

# PROBLEMES LIES AUX COUPES DE TISSUS CONGELES ET SOLUTIONS

Baraige F.<sup>1</sup>, Capilla F.<sup>2</sup>, Fontaine L.<sup>3</sup>, Gadot N.<sup>4</sup>, Gutknecht L.<sup>5</sup>,  
Morel G.<sup>6</sup>, Ripoll C.<sup>7</sup>, Thillou F.<sup>8</sup>

*<sup>1</sup>Université de Limoges*

*<sup>2</sup>CHU Purpan, Toulouse*

*<sup>3</sup>INSERM, Toulouse*

*<sup>4</sup>Centre Léon Bérard, Lyon*

*<sup>5</sup>Histalim, Montpellier*

*<sup>6</sup>CNRS, Lyon*

*<sup>7</sup>INERM, Montpellier*

*<sup>8</sup>Episkin Loréal, Lyon*

## **INTRODUCTION**

La première journée à thème de l'AFH s'est organisée sous forme de table ronde pour des échanges sur la congélation des tissus et des cryocoupes. Qui n'a pas déjà rencontré des difficultés à la coupe d'un tissu congelé ? Problématiques dues à la préparation des échantillons, à la congélation ou à la coupe elle-même, sans oublier le stockage de la pièce congelée ou des coupes... La finalité recherchée pour l'usage de ces coupes est généralement

l'immunohistochimie, mais ces considérations générales restent valables pour la plupart des applications possibles des coupes congelées. Voici quelques éléments de réponse présentés lors de la réunion qui s'est tenue à Paris le 17 octobre 2014.

## **PRÉPARATION DES TISSUS DESTINÉS À ÊTRE CONGELÉS**

Dans le cas d'une étude destinée à la détection de macromolécules par immunomarquage, il est préférable de procéder à

une congélation des tissus en évitant toute fixation par des agents chimiques ou physiques. Cependant il est possible de préfixer les tissus dans le cas de la détection d'antigènes non modifiés par la fixation et d'épitopes non conformationnels.

### ***But de la fixation***

Le but de la fixation est de maintenir les tissus ou les organes prélevés dans un état le plus proche possible de l'état ante mortem en évitant les conséquences de la privation en oxygène après la mort et le dessèchement après le prélèvement. La fixation empêche donc à la fois la dégradation du tissu par les enzymes cellulaires libérées au moment de la mort des cellules, et sa putréfaction liée à la prolifération bactérienne. Elle consiste à immobiliser/stabiliser les tissus *in-situ*, en particulier les antigènes, en préservant l'aspect structural du tissu. La fixation dépend de la nature chimique des molécules à détecter (glucides, lipides, protéines, acide nucléiques, ...)

Elle peut être physique, par le froid (congélation), par une déshydratation ou lyophilisation (chaleur-micro-onde) ou chimique. Les fixateurs chimiques les plus couramment utilisés sont les solutions coagulantes ou précipitantes (alcools, cétones, acide picrique, acide acétique...), ou les agents pontants (formaldéhyde, glutaraldéhyde).

### ***Choix du fixateur chimique***

Le choix du fixateur est orienté par le type d'observation envisagée, la fixation doit préserver des détails d'autant plus fins que

le pouvoir de résolution du microscope utilisé est élevé (structures à préserver, molécules à immobiliser). En effet les glucides, les lipides et les protéines ne vont pas réagir de manière identique vis-à-vis d'un fixateur.

De manière générale, le fixateur le plus couramment utilisé est le formaldéhyde préparé à partir d'une poudre de paraformaldéhyde. Cette fixation permet la préservation des structures les plus fines. La solution de formol doit être tamponnée et utilisée rapidement car le formol (méthanal) est facilement oxydé par le dioxygène de l'air pour former de l'acide formique. C'est pourquoi il faut conserver le formol dans des récipients bien étanches et l'utiliser rapidement.

Durée de fixation, tampon, température sont les paramètres à optimiser pour l'étude envisagée.

Si la fixation se fait par immersion : le volume du liquide fixateur doit représenter 20 fois celui de l'échantillon, la durée de fixation dépend de la consistance et de l'épaisseur de l'échantillon : 5 mn pour les cellules isolées, 1 à 2 h pour des fragments de 1 mm, sous agitation modérée et à 4°C pour éviter le phénomène d'autolyse.

Si la fixation se fait par perfusion intracardiaque : c'est la méthode la plus rapide qui préserve au mieux les tissus car les organes à prélever sont immédiatement fixés *in situ*. Le fixateur le plus utilisé est le paraformaldéhyde (microscopie photonique) ou le glutaraldéhyde (microscopie élec-

tronique). Cette méthode permet une très bonne pénétration du fixateur via les vaisseaux et les capillaires. C'est une méthode de choix pour la fixation du cerveau et de la moelle épinière chez les rongeurs. Elle peut également être suivie par une fixation par immersion à 4°C, sous agitation douce (mais attention à la surfixation).

### ***Contraintes de la fixation chimique***

Il est indispensable de respecter au mieux les caractéristiques physico-chimiques des fluides cellulaires pour éviter que les mouvements d'eau et d'ions n'affectent les cellules avant la réticulation.

Les caractéristiques physico-chimiques prises en considération avant et pendant la fixation sont l'osmolarité, la force ionique et le pH.

Le rôle de l'osmolarité : elle joue un rôle très important. La fixation doit être effectuée en légère hyperosmolarité pour compenser la dilution du fixateur par l'eau libérée par les tissus. Chez les mammifères (rongeurs) l'osmolarité de référence est de 300 mosmol. Le tampon phosphate (mono-diphosphate) à 0,1 M correspond au milieu ionique circulant.

Le réajustement osmotique nécessaire peut être réalisé uniquement à l'aide du tampon. La correction peut alors être faite par addition de sucre (glucose ou saccharose).

Le pH a un rôle essentiel au niveau des protéines : il agit sur la conformation, la

polymérisation et la dissolution. Des modifications structurales à tous les niveaux de la cellule peuvent apparaître en fonction du pH. Le pH au voisinage de la neutralité (7,2-7,4) doit être maintenu tout au long de la fixation. Etant donné que la fixation peut acidifier le milieu, il faut utiliser un système tampon efficace pour l'absorption des ions H<sup>+</sup> libérés. En effet, la propriété d'un tampon est la capacité à résister aux changements de concentrations en ions H<sup>+</sup> et de maintenir le milieu à un pH déterminé.

### ***Pré-fixation chimique - avantages***

Cette méthode permet de préserver l'architecture de l'échantillon aussi proche que possible de l'état natif, tout en rendant les antigènes accessibles. Une fixation chimique avant congélation permet également de procéder aux dissections fines sans engendrer d'autolyse des tissus. La préservation de l'architecture des tissus est obtenue au cours de ces manipulations. Les blocs de tissus sont conservés à -80°C dans de bonnes conditions (peu de formation de cristaux au cours du temps, ≤ 3 mois, si le prélèvement est enrobé de TissuTek). Une cryoprotection de l'échantillon peut être également réalisée avant sa congélation (voir ci-dessous). Ce n'est qu'en cas d'insuccès que l'on choisira des fixations plus douces, voir l'absence de fixation par agent chimique.

### ***Pré-fixation chimique - inconvénients***

La fixation chimique peut entraîner des effets pervers sur l'étude histologique comme 1) une modification chimique des antigènes pouvant réduire la réaction anti-

gène-anticorps, 2) une modification des charges du tissu et/ou de l'antigène avec une répulsion des anticorps, 3) une réticulation du tissu pouvant nuire à la diffusion des réactifs, 4) la formation de molécules auto-fluorescentes (certains neurotransmetteurs comme la sérotonine ou la noradrénaline).

Une sur-fixation stabilise les structures tissulaires mais réduit la sensibilité des détections possibles. Quoiqu'il en soit ce problème « insoluble » est à résoudre pour chaque cas expérimental.

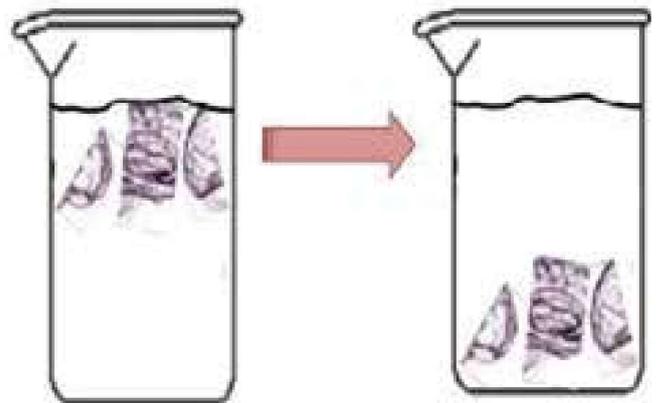
Si la fixation est nécessaire, celle-ci devra être en adéquation pour ne pas réduire les avantages apportés par la congélation c'est-à-dire la sensibilité.

### ***Cryoprotection***

La formation des cristaux de glace peut être minimisée en imprégnant le tissu d'un liquide cryoprotecteur (toujours sur tissu ayant subi une fixation chimique préalable), en réalisant une congélation ultra-rapide qui ne laisse pas le temps aux cristaux de glace de se former et de grandir, ou encore en congelant les tissus sous très forte pression (supérieure ou égale à 2 000 atmosphères). Notons cependant que la formation de microcristaux peut avoir un effet bénéfique sur l'immunoréaction en facilitant la diffusion des réactifs dans l'épaisseur des tissus et des coupes. Parmi ces substances, on trouve le saccharose, le dextran, le glycérol ou encore le DMSO. L'utilisation de solutions hyperosmolaires peut cependant provoquer, si les tissus sont peu ou pas fixés, des perturbations

osmotiques avec leur cortège d'artefacts (condensation du cytoplasme, dilatation des espaces extracellulaires).

La substance la plus utilisée est le saccharose à des concentrations variant, suivant les auteurs, de 0,4M (en tampon phosphate, ce qui correspond à l'osmolarité du tissu), jusqu'à 2,3 M, (concentration de saturation, à déconseiller car s'accompagne du phénomène d'hyperosmolarité). Des bains dans un gradient progressif de sucrose permettent une bonne imprégnation du tissu pour des concentrations hyperosmolaires (30-50%). La chute du tissu au fond du contenant étant la confirmation de l'imprégnation du prélèvement (Figure 1).



**Figure 1:** Principe de l'incubation d'un tissu dans une solution d'agent cryoprotecteur. L'imprégnation est totale lorsque le prélèvement est tombé au fond du contenant.

Un exemple : l'embryon est constitué de plus de 90 % d'eau. Pour éviter la formation de cristaux de glace qui par augmentation de volume déchireraient les membranes cellulaires lors de la congélation, il est nécessaire d'incuber le prélèvement dans des concentrations de sucrose pouvant atteindre 50%. L'eau est rempla-

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

### ***Méthodes de congélation possibles***

Le tissu à congeler, imprégné de milieu cryoprotecteur, est d'abord refroidi à une température proche du point de congélation (température de surfusion) : c'est le palier de congélation. Cette température est environ de  $-4^{\circ}\text{C}$  pour du saccharose 0,4M en tampon phosphate 100 mM pH 7,4. Puis la température est abaissée brutalement, de façon à obtenir une congélation sans cristaux de glace, comme par exemple en isopentane refroidi sur vapeurs d'azote. Le passage de l'état liquide à l'état solide se fait donc plus rapidement que dans le cas précédent puisque avant d'être congelé le tissu est à une température juste au-dessus du point de congélation. Il est à noter que l'immersion directe en azote liquide peut générer des artéfacts comme des bulles d'air ou un bloc fragmenté.

Une autre méthode possible consiste à orienter le tissu cryoprotégé dans un moule, à l'enrober d'OCT Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (milieu d'enrobage qui polymérise à froid) et à le plonger immédiatement dans de l'isopentane refroidi sur vapeurs d'azote pour être congelé. L'enrobage peut se faire également avec de la gélatine ou de l'agarose pour les petites pièces. Le rouge neutre peut être utilisé pour colorer les petites pièces difficiles à

visualiser lors de la coupe.

### ***Fixateurs physiques***

Dans l'objectif d'une détection de molécule avec une sensibilité optimale (i.e. un antigène, un acide nucléique faiblement exprimé). Il est possible d'utiliser un tissu congelé, mais la congélation est délicate avec perte d'information morphologique.

La congélation évite l'inclusion dans un milieu hydrophobe préservant au mieux l'antigénicité et les acides nucléiques. La congélation, par abaissement brutal de la température en azote liquide, empêche l'autolyse et, le prélèvement durci peut être coupé directement au cryostat.

### ***Congélation rapide par immersion directe dans un liquide refroidi***

La congélation directe dans l'azote liquide est déconseillée à cause du phénomène de caléfaction. En effet, l'azote liquide étant à sa température d'ébullition ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), il se forme instantanément au contact du tissu des bulles d'azote gazeux qui ralentissent considérablement le transfert du froid et ainsi la congélation. Il est préférable d'utiliser un milieu cryogénique intermédiaire (éthane, propane, isopentane, Fréon 2299, etc.) qui sera refroidi dans l'azote liquide à  $-80^{\circ}\text{C}$  (pour l'isopentane en phase liquide). Il existe aujourd'hui des appareils munis d'un groupe froid  $-80^{\circ}\text{C}$  (SNAPFROST®) permettant d'éviter l'utilisation de l'azote liquide et de travailler dans des conditions de sécurité plus favorables pour le manipulateur.

En passant à l'état de glace, l'eau

s'organise en cristaux d'autant plus gros que le refroidissement est lent. Ces cristaux endommagent la structure des tissus. Si le refroidissement de l'échantillon est suffisamment rapide, les cristaux de glace n'ont pas le temps de croître : leur taille reste en dessous du pouvoir séparateur du microscope. On estime que pour une bonne préservation ultrastructurale la vitesse de refroidissement doit atteindre 100 000 °C/seconde.

L'avantage de cette technique : Elle est rapide. Si nécessaire des résultats peuvent être fournis moins d'une heure après le prélèvement. De plus, sans fixation, ni milieu d'inclusion, il n'y a pas de perturbation de la reconnaissance antigène-anticorps par l'élution éventuelle des antigènes lors des nombreuses étapes comme l'hydratation/déshydratation du tissu, les traitements chimiques, les solvants (absence de molécules chimiquement réactives dans le milieu d'inclusion).

C'est une technique de choix d'une part pour la mise en évidence d'antigènes « difficiles » (pour lesquels on ne dispose pas de « bons » anticorps, mais également lors d'une étude sur des antigènes liposolubles (pas de solvants organiques).

Les coupes réalisées dans les blocs de tissus pré-fixés montrent souvent des artefacts de congélation alors que la préservation des coupes obtenues à partir de blocs non fixés semble meilleure. Cette observation *a priori* surprenante s'explique facilement. Les cristaux de glace créent des trous. La structure des tissus fixés est

rigide : après la fonte de la glace les trous persistent. Au contraire les tissus non fixés restent fluides et les trous disparaissent à la décongélation.

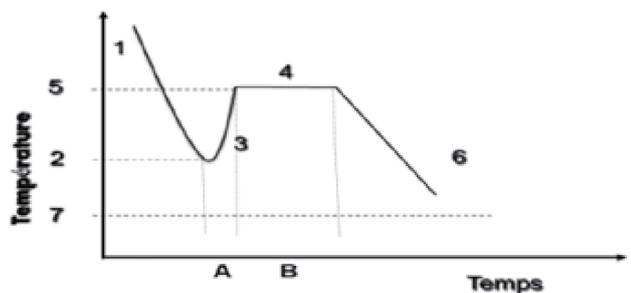
Les inconvénients de cette technique : notons que les tissus congelés doivent être stockés à une température aussi basse que possible (-80° C ou mieux). A -20° C, les cristaux de glace ont tendance à augmenter en taille au cours du temps. Le temps de conservation des blocs est limité (quelques mois à -80° C). En général, les phénomènes qui peuvent abîmer les cellules pendant la cryoconservation se produisent lors du gel, et comprennent les effets de solution, la formation de glace hors et au sein des cellules, la déshydratation. La formation de glace hors des cellules se produit lorsque les tissus se refroidissent lentement, l'eau s'échappe des cellules et la glace se forme dans l'espace intercellulaire. Trop de glace entre les cellules peut produire un effet d'écrasement. La fuite d'eau (qui forme la glace extracellulaire) entraîne également la déshydratation de la cellule. De plus, si le niveau de glace au sein des cellules est élevé, l'effet est toujours dévastateur pour la structure.

## **PRINCIPE DE LA CONGÉLATION (PASSAGE D'UN ÉTAT LIQUIDE À SOLIDE)**

La définition de la congélation donnée par Wikipédia est la suivante : « *On appelle congélation toute technique visant à faire passer un produit à l'état solide par des techniques de refroidissement forcé. On parle de congélation principalement pour l'eau et les produits qui en contiennent* ».

Celle du Larousse donne : « *Transition de phase au cours de laquelle un corps passe de l'état liquide à l'état solide* ». La congélation n'est pas un état spontané, elle est induite par un apport de froid, c'est un changement de phase dépendant de la température. Pour les tissus animaux ou végétaux, elle ne concerne que l'eau et les solutés qu'elle contient.

La principale difficulté de l'étude de ce phénomène réside dans le fait que l'eau d'un organisme n'est pas l'eau pure contenue dans le récipient d'un laboratoire. Considérons dans un premier temps ce cas simplifié. Omettons le contenant et les interactions potentielles. Que se passe-t-il lors d'un apport de froid constant et régulier sur de l'eau pure ? Un enregistreur thermique, n'interférant pas avec le système, montre la courbe de refroidissement suivante (Figure 2).

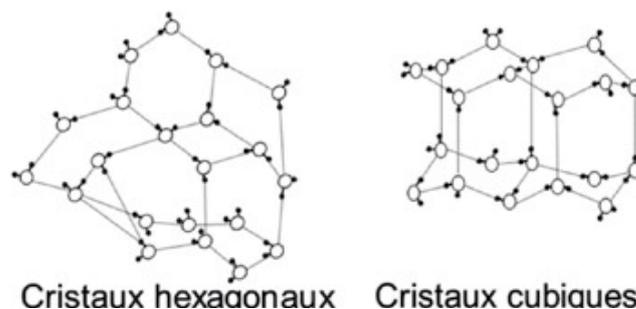


**Figure 2:** Descente en température de l'eau pure : étapes de sa congélation. Les températures 1-7 correspondent aux différentes phases de refroidissement. A et B respectivement à la multiplication et à l'accroissement de la taille des cristaux.

En refroidissant un volume d'eau avec une vitesse constante, l'eau en phase liquide descend en température suivant une courbe que l'on peut considérer comme linéaire (1), bien que sa masse volumique

est minimale à 4 °C, mais sa température descend au-delà de 0 °C jusqu'au point 2 (qui n'est pas une constante mais dépend des conditions expérimentales) tout en restant en phase liquide. Ce point est appelé « point de surfusion » (2), et délimite le pic de surfusion. En ce point 2 apparaît le premier cristal de glace. C'est ce phénomène, dit de nucléation, qui est exergonique entraînant la remontée en température (3). Puis la stabilisation du mélange à la température de 0 °C (4) correspond au mélange eau-glace. Les cristaux augmentent de taille (B) mais ne se multiplient plus. Lorsque toute l'eau liquide est agglomérée en cristaux, la glace est prise en masse et peut se refroidir à nouveau (6) jusqu'à la température de l'agent cryogénique utilisé comme source de froid (7).

Les cristaux ainsi formés sont dit hexagonaux (Figure 3). Le volume que l'eau occupe dans cet état est supérieur à celui de sa phase liquide. Une bouteille d'eau éclate si elle gèle. Au cours de la congélation d'une cellule celle-ci subira des contraintes mécaniques dues à la dilatation de l'eau constituant son milieu intérieur lorsqu'elle se solidifiera. Mais il existe



**Figure 3:** Etat cristallin des molécules d'eau. Après une congélation lente les cristaux de glace forment des cristaux hexagonaux. A vitesse rapide les cristaux formés sont cubiques.

d'autres cristaux de glace, les cristaux cubiques (Figure 3). Ces derniers sont obtenus par des vitesses de congélation dites « rapides » (e.g.  $\geq 100^\circ\text{C}/\text{minute}$ ). L'augmentation volumique est moindre et donc les conséquences mécaniques réduites.

La vitesse de refroidissement augmente et la taille des cristaux diminue. Cette constatation a des limites techniques facilement vérifiables. Jeter un prélèvement dans l'azote liquide ( $-196^\circ\text{C}$ ) n'a jamais permis de congeler correctement un prélèvement. Les échanges thermiques sont limités par la vaporisation de l'azote autour du prélèvement qui crée une couche isolante limitant son refroidissement.

Toutefois il existe une méthode théoriquement parfaite : la congélation haute pression. C'est la méthode qui permet de passer de la phase liquide de l'eau à la glace amorphe, phase solide de l'eau sans cristaux, idéale pour l'observation directe (2). Différents appareils ont été développés, un seul persiste sur le marché. Cependant cette technique présente deux inconvénients majeurs : la petite taille des prélèvements nécessaire et son coût.

Un autre inconvénient de la congélation est qu'elle ne correspond pas à un état stable. Des remaniements de la glace existent dans le temps en fonction de sa température. En dessous de  $-100^\circ\text{C}$  la glace est stable. A  $-80^\circ\text{C}$  son remaniement sera plus lent qu'à  $-20^\circ\text{C}$ . Le remaniement n'est pas instantané mais se développe dans le temps et est d'autant plus rapide que la température est proche de  $0^\circ\text{C}$ . Ce

remaniement cristallin se caractérise par la croissance des cristaux de glace. Plus un prélèvement congelé est stocké longtemps, plus sa morphologie se dégrade. Et ceci d'autant plus qu'il est stocké à une température supérieure à  $-100^\circ\text{C}$ . Ce phénomène est caractéristique de la glace amorphe où les cristaux peuvent apparaître sous le faisceau du microscope.

La théorie de l'eau pure est une chose, les cellules et les tissus en sont d'autres. Les structures animales ou végétales ne sont pas constituées que par de l'eau, ni des solides flottant dans de l'eau. Il est possible de congeler des cellules, des tissus, même des organismes vivants et de les décongeler avec un taux de survie important. Mais là n'est pas la question, puisque nous congelons des « structures » pour les observer. Une cellule par exemple est une individualité caractérisée par son enveloppe, son noyau, ses organites d'une part et, sa position dans le tissu, l'organisme d'autre part. La finalité de l'étude peut être primordiale. La morphologie dans son état le plus proche possible de la réalité est essentiellement le but de la congélation en microscopie électronique. Pour plus de détails consultez l'ouvrage [2]. En microscopie photonique cela n'a qu'un intérêt restreint.

Ceci est la théorie, des expériences personnelles peuvent être présentées pour tous les cas particuliers avec succès. La congélation est une méthode avec ses avantages, ses inconvénients et ses applications. Des bases physiques existent, des expériences et des réalisations pour des cas particuliers.

## **LES CONDITIONS RÉDHIBITOIRES OÙ IL FAUT ABANDONNER TOUTE TENTATIVE...**

### ***Décongélation et/ou re-congélation***

Quelle que soit la raison ayant entraînée une décongélation du prélèvement, même suivi d'une recongélation, ce prélèvement est perdu pour une étude «raisonnable». La congélation conduit à une modification du tissu qui est irréversible. Même avec cryoprotecteur, ou même à cause de celui-ci, les cellules sont perméabilisées mécaniquement par l'augmentation de volume de l'eau au cours de la congélation ou, par diffusion d'une solution souvent hyperosmolaire, ces deux cas vont entraîner des artefacts. Sur une coupe fine de tissu, les cellules ne sont plus entières et les contraintes mécaniques de la décongélation sont beaucoup moins évidentes.

### ***Séchage du prélèvement***

Une coupe de tissu congelé est fine pour être observée facilement au microscope. Sa masse est faible et son séchage rapide dans de bonnes conditions. Une durée de 10 à 30 mn, la température ambiante, une atmosphère sèche, une ventilation sont de bonnes conditions, comme le rebord d'une hotte ventilée par exemple. A l'inverse, de mauvaises conditions (chambre du cryostat froid, rebord d'une fenêtre un jour de pluie, un rangement immédiat) vont laisser des traces d'humidité et permettre à des enzymes lytiques de faire leur œuvre et de détruire les composants du tissu. Un stockage au froid, lors de l'ouverture de la boîte, entraîne une condensation sur les autres lames qui resteront stockées.

### ***Mauvaise cryoprotection***

Le but de la cryoprotection étant la préservation des structures après congélation, une mauvaise cryoprotection se caractérise par une mauvaise congélation (e.g. présence de cristaux de glace, cassure...).

Mais hélas elle ne s'arrête pas là. Comme cela a été montré précédemment deux facteurs sont capitaux pour un effet optimum : la durée d'incubation et la concentration de l'agent cryoprotecteur.

- Comme l'a montré la figure 1, tant que le prélèvement n'est pas imprégné totalement, il ne tombe pas au fond du récipient. Seule cette chute garantit l'imprégnation.
- La concentration de l'agent cryoprotecteur dans le tampon est beaucoup plus complexe. En microscopie électronique, l'osmolarité est capitale [2]. En microscopie photonique l'œil s'accommode de la présence d'artéfact compris dans l'épaisseur de la coupe. Mais des dilatactions des espaces intercellulaires ou de l'espace nucléaire sont parfois visibles et entraînent des problèmes au niveau de la coupe. Les cellules et/ou les noyaux sont moins jointifs et montrent des cassures ou même la disparition de certains noyaux.

Certains agents cryoprotecteurs peuvent aussi interférer avec les étapes suivantes (immunohistochimie, hybridation *in situ*, analyse...) et la nature de cet agent cryoprotecteur doit être neutre avec la finalité de ces coupes. Le saccharose est le plus utilisé en routine mais il en existe de nombreux autres : DMSO (propriété d'extraction), glycérol (tissu mou, nécessité de

couper à des températures plus basses), tréhalose (non réducteur à l'inverse du saccharose)...

## LA CRYOCOUCPE

Les échantillons congelés vont pouvoir être coupés à l'aide d'un cryostat (Figure 4). Le cryostat est constitué d'une en-



**Figure 4 :** Exemples de cryostat actuellement commercialisés.

ceinte réfrigérée équipée d'un microtome à moteur pas à pas permettant de garantir la précision de l'épaisseur des coupes. Différents modèles d'appareils existent dont certaines caractéristiques techniques peuvent varier. Le choix se fera alors en fonction de la nature des échantillons, du débit d'analyses.... Différents paramètres pourront être réglés tels que la température du porte-objet, la température de l'enceinte, l'épaisseur de coupe depuis le pupitre de contrôle.

En fonction des modèles utilisés, la température du porte objet n'est pas forcément indépendante de celle de l'objet mais attention à l'inertie de réponse dans ce cas. Il sera important de faire varier la température de l'enceinte et/ou du porte objet en fonction de la dureté de l'échantillon.

Quelques exemples :

- cerveau : de  $-15^{\circ}\text{C}$  à  $-25^{\circ}\text{C}$
- foie : de  $-15^{\circ}\text{C}$  à  $-25^{\circ}\text{C}$
- poumon : de  $-25^{\circ}\text{C}$  à  $-35^{\circ}\text{C}$
- testicule : de  $-10^{\circ}\text{C}$  à  $-15^{\circ}\text{C}$

En fonction du fabricant, ces températures pourront être modulées et de façon courante, le réglage se fera à  $-20^{\circ}\text{C}$  pour un 1<sup>er</sup> essai et, selon les résultats obtenus, la température sera modifiée si besoin.

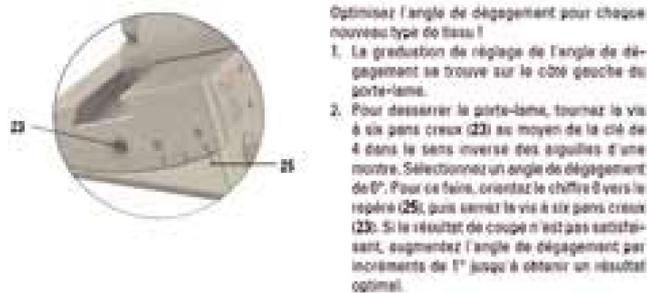
Les coupes fines obtenues avec le cryostat (généralement entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ ) peuvent être utilisées pour :

- des études de morphologie (mais le système paraffine/microtome est préférable)
- des immunomarquages et les immunofluorescences, car les coupes congelées permettent une très bonne préservation des antigènes cytoplasmiques et membranaires
- la mise en évidence des lipides
- les études d'histoenzymologie
- l'hybridation *in situ*.

Pour réaliser ces coupes, on pourra utiliser des lames jetables ou bien des couteaux (dans le cas des couteaux, il faudra alors les affûter régulièrement). L'un des paramètres également important à régler sur le cryostat est l'angle de dégagement qu'il faut adapter en fonction de la dureté du prélèvement. Plus l'objet est dur, plus l'angle de dégagement est grand ; par contre plus l'angle de dégagement est grand, plus la compression de coupe est importante. Un angle de dégagement trop petit peut entraîner des coupes d'épaisseur irrégulière. Un angle de dégagement trop plat ou trop raide ne permet pas d'obtenir des résultats de coupes optimaux et détériore les échantillons.

Après le réglage de l'angle de dégage-

ment, la position du tranchant par rapport à l'objet peut être modifiée. C'est pourquoi, il faut toujours positionner l'objet au-dessus du couteau lors du réglage de l'angle de dégagement. Dans le cas contraire, l'objet risque de heurter le couteau lors de la montée (Figure 5).



**Figure 5 :** Schéma des réglages possibles sur un cryostat.

Enfin, pour avoir des coupes de bonne qualité, il faudra être attentif au réglage de la lame anti-roll (Figure 6). Cette lame de verre permet aux coupes de s'étaler bien à plat dès leur formation. Si le système anti-roll est mal positionné par rapport au tranchant, les problèmes suivants peuvent se produire.



**Figure 6 :** Principe de réglage de la lame anti-roll.

## LA CONSERVATION DES COUPES

### *Les tissus restants*

Les tissus restants doivent être conservés à -80 °C ou dans l'azote liquide (durée indéterminée).

### *Les coupes flottantes*

Un « certain » temps, quelques heures, quelques jours au réfrigérateur si le tampon contient de l'azide de sodium. La durée d'attente est inverse à la qualité des résultats obtenus.

### *Les lames*

Après un séchage à température ambiante d'une heure au minimum, les lames doivent être conservées au sec dans un emballage étanche et peuvent être conservées à -20° C pour un usage à court terme, sinon il faut les conserver à -80°C. Avant utilisation on laisse les lames revenir à température ambiante. Il faut se souvenir que seule l'eau est « congelable » dans une coupe de tissu. Si la lame est sèche, son stockage à température ambiante est possible dans un emballage étanche.

## QUELQUES CAS PARTICULIERS

### *Le tissu adipeux*

Le tissu adipeux est majoritairement composé de lipides qui figent à basse température. Ce qui les rend difficile à couper. La température de coupe doit être très basse et l'épaisseur doit alors être réduite. Plus la température de coupe est basse, plus il faut couper fin pour obtenir des coupes qui ne se « hâchent » pas. Le tissu adipeux est aussi plus facile à couper s'il est préparé avec un autre organe.

### ***Les tissus embryonnaires***

Les tissus embryonnaires sont très riches en eau. Ce qui rend la congélation délicate. Il faut donc les cryoprotéger au maximum et bien les laisser couler dans le sucrose 30 % voire 40 %. La congélation doit par ailleurs être très rapide pour empêcher les gros cristaux de se former.

### ***Les poumons***

Le poumon est un organe qui est souvent rempli d'air à l'autopsie. Les bronches et bronchioles qui le composent sont aussi « vides » et peuvent donc être collapsées, ce qui rend l'observation difficile. Pour bien observer les structures du poumon il faut donc « remplir » le poumon afin de dilater les bronches et alvéoles. Pour cela on peut soit insuffler dans le poumon frais du formol afin de le fixer en position gonflée puis de le cryoprotéger dans du sucrose. Il est aussi possible de garder les poumons frais avant de les congeler et dans ce cas de tenter d'insuffler de l'OCT dans l'organe. L'OCT étant un liquide visqueux cela peut être difficile et endommager le tissu. Il faut savoir que plus l'OCT est chaud moins il est visqueux, il est donc possible de chauffer un peu l'OCT avant de l'insuffler. L'organe est ensuite enrobé puis congelé.

### ***L'os***

L'os étant un tissu calcifié il nécessite une décalcification avant de pouvoir être coupé au cryostat. La décalcification implique que le tissu doit être fixé. La méthode de décalcification est au choix : EDTA, acide, micro-ondes. Comme tout tissu fixé l'os doit alors être cryoprotégé avant d'être congelé. La cryoprotection se

fait dans des bains successifs de sucrose 20 % puis 30 %.

### ***L'œil***

L'œil contient l'humeur vitrée qui est composée à 98-99 % d'eau. Cette substance est contenue dans l'œil ce qui fait que lors de la congélation l'humeur vitrée formera un glaçon à l'intérieur de l'œil. Cela rendra le prélèvement difficile à couper par la suite et pourrait aussi endommager les structures. Lors de la cryoconservation de l'œil il est alors indispensable de percer la cornée avec une aiguille pour laisser l'humeur vitrée s'en échapper. L'œil ainsi percé pourra alors être immergé dans le fixateur, le trou permettra alors aussi au fixateur de pénétrer dans l'organe. Ensuite l'œil devra être cryoprotégé avant d'être congelé.

## **LES ARTÉFACTS**

Les artéfacts observés sur les coupes de matériel congelé se manifestent de différentes manières mais sont dus essentiellement à deux étapes : la congélation et la coupe. Les artéfacts dus au prélèvement, à la fixation et aux autres étapes précédant l'observation ne sont pas abordés ici.

### ***De congélation (macroscopiques et microscopiques, Figure 7)***

Les fissures sont essentiellement dues à une congélation dont la vitesse est inadéquate ou à une coupe à trop basse température. Les fissures telles qu'elles sont observables macroscopiquement, sont souvent présentes dans le prélèvement et sont accentuées par la coupe.

Les trous sont principalement le résultat d'une mauvaise congélation, ce qui veut dire congélation inadéquate au tissu étudié. Le cerveau est un exemple typique. Il en existe de nombreux autres, en général des tissus hétérogènes. Le cerveau à l'échelle macroscopique est constitué de substance blanche, essentiellement constitué de lipides et de substance grise constitué de matériel cellulaire. Les tissus riches en lipides ne se congèlent pas de la même façon que les autres organes car les lipides nécessitent une température de congélation plus basse.

Le front de congélation caractérise une



**Figure 7 :** Artéfacts observables sur le bloc de tissu congelé, ici le cerveau. Problèmes de congélation pour un tissu hétérogène :

- A : La flèche indique un front de congélation, limite du tissu correctement congelé ;
- B : Problème de vitesse de congélation, des trous sont visibles dans la substance blanche et grise ;
- C : Fissure, le cerveau risque de se casser pendant la coupe ;
- D : Front de congélation apparent (flèche), trous liés à des cristaux de glace dus à une congélation trop lente ;
- E : Trous liés aux cristaux dans la substance blanche et grise ;
- F : Coupe flottante de tissu congelé (bloc E), les artéfacts de congélation sont manifestes ;
- G : Hétérogénéité de congélation tissulaire et présence de fissures ;
- H : Artéfacts dus à la coupe sur une congélation convenable.

congélation hétérogène ou une décongélation partielle (Figures 7A et 7D). Le prélèvement n'était pas correctement immergé dans l'agent cryogénique (en particulier lors de l'usage de l'isopentane). Ou il a subi une décongélation partielle au cours du stockage, du montage sur le support ou dans le cryostat. Les causes sont variables et nombreuses. Le résultat est similaire : la coupe est difficile et souvent inexploitable.

### ***De découpe (Figure 8)***

Les bulles peuvent être générées lors du montage des coupes sur les lames. Que ce soit sur coupe en paraffine ou à congélation, ce problème de montage reste identique. La coupe n'a pas été collée à un support généralement une lame de verre et une bulle d'air est emprisonnée (Figure 8B). Un trou avec une pointe lancéolée peut réduire cet artéfact de montage à un trou. Laisser cette bulle conduira au décollement de la coupe au cours des manipulations ultérieures.

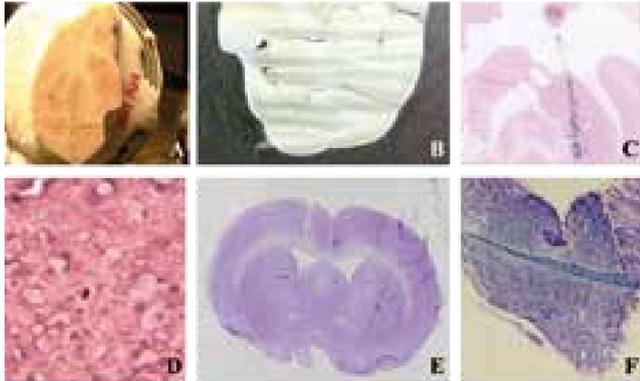
Les plis sont des artéfacts de coupe plus courants qu'en paraffine et les coupes à congélation sont alors friables, cassantes... Le coup de main du manipulateur est capital.

Les stries sont au départ dues au couteau qui serait lui-même strié par des impacts sur le fil. En congélation d'autres causes sont aussi à prendre en compte :

- Une congélation hétérogène,
- Un problème d'hétérogénéité du tissu après congélation,
- Des cristaux de glace présents dans certaines zones du tissu.

Le plus souvent ce sont des débris de coupe qui restent accrochés au couteau qui peuvent entraîner ces stries (Figure 8B).

Les vibrations sont fréquentes lors de la coupe de tissu congelé (Figure 8C).



**Figure 8** : Artéfacts obtenus sur des coupes de tissus congelés :

- A : Bloc de cerveau sur lequel une strie est apparente;
- B : Coupe congelée sur le couteau, montrant des vibrations, des trous, des cassures et des stries ;
- C : Coupe de cerveau congelé sur laquelle des vibrations, des bulles et des plis sont visibles ;
- D : Coupe colorée qui révèle de nombreux espaces lacunaires ;
- E : Coupe de cerveau colorée qui présente des bulles, des plis et des trous ;
- F : Coupe de muscle révélant les ATPases montrant des plis et des bulles.

Les principales causes sont la vitesse de coupe irrégulière et la fixation du couteau ou de l'échantillon. Le passage du bloc de tissu congelé contre le couteau entraîne un réchauffement de celui-ci. La coupe très fine absorbe cette chaleur et se réchauffe.

Certaines zones plus que d'autres d'où les modifications de tension et les artéfacts mécaniques. Ils seront additionnels à ceux du réchauffement final lors de l'application de la coupe froide sur la lame de verre chaude.

## CONCLUSION

La coupe à congélation a une longue histoire tant en anatomie pathologique qu'en recherche. Tout d'abord utilisée en microscopie photonique pour sa rapidité d'obtention, elle l'est maintenant pour sa sensibilité pour de nombreuses techniques de détection moléculaire. Nous sommes loin des années où le microtome était placé dans un congélateur. L'appareillage s'est développé ainsi que les systèmes connexes qui ont simplifié la réalisation des coupes de tissu congelé. Persiste la difficulté de la congélation qui reste encore empirique. Ses inconvénients majeurs sont la pauvreté morphologique, le matériel spécifique nécessaire à cette méthode et la dextérité du manipulateur pour les réaliser.

## REMERCIEMENTS

Nous adressons nos remerciements à Sophie Luccantoni et à Sandra Dovéro pour l'organisation de cette journée à thème, ainsi que pour avoir fourni les images qui illustrent certains points de cet article.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Gulik Thaddée Congélation des échantillons biologiques. In : Microscopie électronique : cryométhode, immunocytoologie, autoradiographie, hybridation *in situ*. G. Morel ed., Editions INSERM, 1991, pp 5-30.

2. Handbook of Cryo-Preparation, Methods for electron microscopy. A. Cavalier, D. Spehner, B. M. Humbel eds. CRC Press, Boca Raton, 2009, 682 p.