toute sécurité* La gazette de la transfusion 1997. **135**: p. 37-42.
  82. Jeffrey, S.S., P.E. Lønning, and B.E. Hillner, *Genomics-based prognosis and therapeutic prediction in breast cancer*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN, 2005. **3**(3): p. 291-300.
  83. Stanta, G., et al., *A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues*. Diagn Mol Pathol, 2006. **15**(2): p. 115-23.
  84. Wang, S.S., et al., *Cervical tissue collection methods for RNA preservation: comparison of snap-frozen, ethanol-fixed, and RNAlater-fixation*. Diagn Mol Pathol, 2006. **15**(3): p. 144-8.
  85. Gillespie, J.W., et al., *Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies*. Am J Pathol,



2002. **160**(2): p. 449-57.

86. Lacroix-Triki, M.L., L. Allal Cuider, B. Decha, A. Voigt, J. J. Rochaix, P., *RCL2 a new non toxic fixative allowing extraction of high quality DNA, mRNA and protein from paraffin embedded tissues*. Soumis pour publication.
87. Delfour, C., et al., *RCL2, a new fixative, preserves morphology and nucleic acid integrity in paraffin-embedded breast carcinoma and microdissected breast tumor cells*. The Journal of molecular diagnostics : JMD, 2006. **8**(2): p. 157-69.
88. Chu, P.G. and L.M. Weiss, *Expression of cytokeratin 5/6 in epithelial neoplasms: an immunohistochemical study of 509 cases*. Mod Pathol, 2002. **15**(1): p. 6-10.