

ETUDE COMPARATIVE DES PROPRIETES FIXATRICES DU **FORMOL** ET DU **GLYOXAL** EN PRATIQUE ANATOMOPATHOLOGIQUE



Octobre 2008

Nancy-Université

N. Marcon⁽¹⁾, A. Bressenot⁽¹⁾, K. Montagne⁽¹⁾, C. Bastien⁽¹⁾,
J. Champigneulle⁽¹⁾, E. Albuissou⁽²⁾, F. Plénat⁽¹⁾

(1) Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, (2) Département d'information médicale

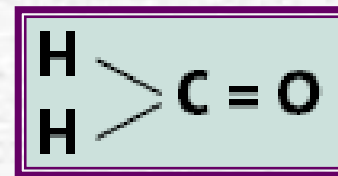
SOMMAIRE

- ✓ ***La fixation actuellement***
- ✓ ***La substitution***
- ✓ ***Étude du glyoxal en tant que fixateur***
 - ✓ **Les solutions étudiées**
 - ✓ **Les caractéristiques étudiées**
 - ✓ **Diffusion et cinétique de réaction**
 - ✓ **Respect de la micro-anatomie**
 - ✓ **Histochimie**
 - ✓ **Conservation de l'antigénicité**
 - ✓ **Effets sur les acides nucléiques**
- ✓ ***Discussion***
- ✓ ***Conclusion***

LA FIXATION

- Étape technique essentielle en Anatomie Pathologique, permettant la préservation des aspects macroscopiques et microscopiques des tissus et cellules

LE FORMALDEHYDE



- ✓ Agent fixant le plus utilisé depuis plus d'un siècle (1893), sous forme de solutions diluées ou de liquides composés
- ✓ Base des référentiels diagnostiques, prédictifs et pronostiques
- ✓ Fixateur et conservateur polyvalent permettant de nombreuses techniques complémentaires *in situ* et *ex situ*

LE FORMOL

Cependant

- ✓ Le formaldéhyde n'est pas un fixateur idéal: il ne garantit pas une parfaite identité de la composition d'un échantillon par rapport à celle du même échantillon à l'état frais
- ✓ Toxicité : classé parmi les cancérigènes avérés chez l'homme par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) depuis 2004
 - Indications de cancérogénicité suffisantes pour le cancer du nasopharynx
 - Risque cependant très faible et le classement par le CIRC ne fait pas l'unanimité

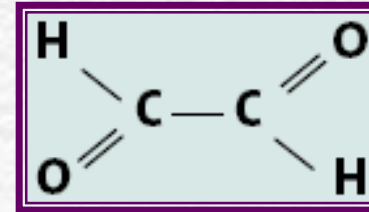
CONSEQUENCES REGLEMENTAIRES

- 1- Substitution du formaldéhyde , **SI** la mesure est techniquement possible
- 2- Mesures techniques de réduction du risque chimique, si l'utilisation du formaldéhyde est maintenue (mesures de protection collective)
- 3- Utilisation d'équipements de protection individuelle

LA SUBSTITUTION

- Est donc une question nécessaire. De nombreux substituts ont été et sont proposés, au premier rang desquels actuellement le glyoxal

LE GLYOXAL



- ✓ Dialdéhyde bicarboné, de petite taille, synthétisé dès 1856, (12 ans avant le formaldéhyde)
- ✓ Caractérisé par une faible tension de vapeur
- ✓ N'est utilisé en histochimie qu'à partir de 1970. Considéré à cette époque comme un **fixateur micro-anatomique plutôt mauvais**
- ✓ Le premier fixateur composé à base de glyoxal est commercialisé en 1993 (Prefer, Anatech). De nombreux autres mélanges composés sont actuellement proposés

Glyo-fixx™ (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA), Excell Plus (Microm), Histochoice (Amresco, Solon, Ohio), Preserve (Electron Microscopy Science), Glyofix (Shandon Lipshaw) ...

ETUDE DU GLYOXAL en tant que fixateur

Solutions étudiées

- ✓ **Solutions à base de glyoxal:**
 - Solutions de glyoxal à 4% ou 10%, additionnées de 5, 10, 20% d'éthanol (v/v) et à pH4 ou pH7
 - Glyo-fixxTM : substitut à base de glyoxal (-5% en masse), renfermant de l'éthanol (10 à 20%), du méthanol (<2%) et de l'isopropanol (<2%)
- ✓ **Formaldéhyde** (Formol tamponné à 10% (v/v), pH7,4; LABONORD)
- ✓ **Glutaraldéhyde** à 2,5% (m/v)
- ✓ **Éthanol 100°**

ETUDE DU GLYOXAL

Caractéristiques étudiées

- **Diffusion et cinétique de fixation**
- Respect de la micro-anatomie
- Histochimie
- Conservation antigénique
- Effets sur les acides nucléiques

Diffusion et Cinétique de Fixation

1- Cinétique de fixation dans un modèle de solution de gélatine à 5%

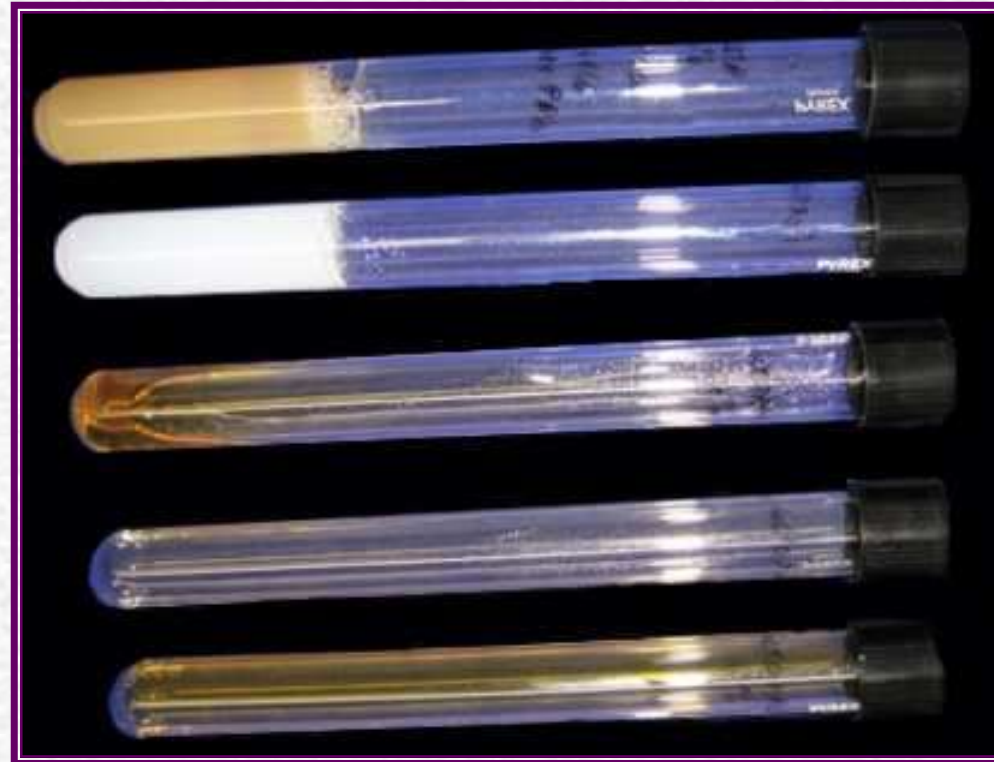
Glutaraldéhyde 2,5%

Formol 10%, pH 7,4

Glyoxal 4%, pH 7,4

Glyo-fixx™

Glyoxal 10%, pH 7,4



Éthanol 100%



A 24 heures

⇒ Le glutaraldéhyde et le formol donnent naissance à un gel respectivement en 5 minutes et 2h30.

⇒ Les trois fixateurs à base de glyoxal ne gélifient pas la solution, ni ne coagulent la gélatine.

⇒ L'éthanol exerce un effet coagulant immédiat.

Diffusion et Cinétique de Fixation

2- Correspondance entre les transformations tinctoriales macroscopiques et la diffusion du fixateur :

Coupes à congélation de tissu fixé recouvertes par une solution de nitrate d'argent. Ag^+ est précipité par les groupements aldéhydiques libres (technique du miroir d'argent)

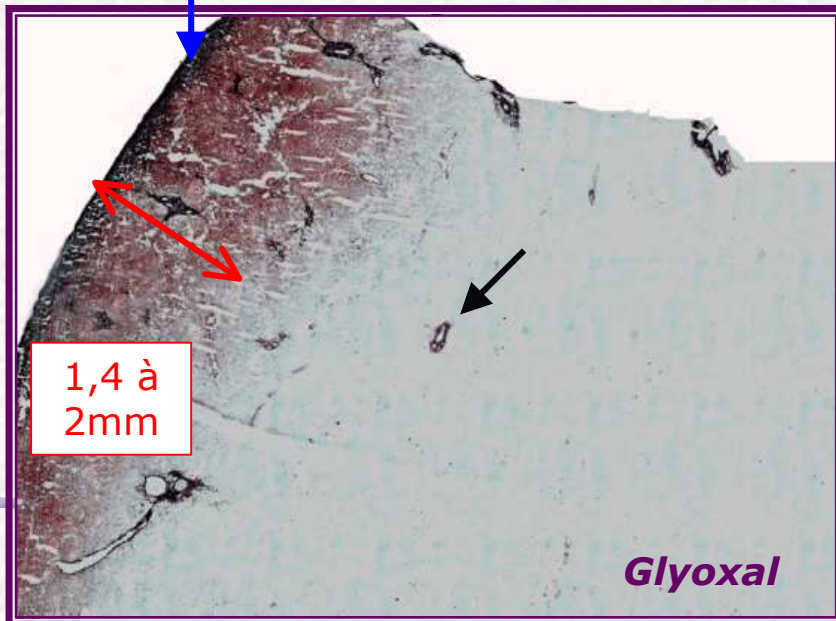
Avec les deux fixateurs: *migration le long des canaux (flèches)*

Avec le glyoxal

40 à 45 μm

✓ *Espace de diffusion plus restreint*

✓ *Pente du gradient de concentration très abrupte*



Diffusion et Cinétique de Fixation

3- Diffusion des fixateurs dans les pièces

Avec le glyoxal

- ✓ la consistance n'est pas augmentée
- ✓ la diffusion dans les tissus est lente

Glyo-fixx™

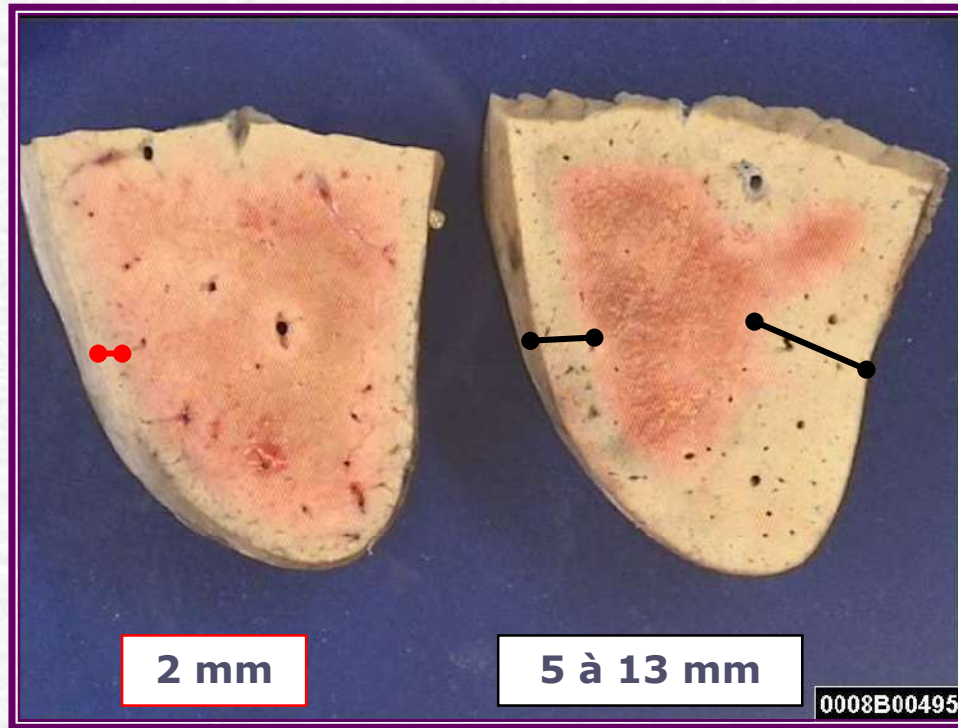
2 mm

5 à 13 mm

Formol

0008B00495

A 24 heures



ETUDE DU GLYOXAL

- Diffusion et cinétique de fixation
- **Respect de la micro-anatomie**
- Histochimie
- Conservation antigénique
- Effets sur les acides nucléiques

Respect de la micro-anatomie

- **Étude morphologique (coloration HES)**
- **Études ultrastructurales**

Méthodologie

✓ *Choix de la solution de glyoxal :*

- Le glyoxal seul donne de mauvais résultats
- L'ajout d'éthanol et le pH acide améliore les résultats
- Tests sur plusieurs organes de différentes solutions :
 - glyoxal à 4% (v/v) pH 4
 - glyoxal à 10% (v/v) pH 4
 - glyoxal à 4% (v/v) pH 4 additionné de 5% (v/v), 10% (v/v) ou 20% (v/v) d'éthanol absolu
 - glyoxal à 4% (v/v) pH 7 additionné de 10% (v/v) d'éthanol absolu

⇒ Résultats les meilleurs obtenus avec la solution de **glyoxal 4% additionnée d'éthanol 10% à pH4**

Méthodologie

✓ *Fixateurs testés:*

- Glyoxal 4%-Ethanol 10% pH4
- Glyo-fixx™
- Formol tamponné 10%

✓ *Prélèvements d'échantillons sur 19 pièces opératoires fraîches, représentant 16 organes.*

- Fixation à température ambiante pendant 72h dans un minimum de 20x leur volume de substitut
- Inclusion manuelle

✓ *Étude comparative de la qualité micro-anatomique par 5 lecteurs*

Étude morphologique

✓ 9 Paramètres étudiés

- Score global
- Morphologie générale
- Coloration
- Contours cellulaires
- Détails cytoplasmiques
- Détails nucléaires
- Aspect des lymphocytes

SCORE

- 1 : mauvais
- 2 : moyen
- 3 : bon
- 4 : très bon et excellent

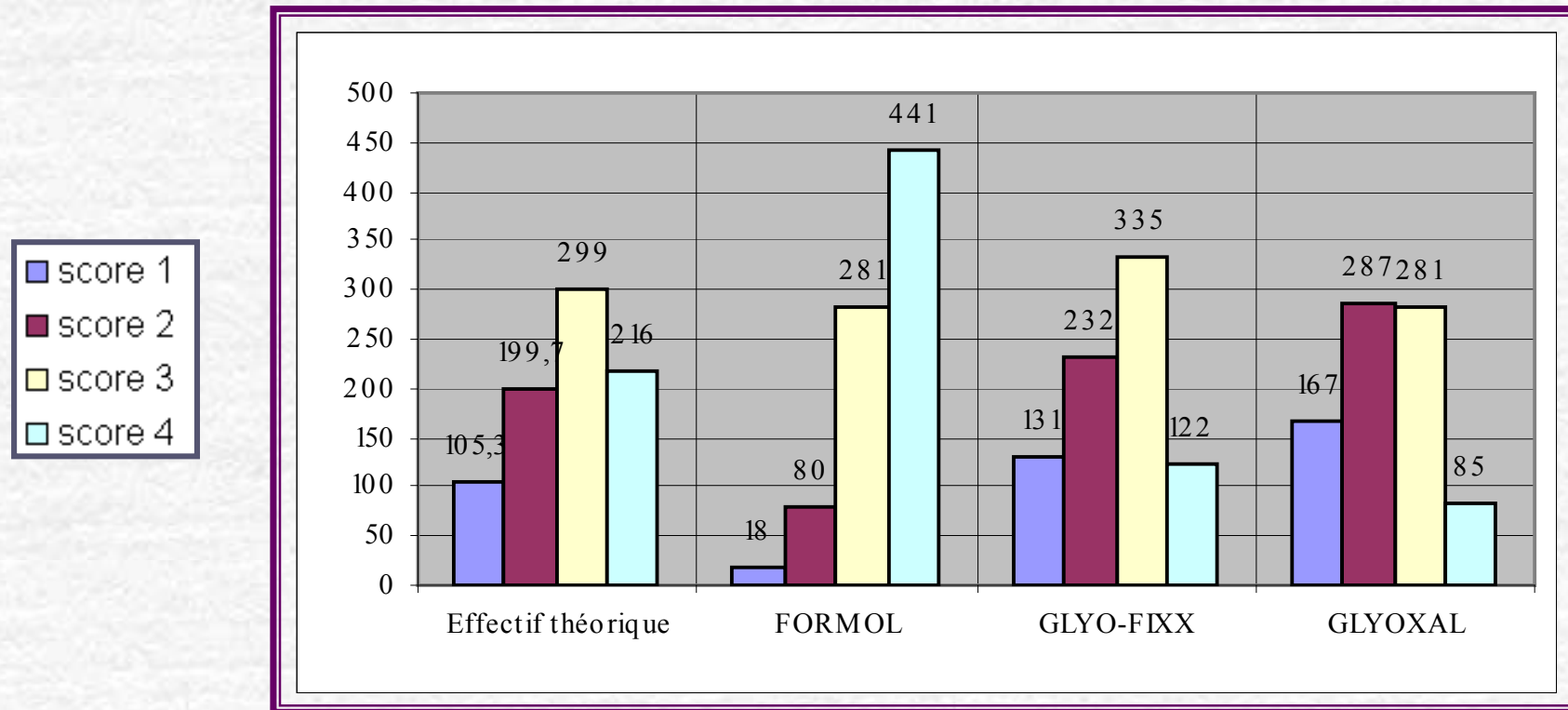
SCORE

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

- Hématies
- Polynucléaires éosinophiles (PNE)

Étude morphologique

Comparaison des FIXATEURS tous organes, tous paramètres et tous lecteurs confondus

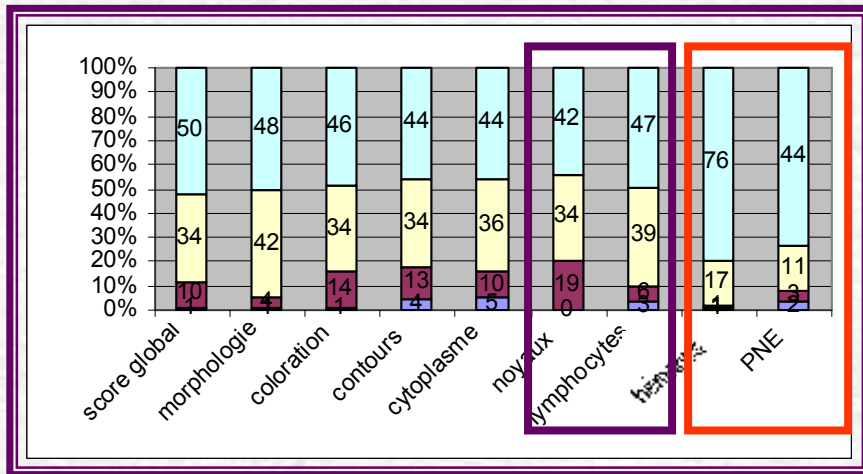


Khi-deux de Pearson = 591,2 ; signification :0,000

⇒ Supériorité du formol

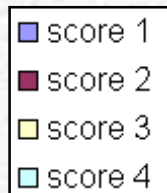
Étude morphologique

Comparaison des trois fixateurs par PARAMÈTRES



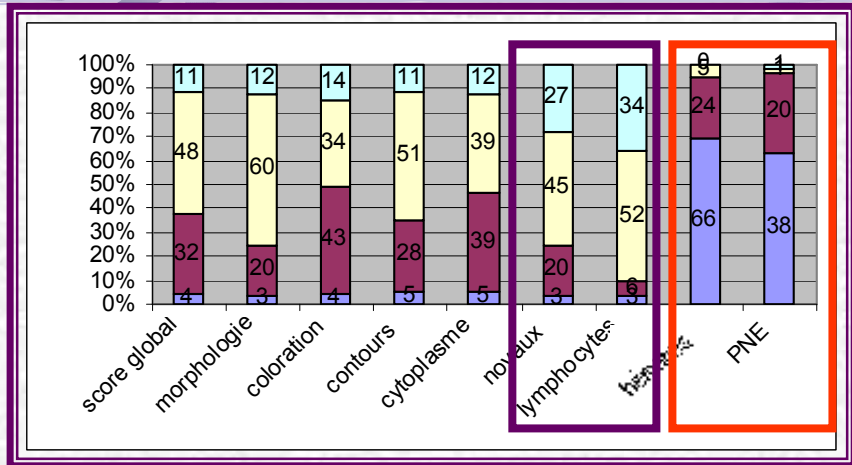
Khi-deux de Pearson = 75,65 ; signification :0,000

Formol



Hématies et PNE

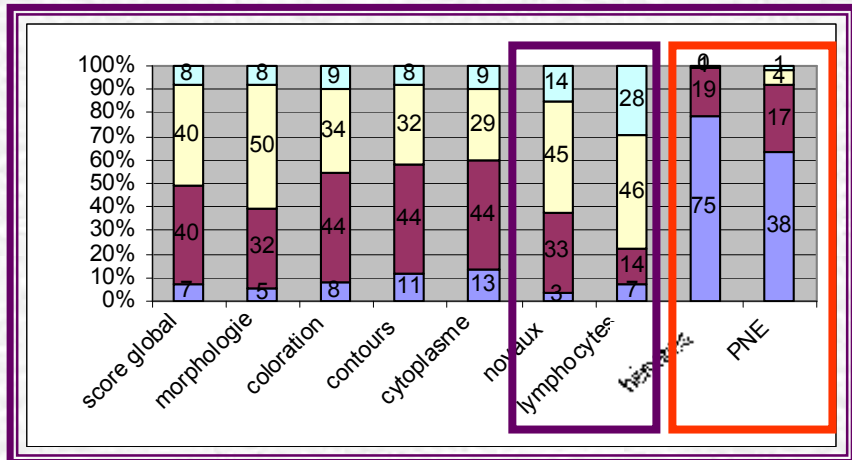
Noyaux et Lymphocytes



Khi-deux de Pearson = 489,1 ;

signification :0,000

Glyo-fixx™



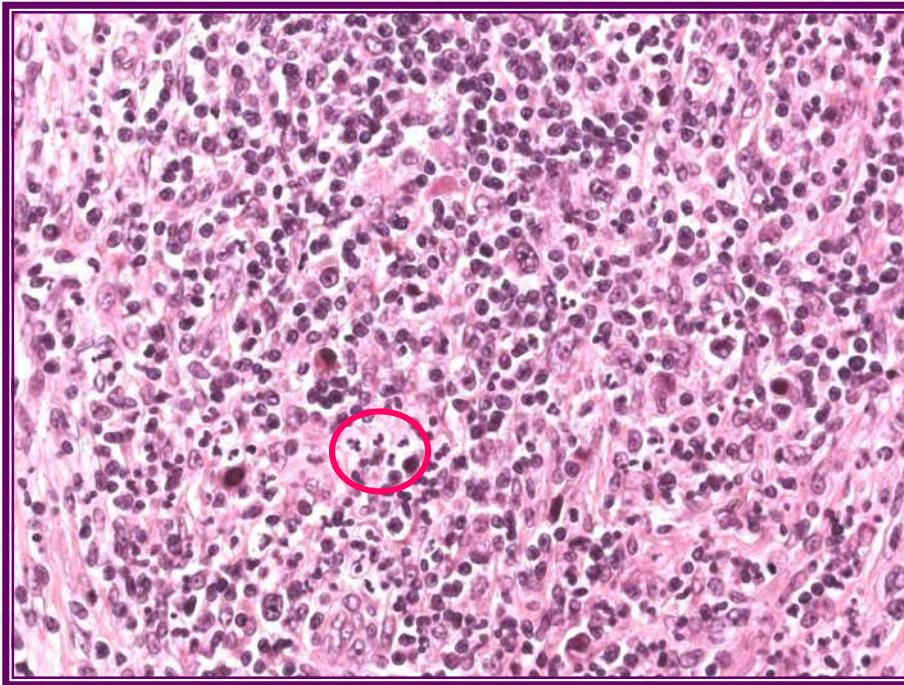
Khi-deux de Pearson = 413,3 ;

signification :0,000

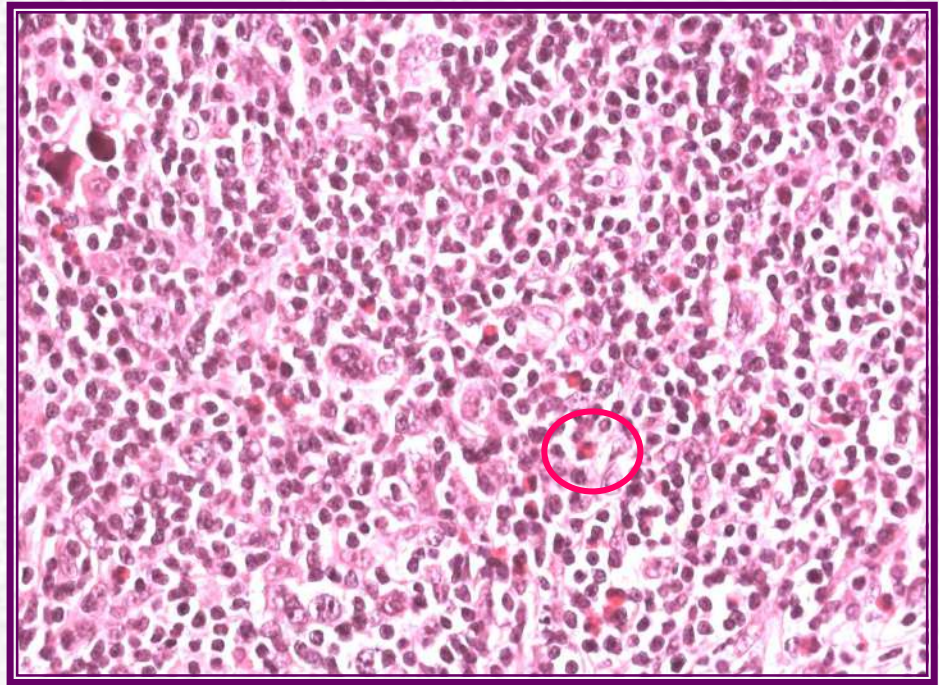
Glyoxal

Étude morphologique

GANGLION
(HES x40)



GLYO-FIXX™



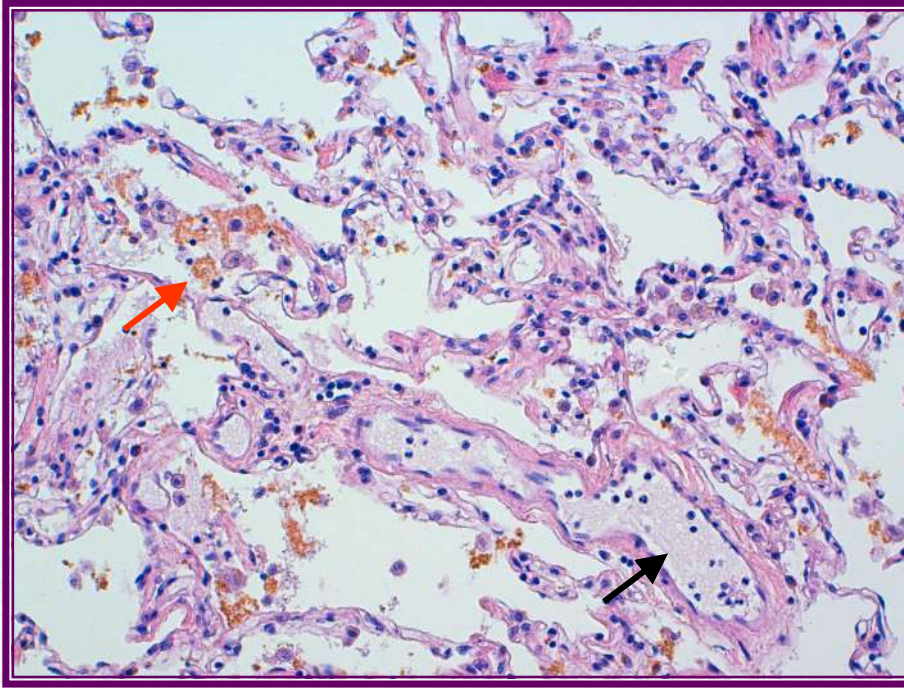
FORMOL

⇒ *Morphologie nucléaire conservée avec le formol et le glyoxal*

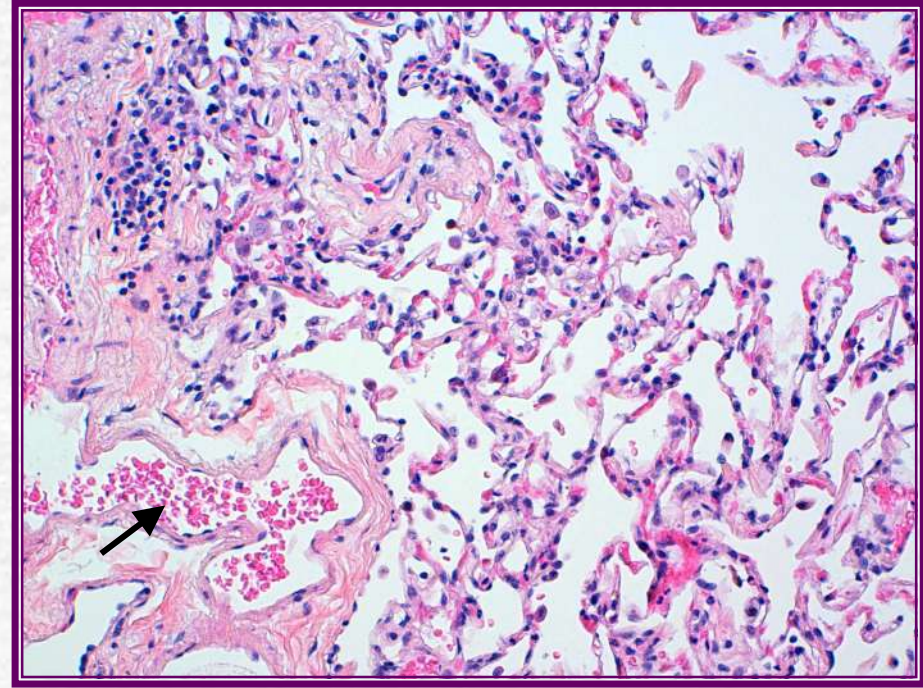
⇒ *Maladie de Hodgkin: les granulations des polynucléaires éosinophiles ne sont pas visibles après fixation au glyoxal (cercle)*

Étude morphologique

POUMON
(HES x 20)



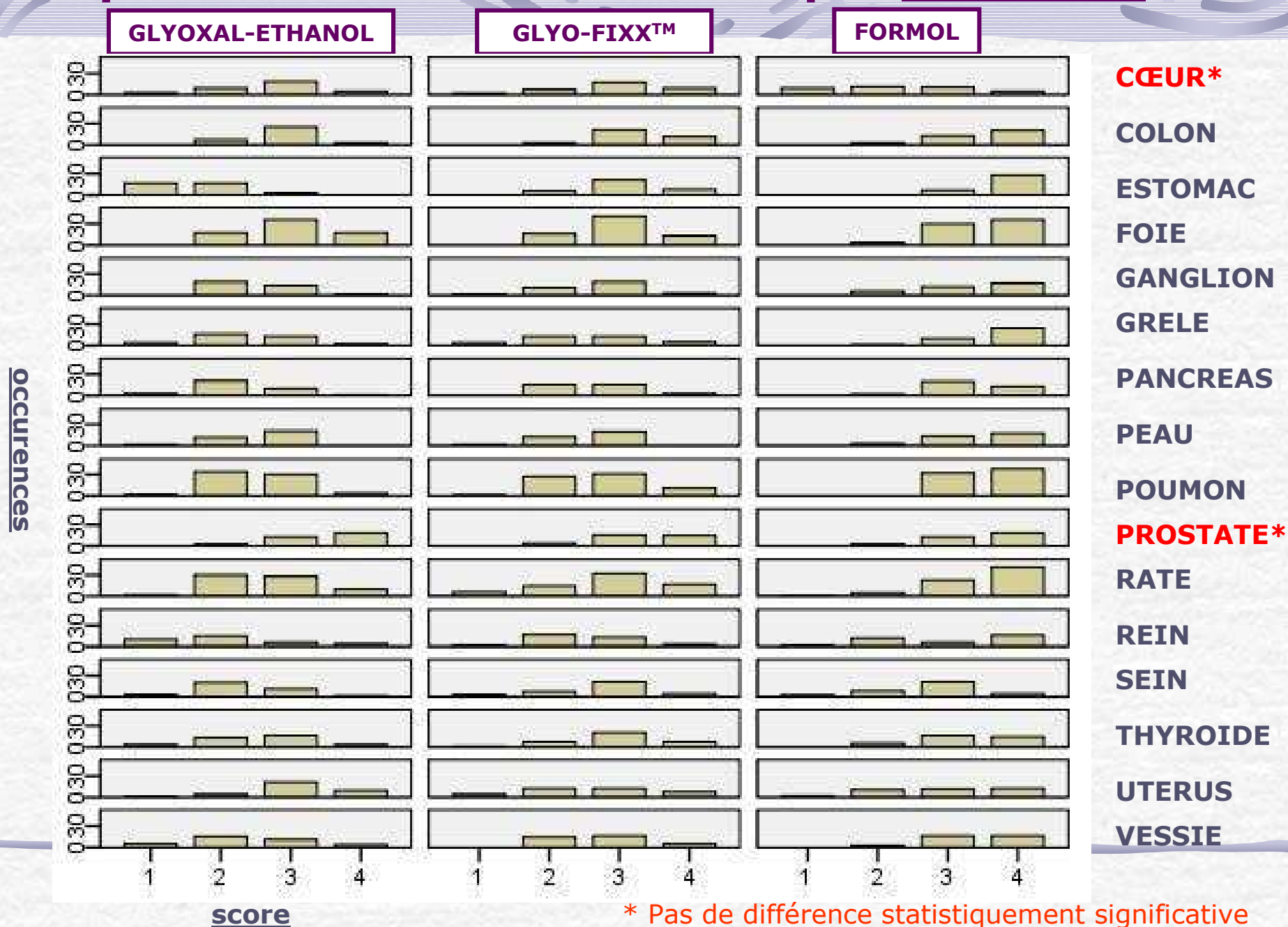
GLYO-FIXX™



FORMOL

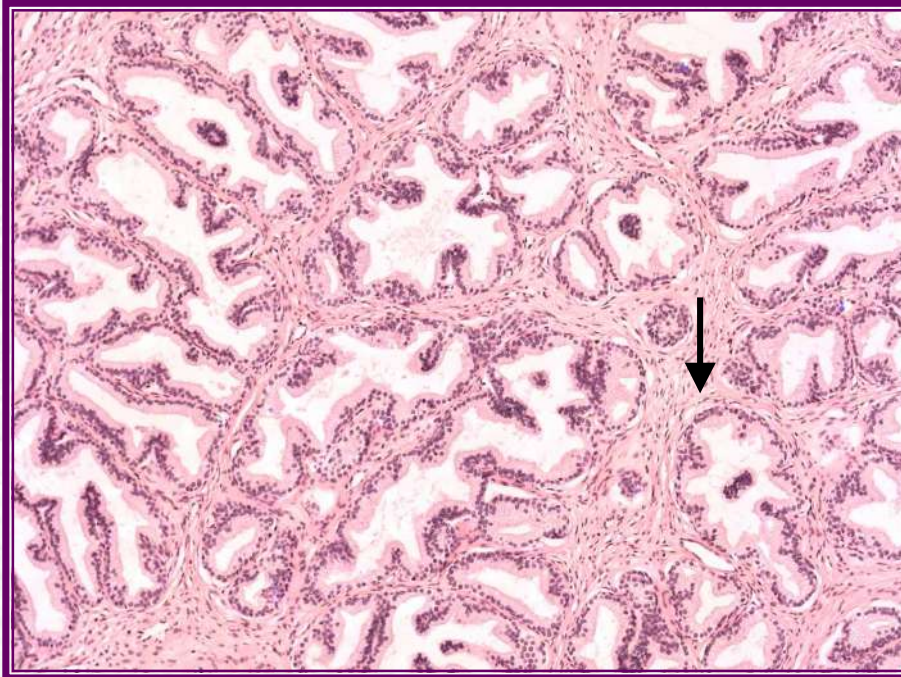
- ⇒ Les hématies sont d'aspect fantomatique, non colorées après fixation au glyoxal. Elles sont bien conservées avec le formol (flèches noires)
- ⇒ Présence de pigments brunâtres sur les coupes de tissus fixés au glyoxal (flèche rouge)

Comparaison des trois fixateurs par ORGANES

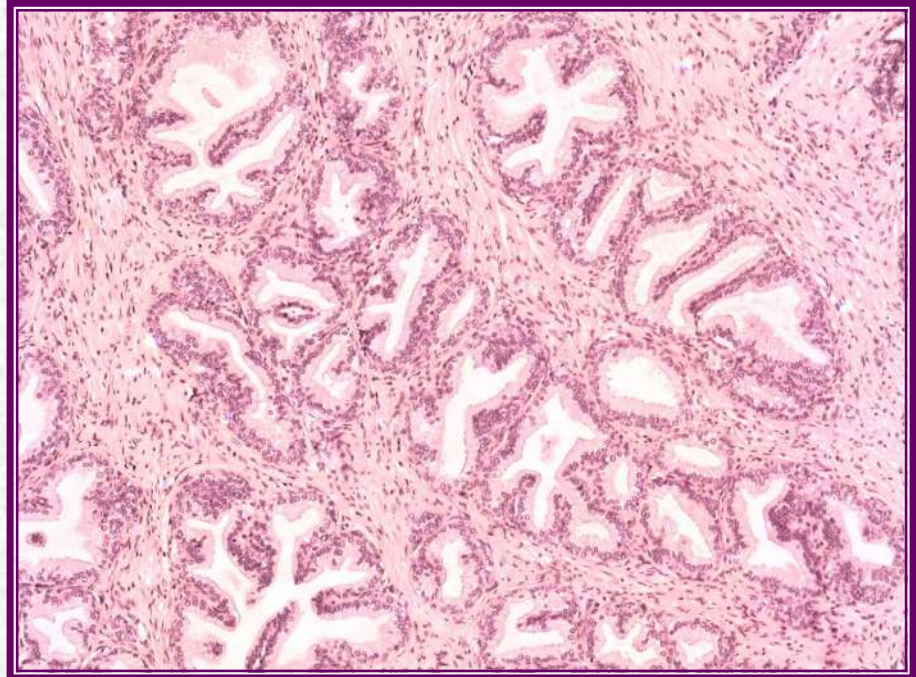


Étude morphologique

PROSTATE
(HES x20)



GLYO-FIXX™

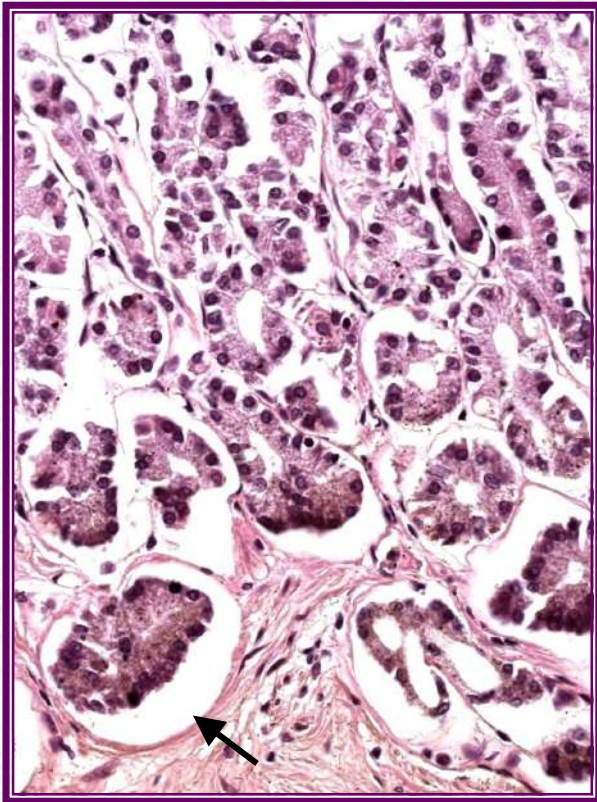


FORMOL

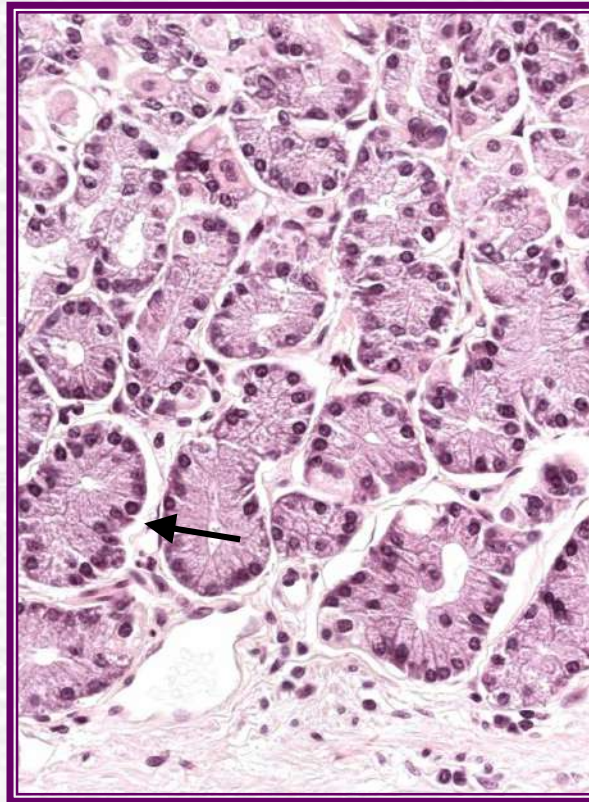
⇒ **Morphologie équivalente entre le formol et le glyoxal, hormis la présence de fentes de rétraction sur les tissus fixés au glyoxal (flèche)**

Étude morphologique

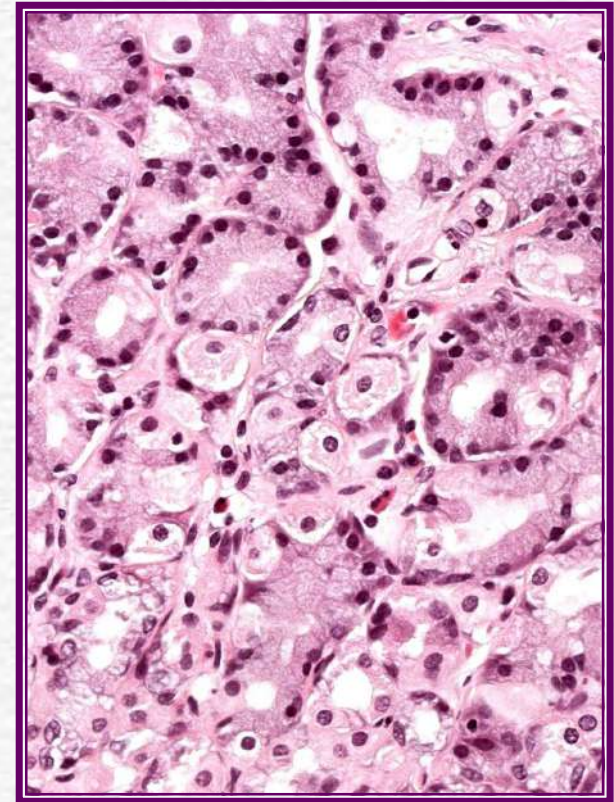
ESTOMAC
(HES x40)



GLYOXAL-ETHANOL



GLYO-FIXX™



FORMOL

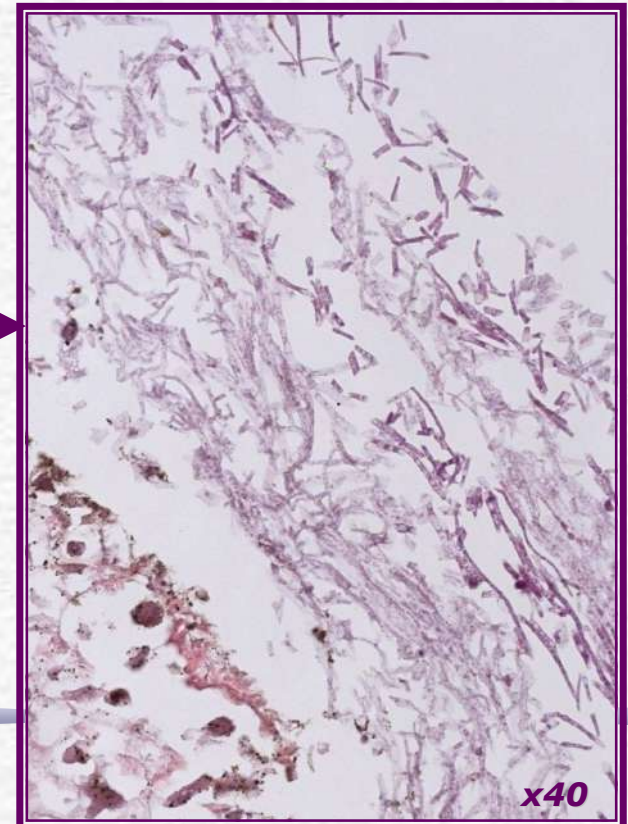
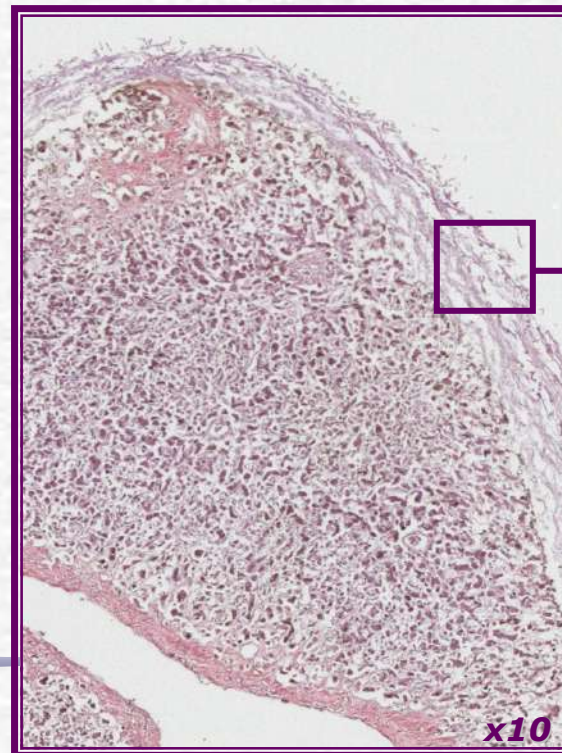
⇒ **Morphologie très altérée avec la solution glyoxal-éthanol (rétractions majeures, contours cellulaires peu nets, hématies et PNE non visibles)**

⇒ **Morphologie nucléaire avec le Glyo-fixx™ correcte mais présence de rétractions, de contours cellulaires moins nets qu'avec le formol et hématies et PNE non visibles**

Étude morphologique

Fixation à long terme

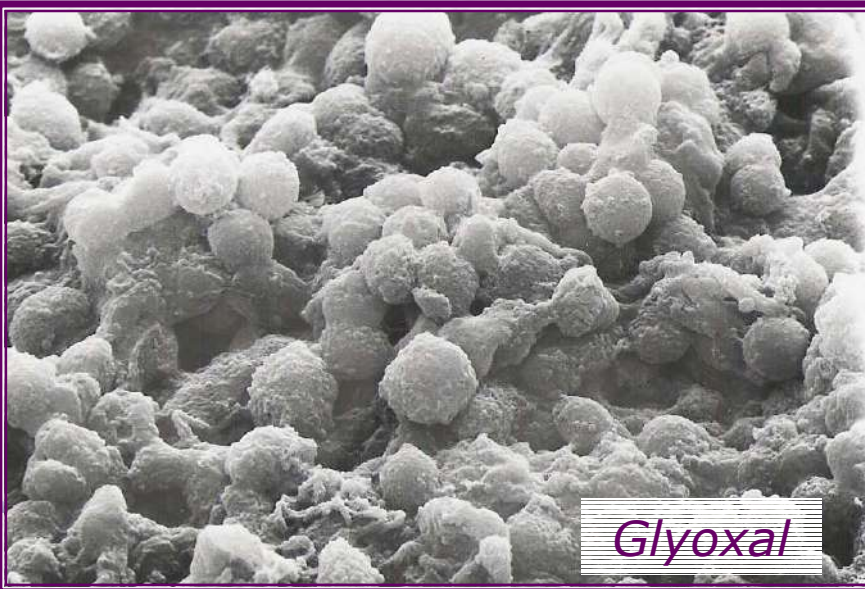
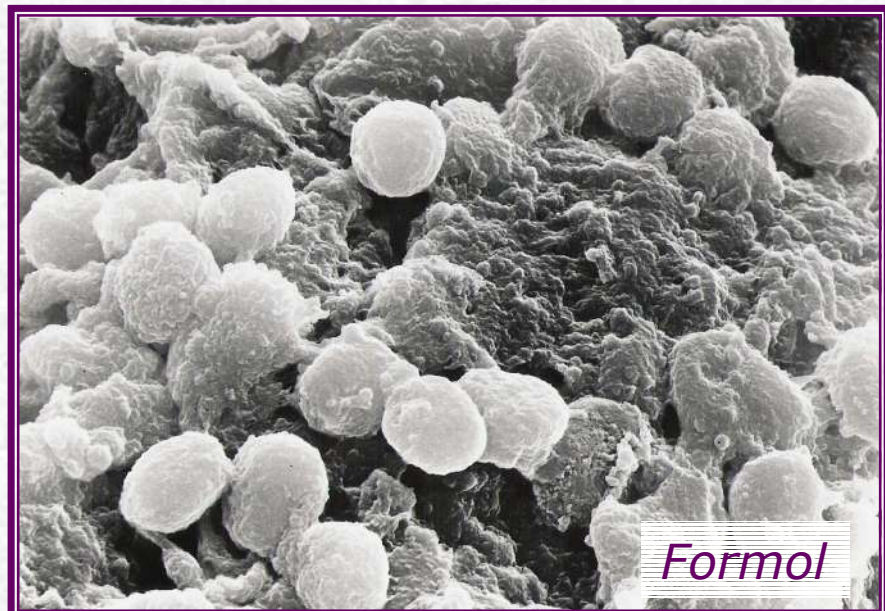
- ✓ Cinq prélèvements ont été conservés dans les fixateurs pendant 4 semaines
- ✓ **Avec le glyoxal:**
 - altération de la morphologie comparativement à l'HES initial
 - Sur un échantillon de parenchyme hépatique, à 4 semaines: aspect lysé du parenchyme et **présence de colonies de champignons en périphérie**



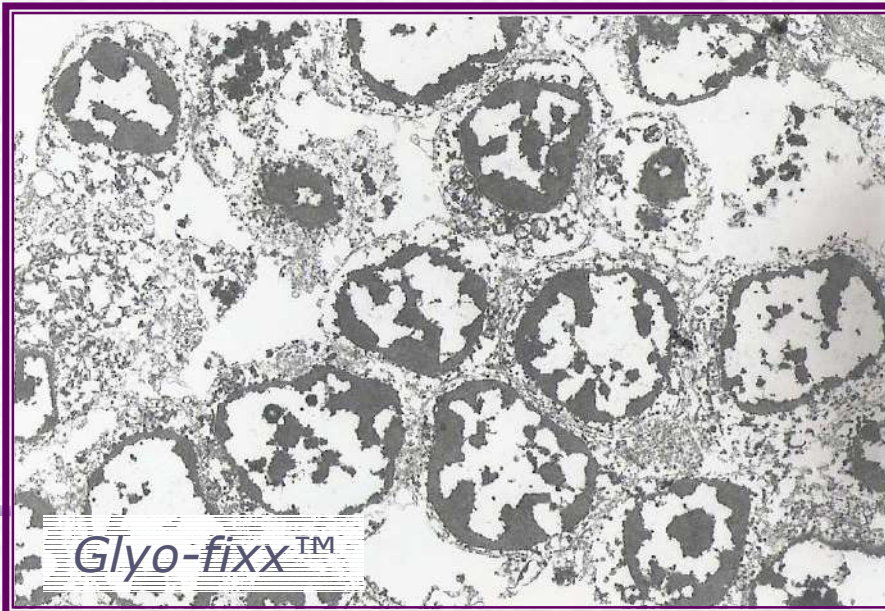
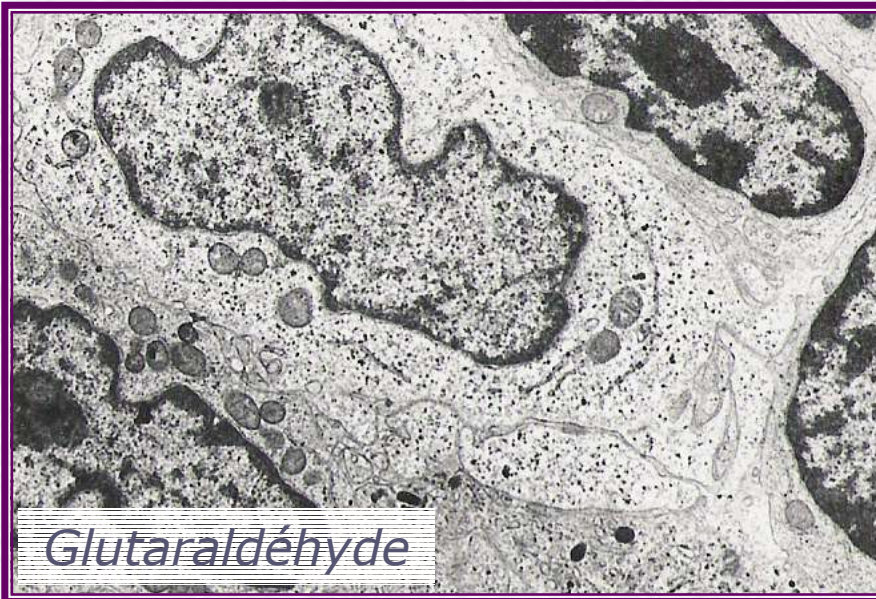
Respect de la micro-anatomie

- Étude morphologique
- **Études ultrastructurales**

Microscopie électronique à balayage



Microscopie électronique à transmission



ETUDE DU GLYOXAL

- Diffusion et cinétique de fixation
- Respect de la micro-anatomie
- **Histochimie**
- Conservation antigénique
- Effets sur les acides nucléiques

Histochimie

- ✓ 11 colorations histochimiques réalisées sur les organes où elles présentent un intérêt
- ✓ Quelque soit la technique, la **micro-anatomie est moins bien conservée** avec le glyoxal
- ✓ Certaines colorations donnent des résultats satisfaisants sur la mise en évidence du constituant recherché, notamment :
 - **métachromasie conservée** (Bleu de Toluidine, Giemsa)
 - **coloration des fibres de la matrice extra-cellulaire** (Gordon, Rouge Sirius, Weigert)
- ✓ Avec le bleu de Toluidine et le bleu Alcian, les colorations sont beaucoup *plus pâles* à conditions techniques identiques et l'augmentation du temps de coloration n'améliore que faiblement le résultat
- ✓ La **mise en évidence du constituant recherché n'est pas obtenue** avec les colorations de Giemsa (PNE), de Fontana (cellules endocrines digestives) et de Perls (hémosidérine)



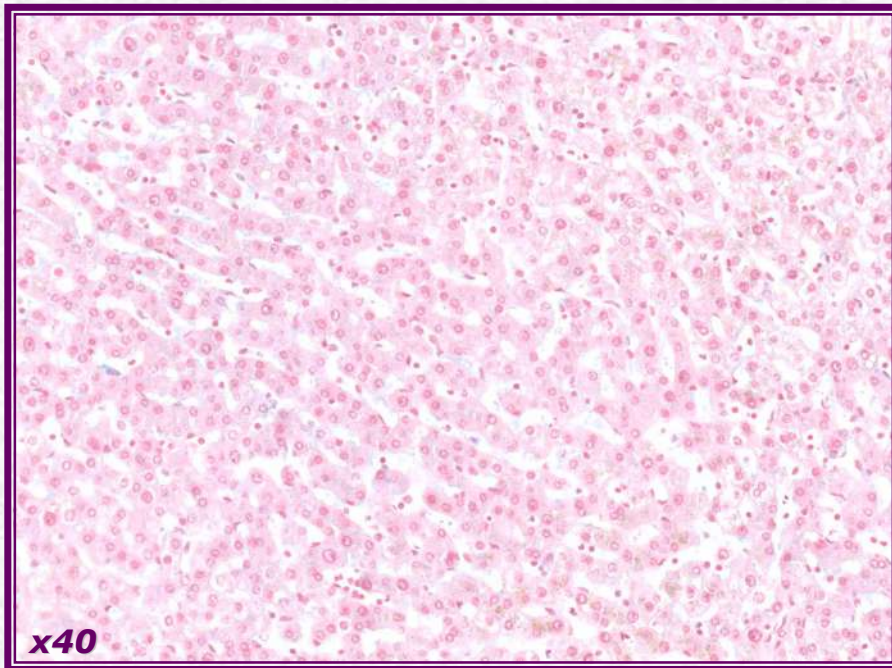
GLYOXAL-ETHANOL



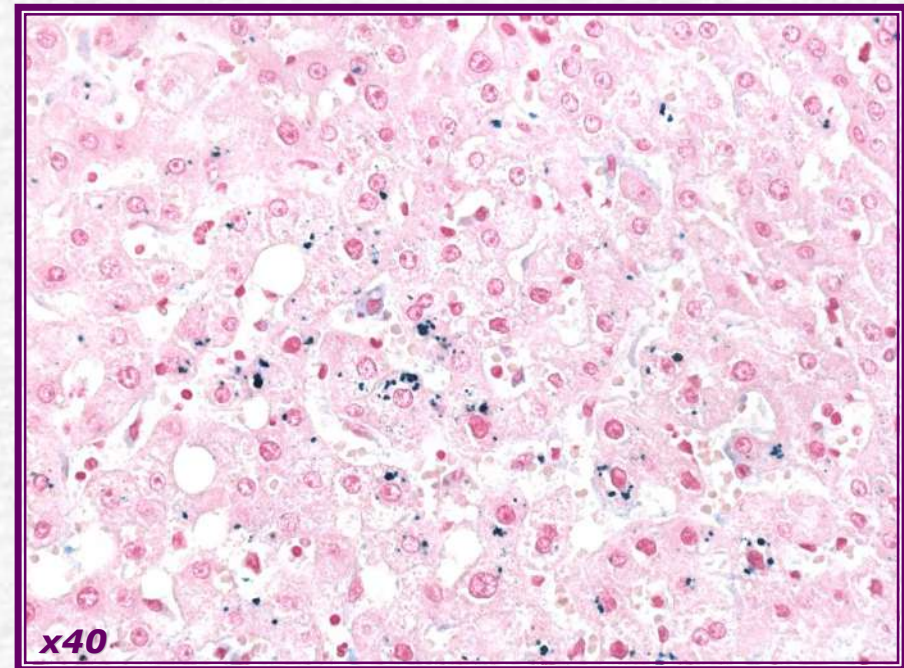
FORMOL

⇒ Avec le glyoxal : coloration artéfactuelle de la réticuline (flèche noire), rétractions, cellules endocrines non mises en évidence

⇒ Avec le formol : mise en évidence de cellules endocrines (flèche rouge)



GLYOXAL-ETHANOL



FORMOL

⇒ *Le fer de l'hémosidérine n'est pas mis en évidence après fixation au glyoxal*

ETUDE DU GLYOXAL

- Diffusion et cinétique de fixation
- Respect de la micro-anatomie
- Histochimie
- **Conservation antigénique**
- Effets sur les acides nucléiques

Immunohistochimie

- ✓ Choix des antigènes: 18 antigènes testés choisis parmi les plus utilisés et en fonction de leur localisation:
 - Nucléaire: TTF1, bcl2, bcl6, RH, Ki67...
 - Cytosolique: CD3, KL1, Hépatocyte...
 - Membranaire: CD20
 - Matrice extra-cellulaire: collagène IV

- ✓ Pour chacun, différents pré-traitements sont testés:
 - Pas de restauration antigénique
 - EDTA 10mM pH8
 - Tris HCl 0,01M pH8,5 (recommandé par Dapson pour les tissus fixés au glyoxal)

Immunohistochimie

✓ Interprétation des résultats:

■ **Pourcentage de cellules marquées :**

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

■ **Intensité du marquage :**

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

■ **Bruit de fond :** absent, léger, modéré, intense

Immunohistochimie

✓ Résultats: ***avec le glyoxal***

1 *Mauvaise préservation de la qualité micro-anatomique*

Immunohistochimie

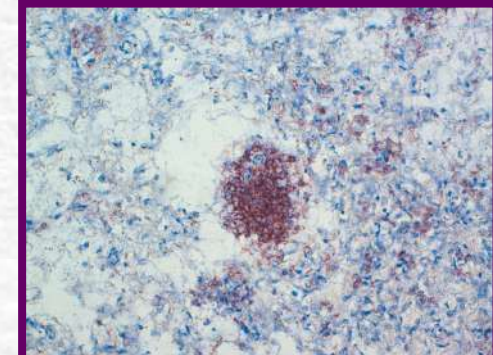
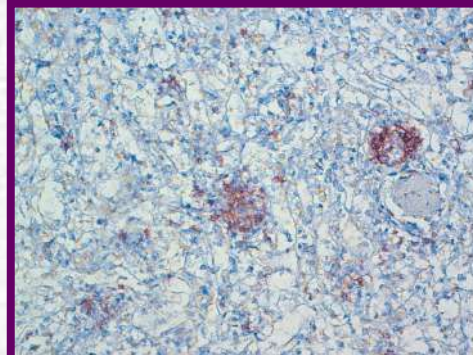
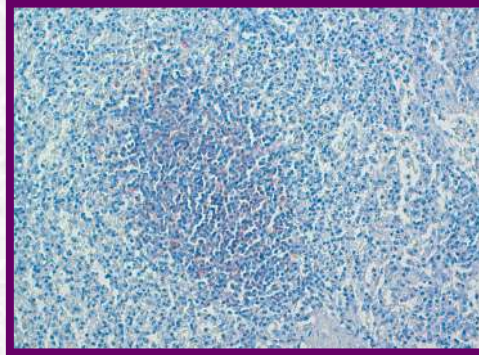
CD20

FORMOL

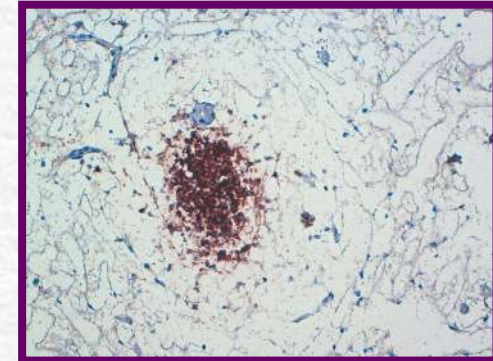
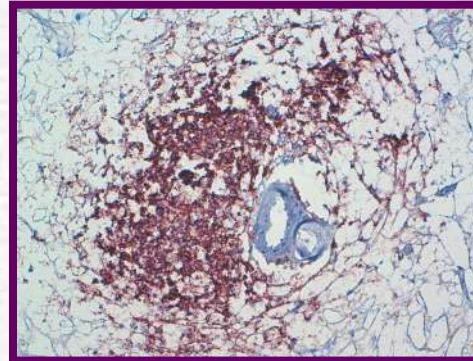
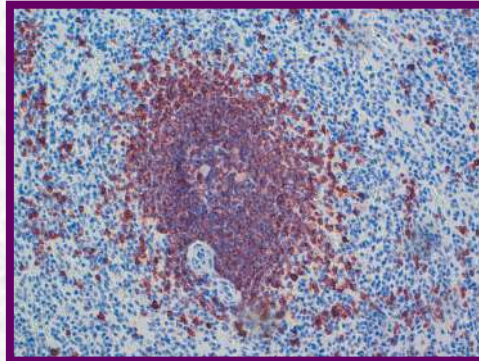
GLYO-FIXX™

GLYOXAL-ETHANOL

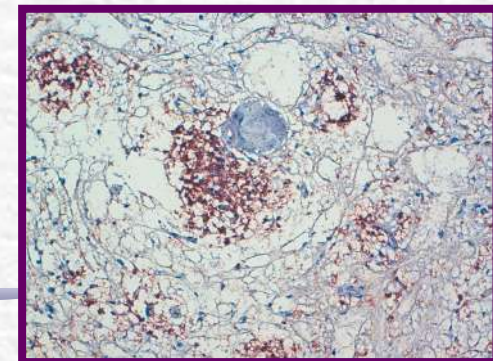
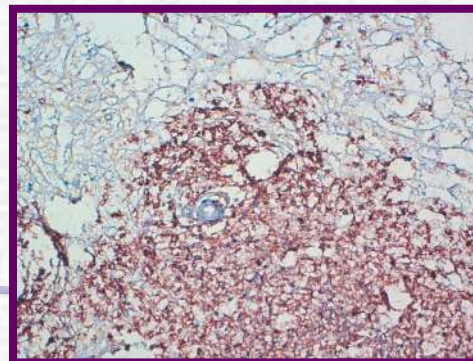
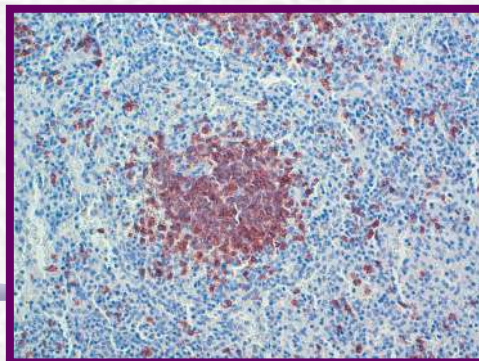
*Sans pré-
traitement*



*EDTA
pH8*



*Tris HCl
pH8,5*



RATE x20

Immunohistochimie

✓ Résultats:

- 1 *Mauvaise préservation de la qualité micro-anatomique*
- 2 *Sensibilité moindre de la technique immunohistochimique à conditions identiques*

Exemple : Indice de prolifération mesuré après mise en évidence de l'antigène Ki67

- ❖ Formol ⇒ 37%
- ❖ Glyo-fixx™ et glyoxal-éthanol ⇒ 18% et 16%

Immunohistochimie

✓ Résultats:

1 *Mauvaise préservation de la qualité micro-anatomique*

2 *Sensibilité moindre de la technique immunohistochimique à conditions identiques*

3 *Capacités d'adaptation limitées*

Exemple : Impossibilité de mise en évidence du TTF1

❖ *quelques soient les pré-traitements et*

❖ *les gammes de dilutions de l'anticorps (1/1600 à 1/50^{ème})*

ETUDE DU GLYOXAL

- **Diffusion et cinétique de fixation**
- **Respect de la micro-anatomie**
- **Histochimie**
- **Conservation antigénique**
- **Effets sur les acides nucléiques**

Hybridation in situ

- ✓ Détection de l'ADN nucléaire à l'aide de sonde constituée par un ADN génomique humain total marqué à la digoxigénine
- ✓ Réalisation sur les échantillons de rein, poumon, ganglion, cœur

Avec le glyoxal:

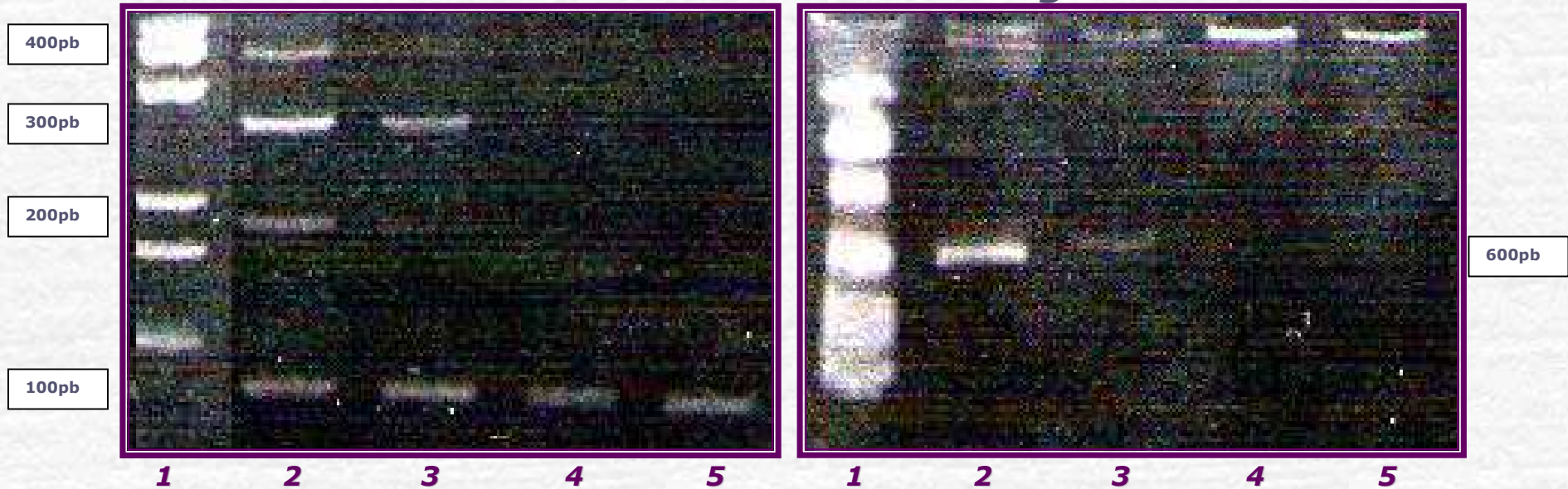
⇒ Signal toujours ***moins intense*** et de ***moins bonne qualité*** à conditions techniques identiques

Étude de l'ADN

- ✓ Résultats similaires quelque soit l'organe
- ✓ Échantillons non fixés: ADN de bonne qualité
- ✓ Échantillons fixés au formol: bandes à 100, 200, 300 et 600pb
- ✓ Échantillons fixés au glyoxal: **une seule bande à 100pb**

Protocole de vérification
BIOMED-2

⇒ **ADN dégradé**



GANGLION

PCR 1

PCR 2

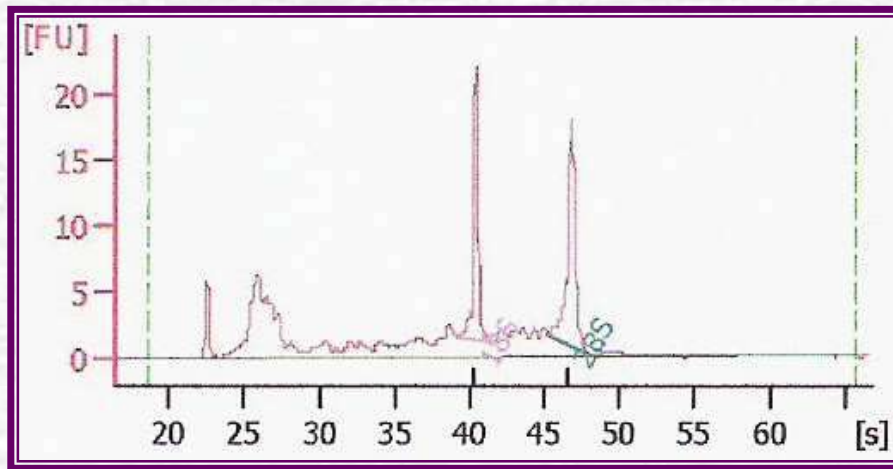
1 marqueur de taille ; 2 congélation, 3 formol, 4 Glyo-fixx™, 5 Glyoxal 4% Ethanol 10%

Étude de l'ARN

Utilisation des puces AGILENT RNA 6000

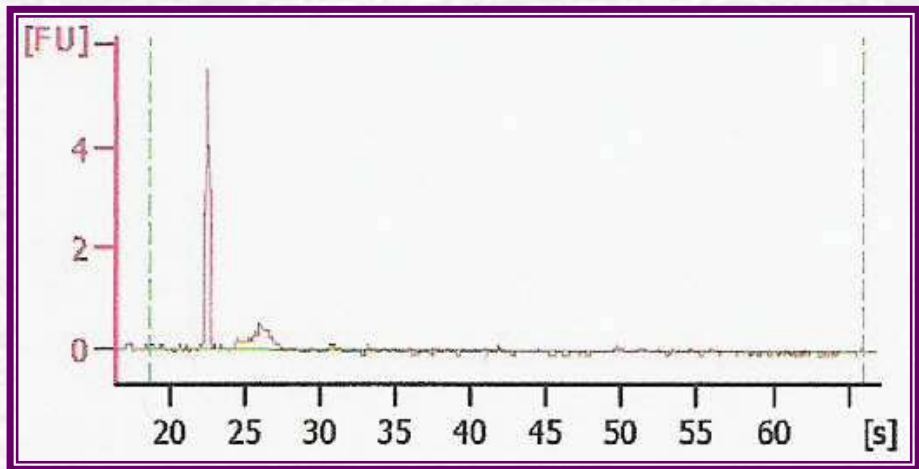
- ✓ Résultats similaires quelque soit l'organe
- ✓ Échantillons non fixés: Bonne qualité des ARNm extraits (R.I.N 7-8)
- ✓ Échantillons fixés (Formol, Glyo-fixxTM et Glyoxal-éthanol) :

⇒ **ARNm très altérés (R.I.N nul)**



Tissus non fixés

POUMON



Tissus fixés

DISCUSSION

Pré-requis indispensables à la substitution

=

qualités attendues du substitut

DISCUSSION

- 1) Risque sanitaire encouru moindre
- 2) Propriétés biocides du substitut connues
- 3) Composition du fixateur connue et stabilité
- 4) Ne pas entraîner un surcoût auquel les laboratoires ne pourraient s'adapter
- 5) Diffusion rapide dans les tissus
- 6) Qualité morphologique au moins équivalente à celle obtenue avec le formol
- 7) Permettre la réalisation de techniques complémentaires *in situ* et *ex situ*, équivalente à celle autorisée par la fixation formolique
- 8) Stabilité des bio-molécules dans les tissus fixés et inclus en paraffine, autorisant la création de banques tissulaires

DISCUSSION

Le glyoxal ne peut donc pas être un substitut du formaldéhyde en tant que fixateur polyvalent

✓ *Malgré un risque chimique très faible, il n'est pas dénué de toute nocivité*

- *Toxicité expérimentale:*

activité tumoro-promotrice dans un modèle de cancérogenèse gastrique chez le rat

- *Toxicité humaine:* peu de publications

surtout sensibilisant et allergisant ⇒ *en voie de substitution* dans certaines industries (fabrication de savons, détergents et produits d'entretien)

DISCUSSION

✓ En raison d'une valeur limite d'exposition professionnelle (VLEP) basse, malgré une tension de vapeur faible, nécessité de développer des mesures de protection similaires à celles à mettre en place pour le formol

PRODUIT	GLYOXAL	FORMOL
VLEP	0,1 mg/m ³	0,37 mg/m ³
TENSION DE VAPEUR	2,4 kPa à 20°C	517 kPa à 20°C

DISCUSSION

- ✓ *La composition des substituts à base de glyoxal commercialisés est tenue secrète, exposant la profession à des modifications cryptiques de formules ou des ruptures de marché*
- ✓ *La substitution par le glyoxal entraînerait un surcoût en raison du prix élevé des substituts commercialisés et des coûts difficilement estimables de la nécessaire adaptation des techniques*
- ✓ *En raison de la lenteur de la cinétique de diffusion et du processus de réaction, le glyoxal est un mauvais conservateur de pièces anatomiques et un piètre biocide. Il pourrait tout au plus être utilisé comme fixateur de biopsies de petit volume*

DISCUSSION

- ✓ *La morphologie est inégalement conservée*
- ✓ *Des repères essentiels au diagnostic sont perdus: mauvaise détectabilité des hématies et des granulations éosinophiles, perte du fer, dissolution des micro-calcifications*
- ✓ *En immunohistochimie, certains antigènes, notamment nucléaires, sont mal ou non détectés*
- ✓ *Les acides nucléiques sont mal conservés: les techniques complémentaires in situ et ex situ sont impossibles*

CONCLUSION

Les conséquences pour les patients d'un changement de référentiel au profit du glyoxal seraient sans commune mesure avec les risques associés à l'utilisation du formol, qui sont faibles

En parallèle à la mise en place de mesures de protection vis à vis du formaldéhyde, la recherche d'une substitution doit se poursuivre et devrait s'appuyer sur une collaboration étroite entre les pathologistes et les chimistes à la recherche de procédés de fixation innovants