

# Substituts du formol

Etude préliminaire comparative des performances des substituts pour différents examens réalisés en ACP : HE, colorations spéciales, IHC, SISH, ADN et ARN.

Mars – Août 2007

Cofinancement AFAQAP – CHU Strasbourg

# Sommaire

- **But de l'étude – Méthodologie** **D3-7**
- **1ère partie : Sélection des substituts** **D8-10**
- **2ème partie : Comparaison formol-substituts** **D11-66**
  - Méthodologie D11-13
  - Résultats HE D14-16
  - Résultats Colorations spéciales D17-21
  - Colorations HE et spéc. : conclusion D22
  - Résultats IHC D23
    - Anticorps « faciles » D24-27
    - Anticorps « difficiles » D28-57
    - IHC : conclusion D58
  - Résultats SISH D59
  - Résultats moléculaires – ADN D60-62
  - Résultats moléculaires – ARN D63-64
  - Résultats moléculaires : conclusion D65
- **Observations & Réflexions** **D66-69**
- **Conclusion** **D70-71**

# But de l'étude

- Estimer la quantité de travail nécessaire pour passer à un substitut X, à partir des connaissances de base acquises dans un laboratoire travaillant avec du formol
- Déterminer les obstacles majeurs à surmonter lors du passage à un substitut et les solutions possibles
- Comparer les performances des substituts en morphologie
- Estimer les capacités de préservation de chaque substitut pour les analyses de biologie moléculaire

# Méthodologie

- Echantillons prélevés sur pièces opératoires fraîches et disposés en cassettes
- Fixation: 24h pour chaque substitut, à température ambiante (les cassettes ont été immergées dans un minimum de 20 fois leur volume de substitut)
- Inclusion : VIP Sakura, protocole classique utilisé au CHU de Strasbourg. Les deux premiers bains (formol) ont été remplacés par deux bains d'alcool 30%
- Coupes: 4 $\mu$ m
- Montage sur lames Superfrost Plus; séchage de 30 minutes à 56°C

# Méthodologie

## Protocole de déshydratation utilisé sur le VIP (Sakura)

Réactif	Concentration	Temps	Température
alcool	30%	0h30	45°C
alcool	30%	0h30	45°C
alcool	75%	0h30	45°C
alcool	90%	0h45	45°C
alcool	95%	1h00	45°C
alcool	absolu	1h15	45°C
alcool	absolu	0h30	45°C
xylène		0h45	45°C
xylène		1h45	45°C
xylène		0h30	45°C
paraffine		0h30	58°C
paraffine		0h45	58°C
paraffine		0h45	58°C
paraffine		1h45	58°C

# Méthodologie

- 1<sup>ère</sup> partie : Sélection des substituts les plus performants en HE
- 2<sup>ème</sup> partie : Evaluation des substituts par comparaison au formol :
  - Colorations standard (HE, colorations spéciales),
  - IHC (immunohistochimie),
  - Etude moléculaire.

# Méthodologie

- Résultats comparés :
  - Morphologie HE, selon protocole de coloration utilisé au laboratoire (protocole “formol”)
  - Morphologie et résultats en colorations spéciales, selon protocole utilisé classiquement au laboratoire (protocole “formol”)
  - Résultats IHC selon protocole “formol” et protocoles modifiés
  - Extraction d’ADN et d’ARN à partir des coupes paraffinées (kits “FFPE”, QIAGEN):
    - Analyse de la quantité extractible et de l’adéquation de l’ADN pour la détection de SNPs sur une puce commerciale (système modèle, Bioarrays Solutions)
    - Analyse de la quantité extractible et profil Agilent pour l’ARN

# 1<sup>ère</sup> partie : Sélection des substituts

- Comparaison de 8 substituts en HE par rapport au formol (témoin) :
  - Excell Plus (Microm)
  - RCL2 (Alphelys)
  - Hydrosafe (Labonord)
  - Glyo-Fixx (Thermo Shandon)
  - Xpress Transport (“Pre-treatment solution”, Sakura)
  - Xpress Fix (“Molecular Fixative”, Sakura)
  - Finefix (Tech Inter)
  - Myrsky’s fixative (Merck)
- Un à deux échantillons par organe (foie, rein, sein, utérus, colon, intestin grêle, ganglion lymphatique, rate, moelle osseuse)



# 1<sup>ère</sup> partie : Sélection des substituts

- 1<sup>ère</sup> conclusion: un à deux échantillons prélevés par organe sont insuffisants pour une étude comparative optimale car :
  - Morphologies disparates, selon la zone de prélèvement dans l'organe
  - Ne nivelle pas les différences dues aux problèmes techniques d'infiltration, de coupe...
- Un plateau témoin a été réalisé avec 9 cas, et lu à l'aveugle par 7 pathologistes pour tenter de restreindre le nombre de substituts à étudier secondairement
  - Il s'agissait de choisir les 3 substituts présentant la meilleure morphologie en HE, en leur affectant une note

# 1<sup>ère</sup> partie : Sélection des substituts

- Classement des substituts selon le nombre de “points” obtenus

<b>Excell</b>	65	}	A base d'aldéhyde
<b>Glyo</b>	64		
<b>RCI2</b>	59	}	Sans aldéhyde
<b>Hydro</b>	57		
<b>Xp Fix</b>	53		
<b>Xp trans</b>	35		
<b>Mirsky's</b>	26		
<b>Fine fix</b>	26		

- Abandon des substituts suivants pour la suite de l'étude: Finefix, Myrsky's, Xpress Transport (3 derniers scores)

## 2<sup>ème</sup> partie : Méthodologie

- Une deuxième série d'analyses a alors été entreprise, portant sur un plus grand nombre d'échantillons
  - 43 cas, représentant 10 organes
  - 6 substituts analysés
  - 258 blocs réalisés
- Etude menée uniquement sur prélèvements de pièces opératoires fraîches
- Non testé:
  - Effet sur la fixation des grosses pièces
  - Effet sur les biopsies

## 2<sup>ème</sup> partie : Méthodologie

- Après une première tentative d'évaluation sur coupes standard, la quantité de lames à comparer s'est avérée trop importante
- Nous avons alors procédé à la réalisation de tissus-arrays, afin de faciliter le travail d'analyse comparative et de minimiser la variabilité de lame à lame dans les techniques utilisées (HE, colorations spéciales, IHC)
- 5 tissue-arrays ont été réalisés. Trois carottes de 600  $\mu\text{m}$  de diamètre ont été réalisées pour chaque prélèvement

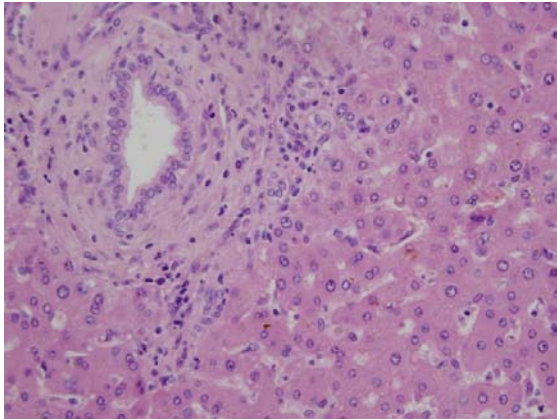
# 2<sup>ème</sup> partie – Résultats comparés

- Note aux lecteurs:
  - Toutes les photos comparatives présentées dans les diapositives à venir proviennent, pour une même diapositive, d'échantillons:
    - du même cas
    - traités côte à côte et sur la même lame
  - Pour refléter au mieux les disparités de teinte ou d'intensités de coloration, il a été utilisé un temps d'exposition identique pour toutes les photos d'une même série (mode d'exposition « manuel » du logiciel photo)
  - Les détails morphologiques sont analysables en visionnant les photos de cette présentation à fort grossissement (**zoom 400%**)

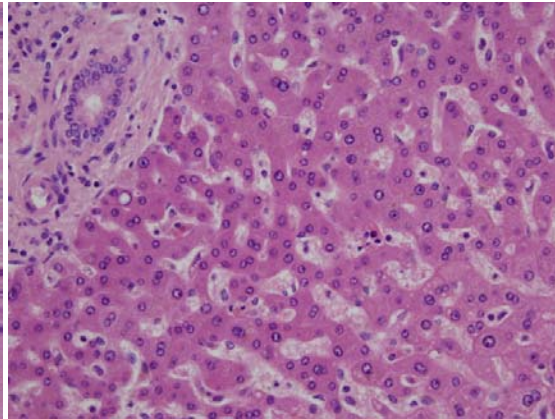


# HE

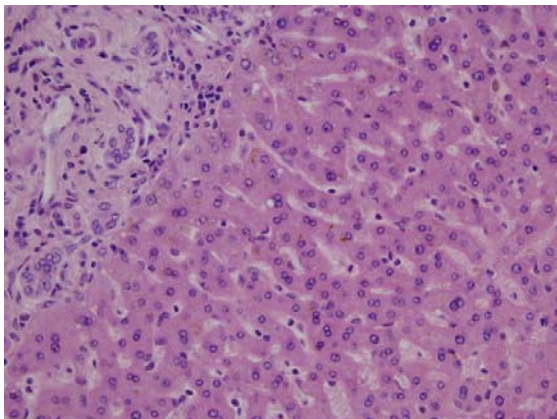
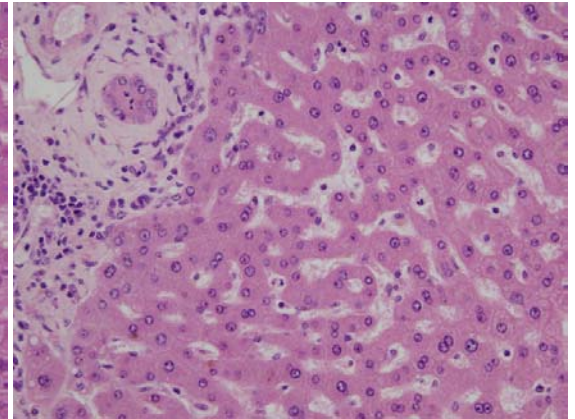
Formol



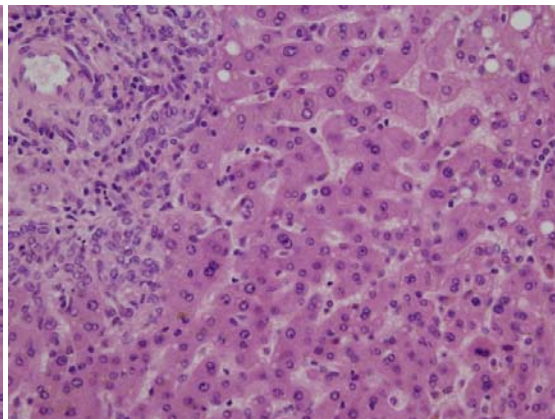
Rcl2



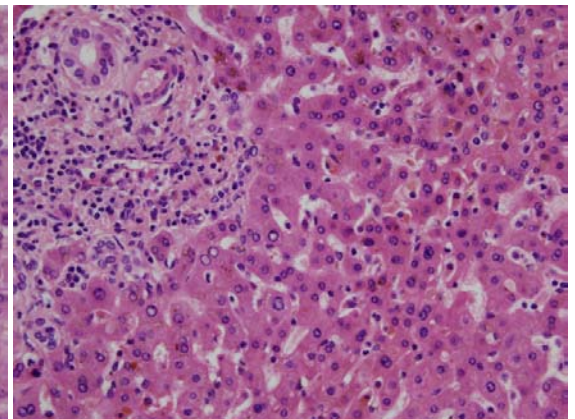
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx

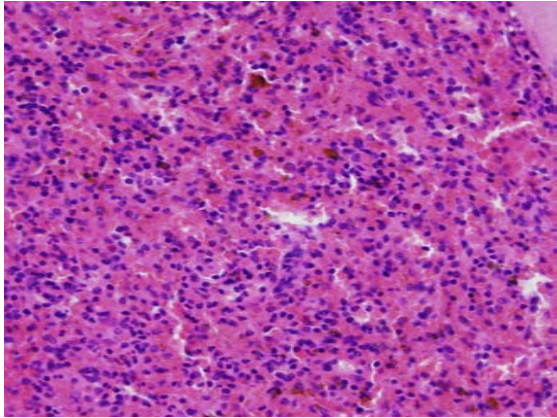


Xp Fix

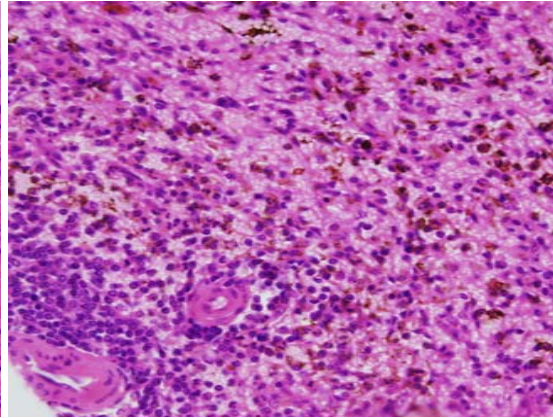
Substituts à base d'alcool (Rcl2, XpFix, Hydrosafe): coloration HE à tendance plus rose nécessitant un minime réajustement du protocole (foie x40)

# HE

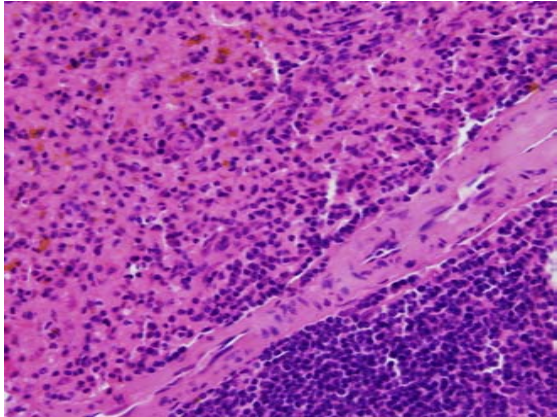
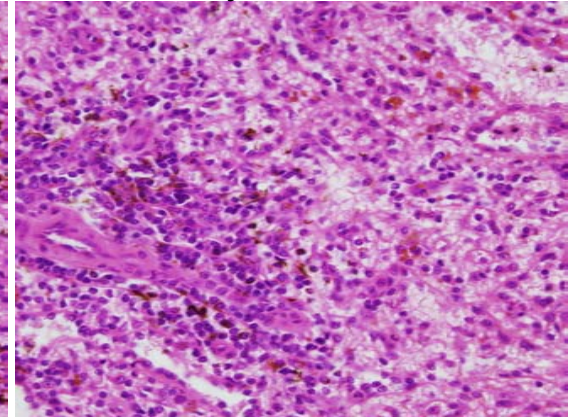
Formol



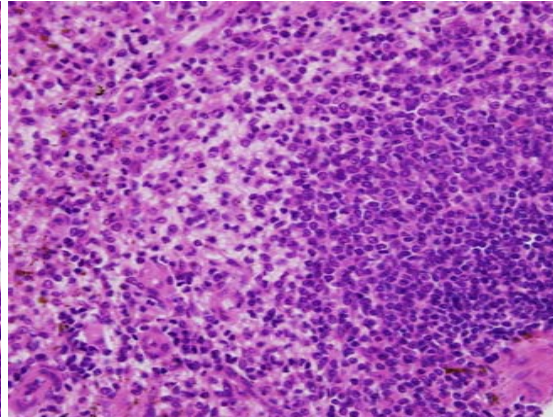
Rcl2



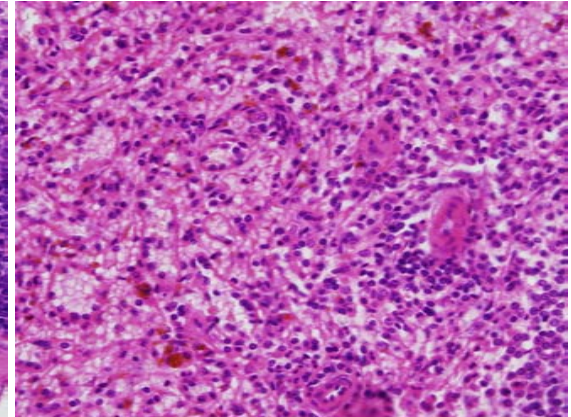
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx

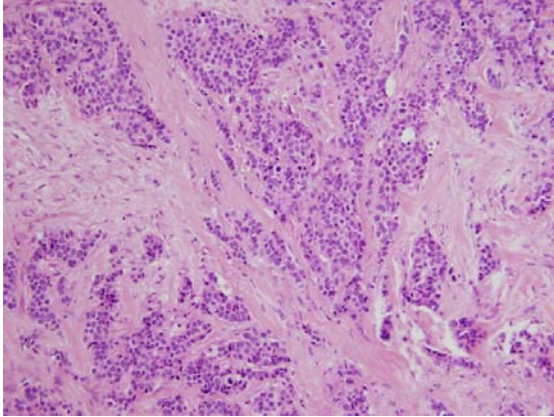


Xp Fix

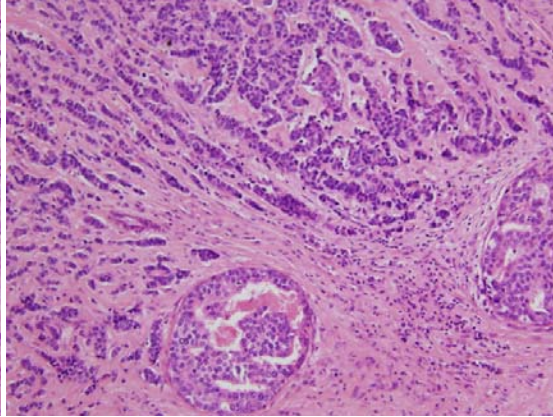
Artéfacts les plus souvent observés: rétractation cellulaire et/ou nucléaire;  
lyse ou turgescence des GR pour tous les substituts à l'exception d'Excell (rate x40)

# HE

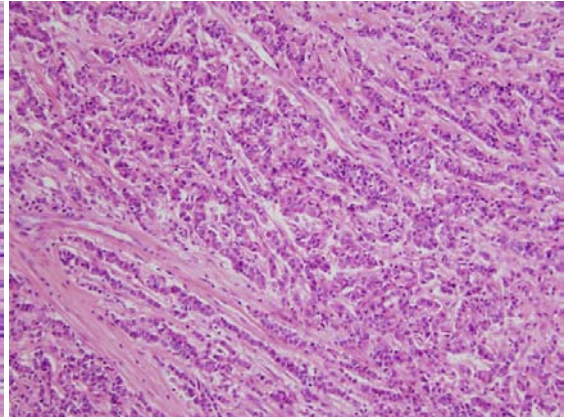
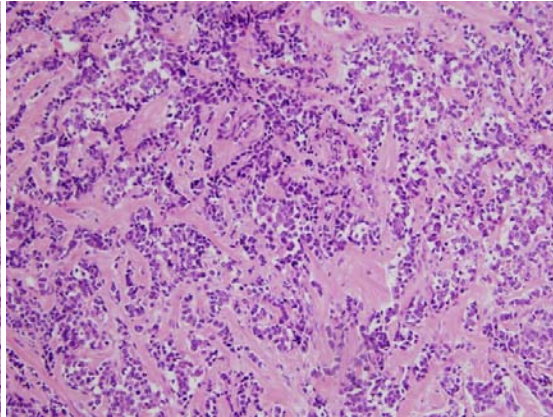
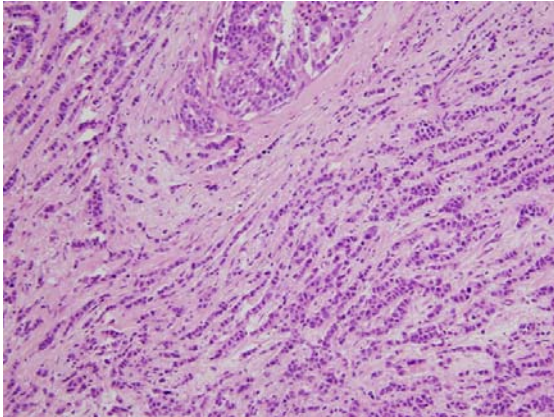
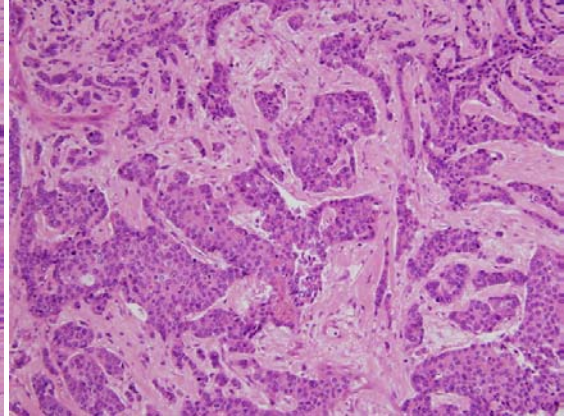
Formol



Rcl2



Hydrosafe



Excell

Glyo-Fixx

Xp Fix

Peu de différence de morphologie entre les 5 substituts testés. “Les goûts et les couleurs...”  
(carcinome infiltrant du sein x40)



# Colorations spéciales

- Ce point n'a pas été étudié de manière exhaustive, mais il apparaît qu'un "simple" transfert de protocole de coloration n'est pas possible dans tous les cas
- Le changement pour un substitut nécessite donc un réajustement des protocoles de coloration spéciale

# Colorations spéciales : Giemsa

Formol

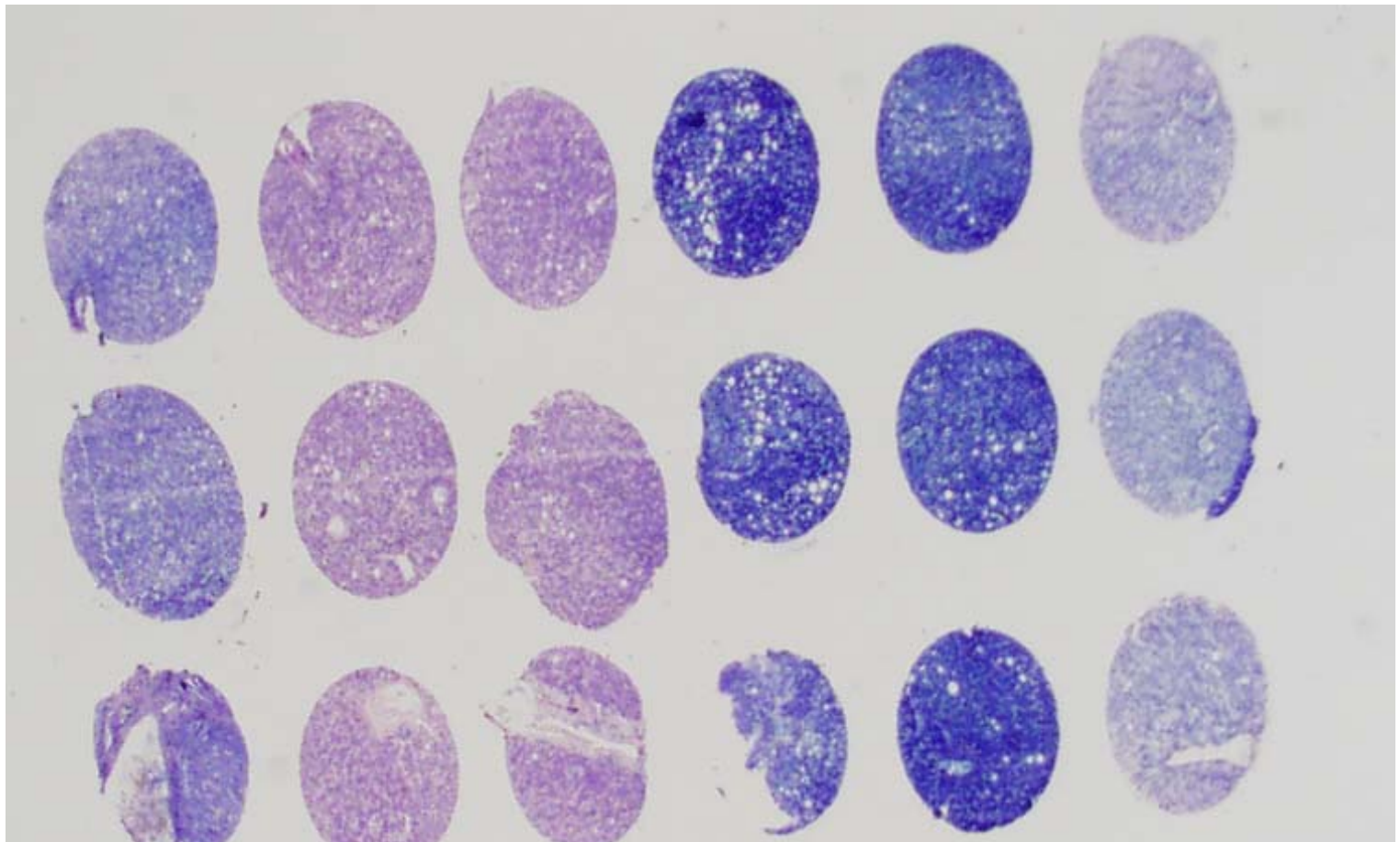
RCL2

Hydrosafe

Excell

GlyoFixx

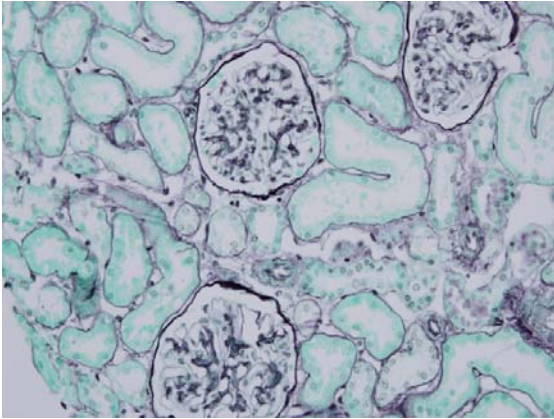
Xp Fix



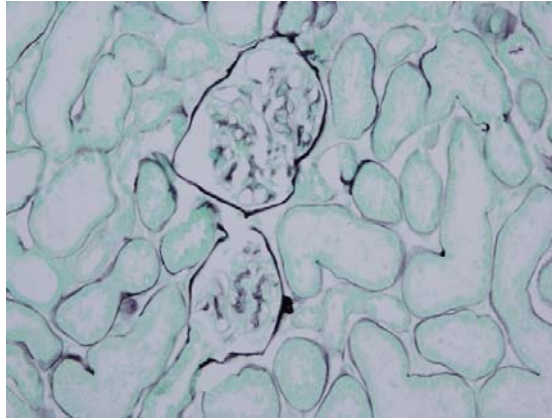
Résultat macroscopique des teintes de Giemsa obtenues sur tissu array de rate (3 carottes par fixateur)

# Colorations spéciales : Jones

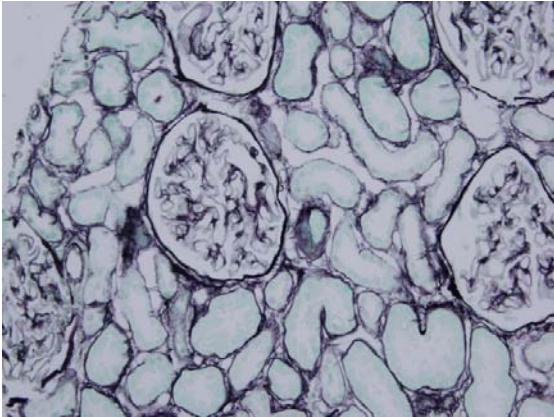
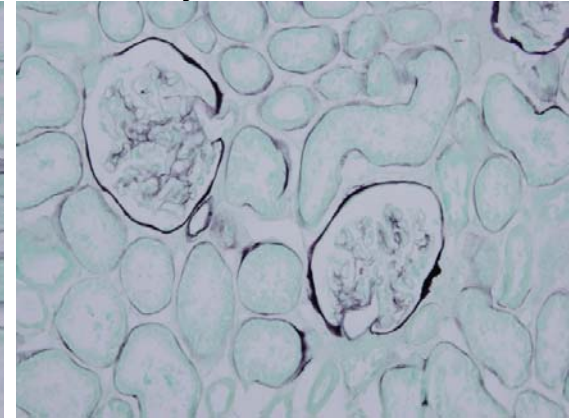
Formol



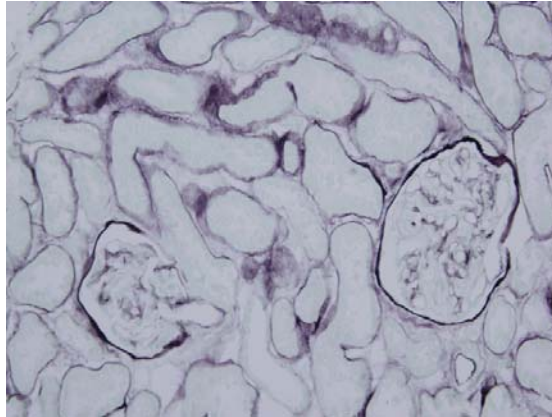
RcI2



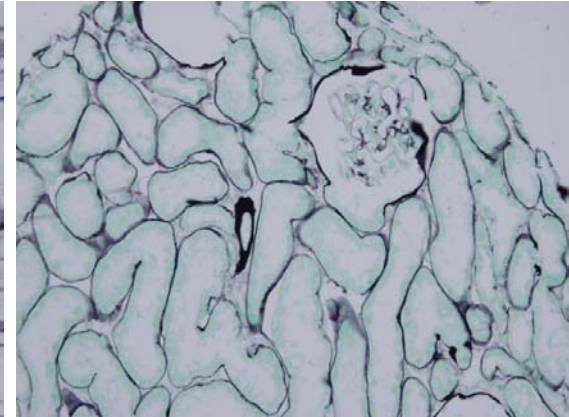
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx

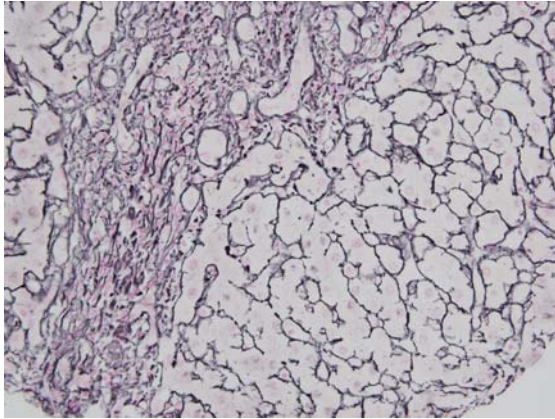


Xp Fix

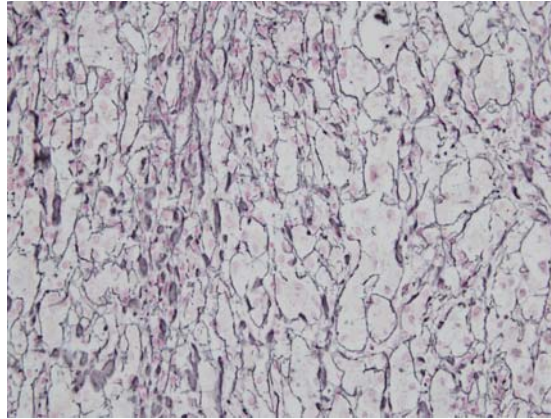
Résultats obtenus pour une coloration de Jones. Les fibres sont plus ou moins bien dessinées, et à fort grossissement on observe une détérioration de la morphologie nucléaire.

# Colorations spéciales : réticuline

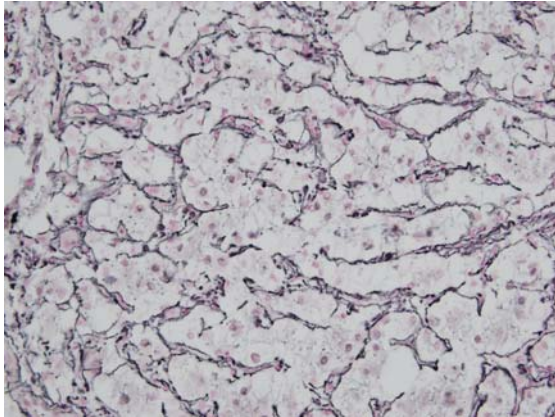
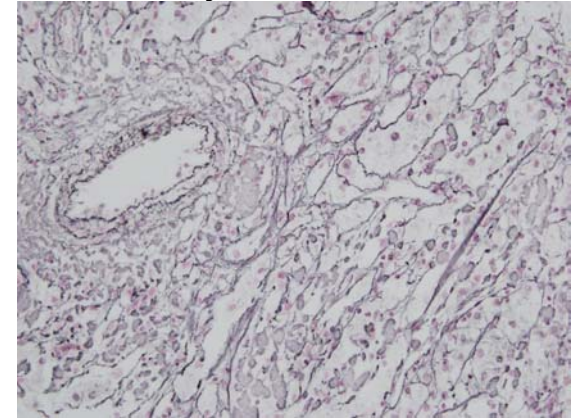
Formol



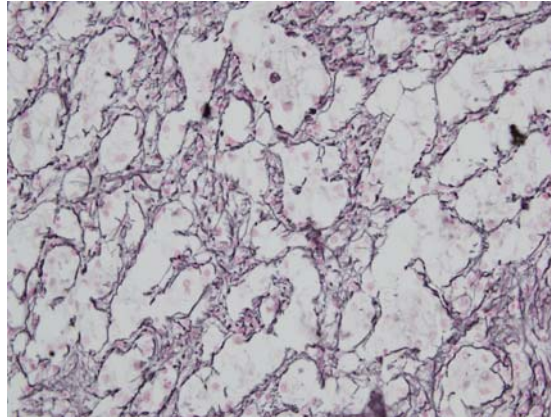
Rcl2



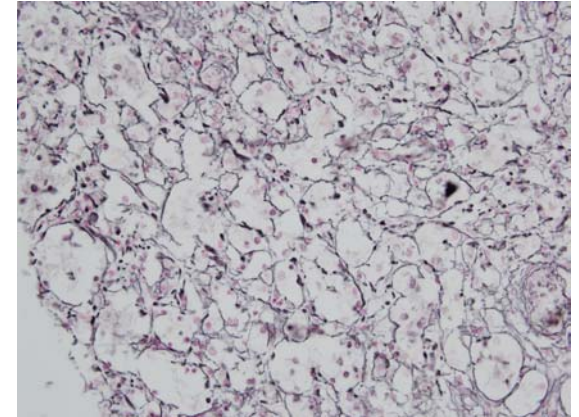
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx

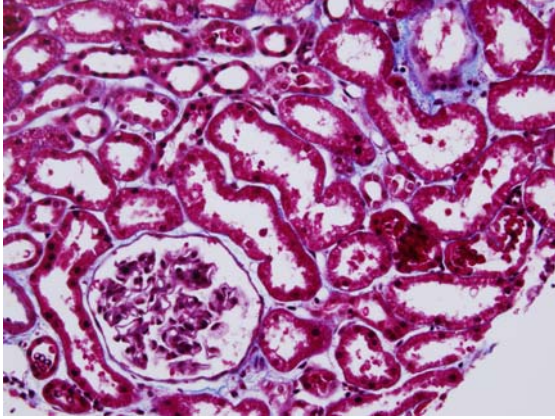


Xp Fix

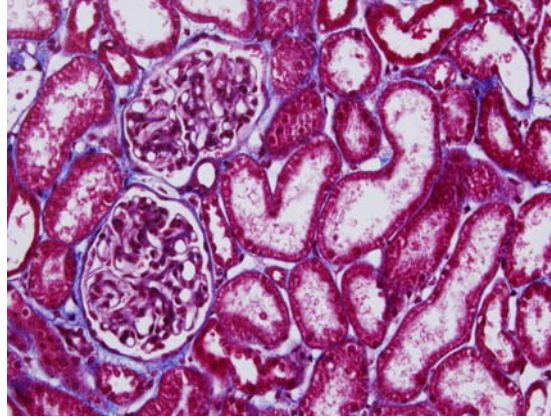
Résultats obtenus pour une coloration de la réticuline. Les fibres sont plus ou moins bien dessinées, mais on observe là aussi, à fort grossissement, une détérioration de la morphologie nucléaire.

# Colorations spéciales : trichrome

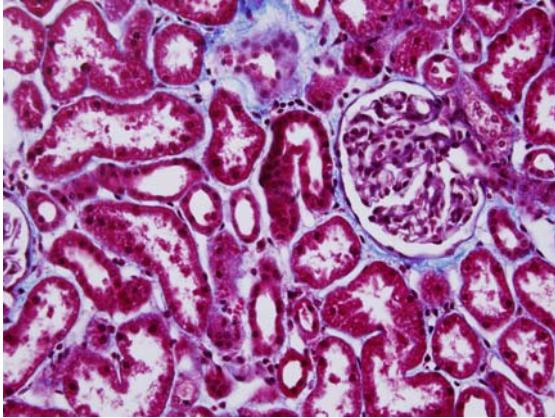
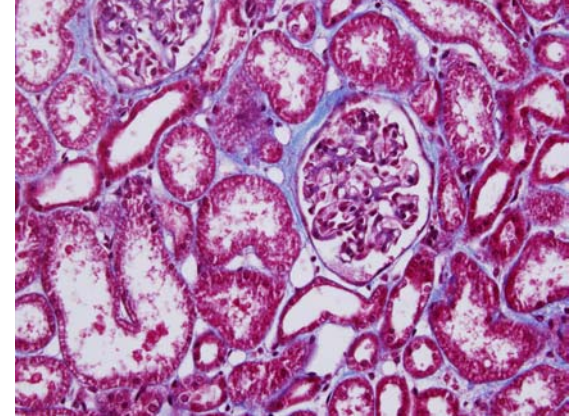
Formol



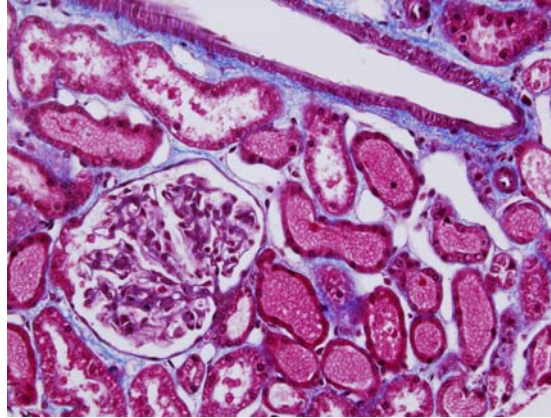
Rcl2



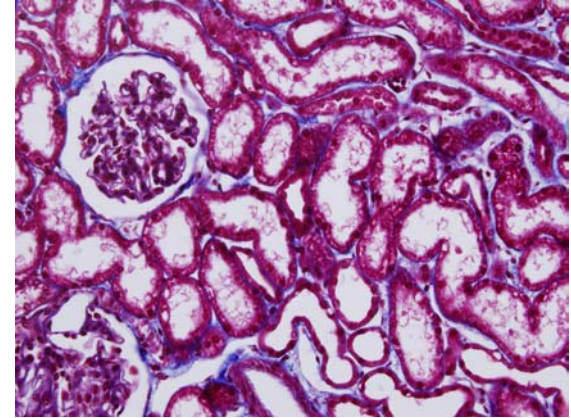
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



Xp Fix

Résultats obtenus pour le trichrome, qui est plus permissif. A fort grossissement, la morphologie cytoplasmique est légèrement altérée pour : Rcl2, Hydrosafe, Glyo-Fixx et XP Fix.

# Colorations HE et spéc. : conclusion

- Le Substitut Excell présente le “comportement” le plus proche du formol
  - Morphologie
  - Qualité de coloration
  - Application des colorations spéciales
- Glyo-Fixx se rapproche d’Excell et du formol, mais les résultats sont disparates: bons HE, Giemsa et Trichrome, mais colorations argentiques peu satisfaisantes
- En dehors d’Excell, tous les autres substituts demanderont plus ou moins d’adaptation. Les prélèvements se comportent en général comme des tissus “sous-fixés”.

# Résultats – IHC

- **IHC: les résultats peuvent être classés en deux grandes catégories**
  - Anticorps “faciles à adapter”: donnant une coloration acceptable en utilisant un protocole proche du formol. L’ajustement nécessaire porte sur une légère modification de la concentration de l’anticorps (+/-) ou du prétraitement.
  - Anticorps présentant des difficultés de mise au point ou nécessitant un réajustement notoire de la concentration, du type de prétraitement (PT) utilisé ou même, éventuellement, la recherche d’un nouveau clone plus adapté.

# Anticorps “faciles”

- Marqueurs CD testés : CD10, CD20, CD3, CD34, CD79a, CD68
- Cytosquelette testés : Vimentine V9, Actine (1A4 et HHF 35), CK 7, Desmine, CK 34betaE12
- Autres testés : p53, p63, PSA, EMA, Synaptophysine, Facteur VIII



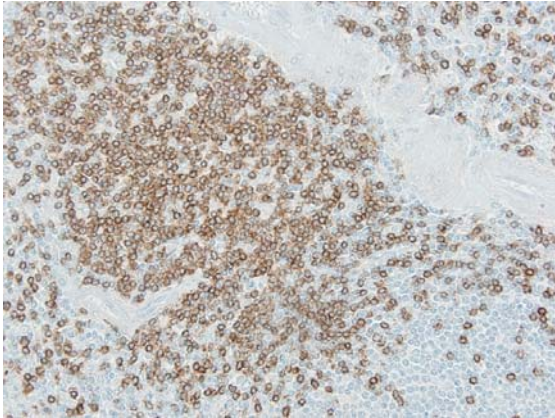
# Anticorps “faciles”

## Note :

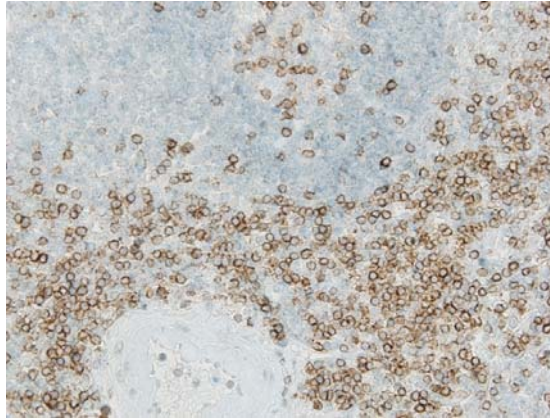
- Tous les anticorps sont à re-tester
- Au mieux 20% des protocoles « formol » sont transférables “à l’identique”, quelque soit le substitut considéré
- Les résultats ne sont pas prédictibles pour un substitut donné  
(ex: si le protocole formol convient pour CD20 substitut X, cela n’implique pas un transfert de ce protocole formol pour CD3 ou CD68)

# Anticorps “faciles” : CD3

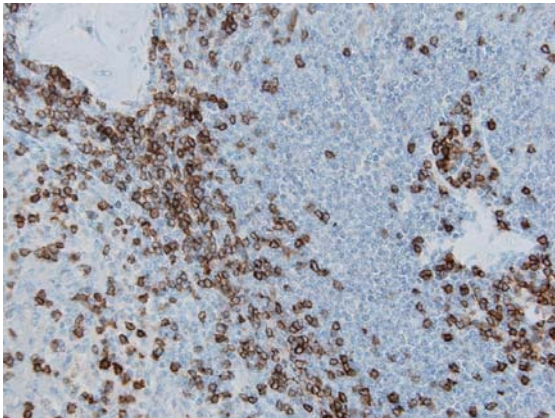
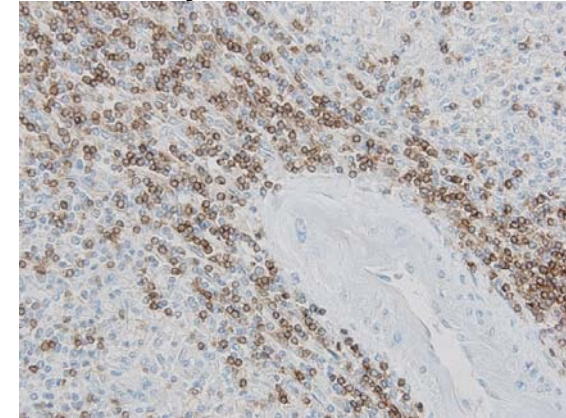
Formol



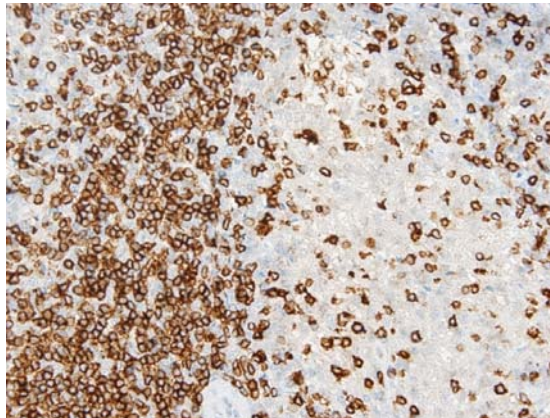
Rcl2



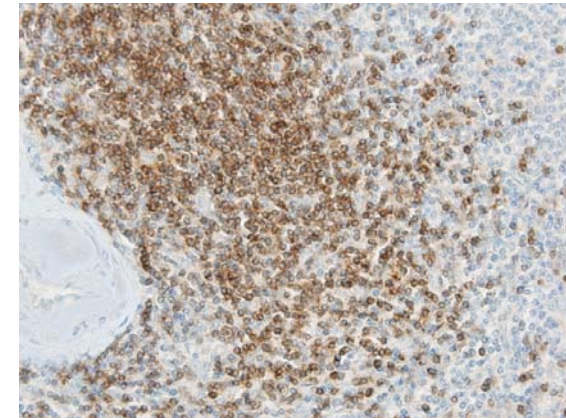
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx

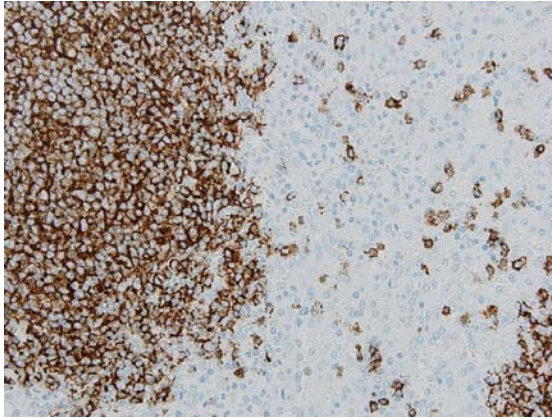


Xp Fix

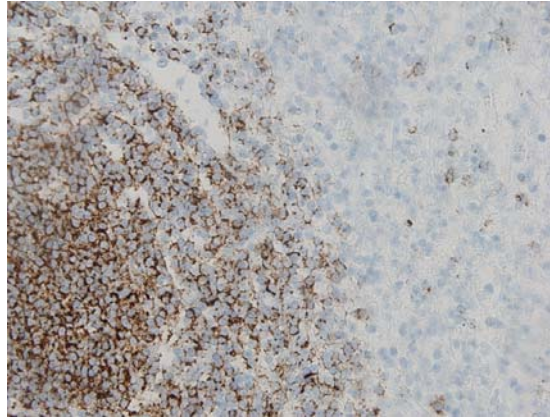
Différences d'intensité obtenues pour un CD3. Sans prétraitement, dilution 1/200

# Anticorps “faciles” : CD20

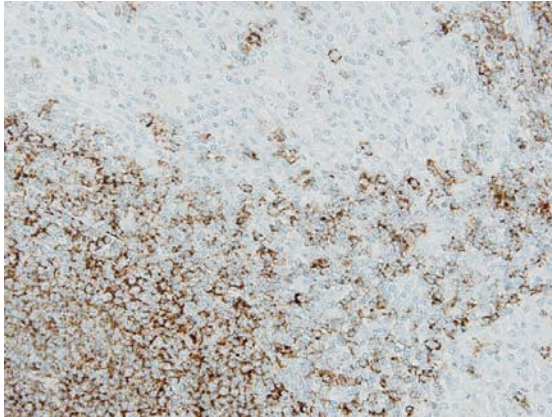
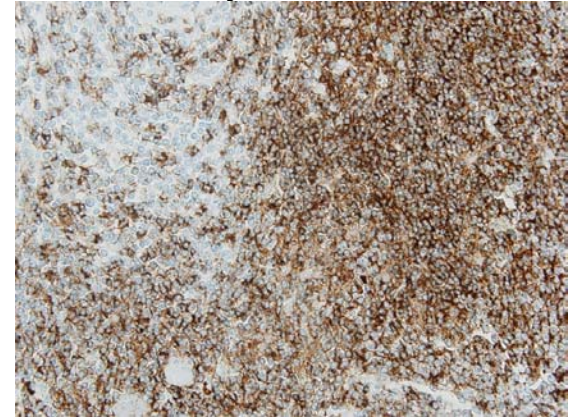
Formol



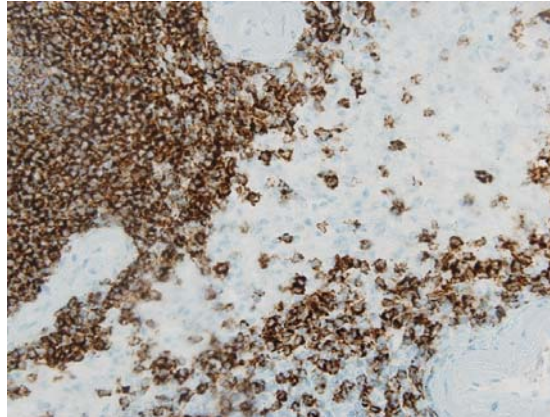
Rcl2



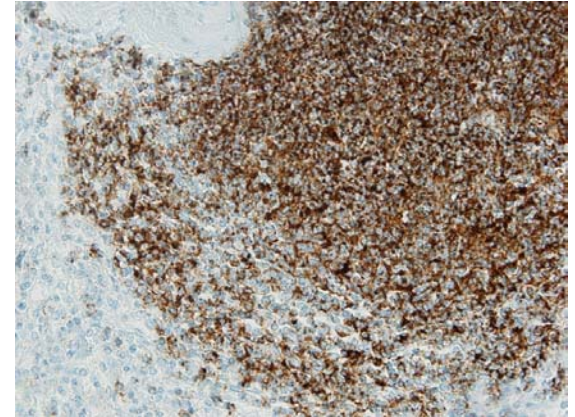
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



Xp Fix

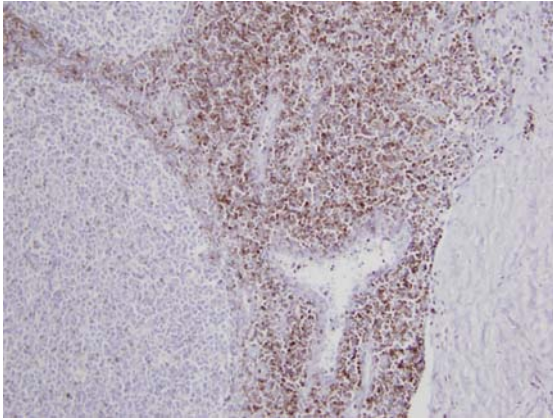
Différences d'intensité obtenues pour un CD20. Sans prétraitement, dilution 1/200

# Anticorps “difficiles”

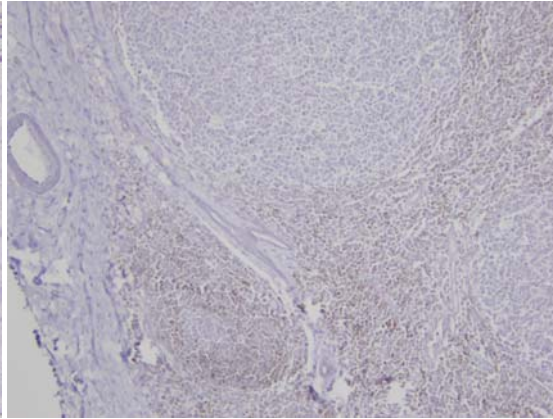
- Anticorps difficiles
  - Anticorps demandant à être re-concentrés (ex: ER/PR – coût...)
    - Pas toujours possible de concentrer plus (ex: bcl2)
  - Traitement antigénique souvent nécessaire malgré tout (“le substitut X ne nécessite pas de démasquage antigénique”: cette affirmation n’est pas vraie pour une majorité d’anticorps)
    - Démasquage approprié mais morphologie + altérée (la plupart des marqueurs nucléaires)
- Anticorps plus difficiles à mettre au point:
  - Kappa/Lambda
  - Certaines kératines (KL1); HMB45
  - Marqueurs nucléaires (ER / PR / Ki67)
  - Marqueurs déjà réputés difficiles pour le formol (bcl2, TTF1)
  - Her2

# Anticorps “difficiles” : bcl2

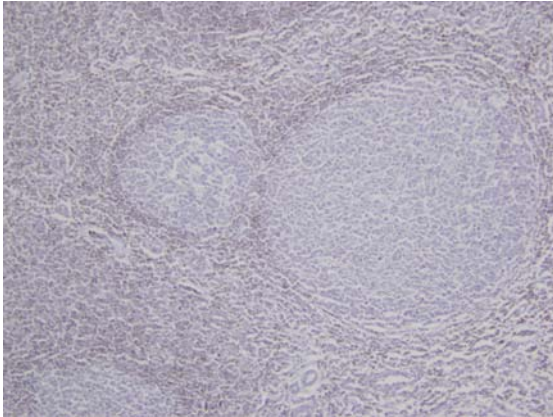
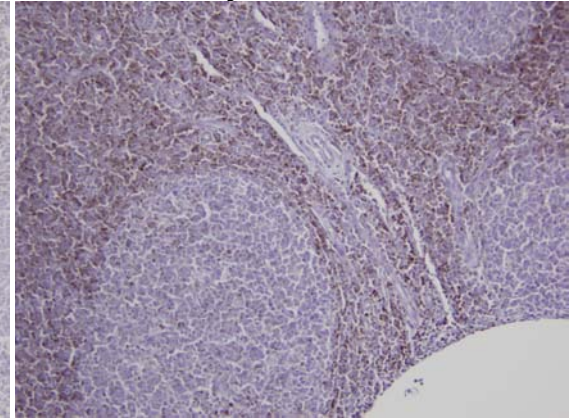
Formol



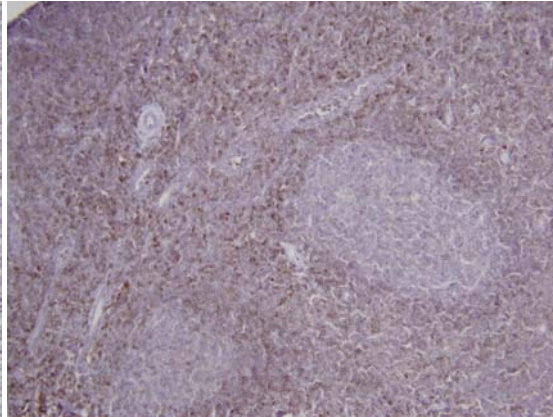
Rcl2



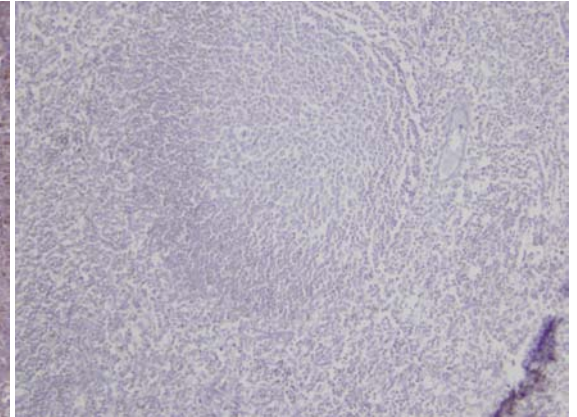
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



Xp Fix

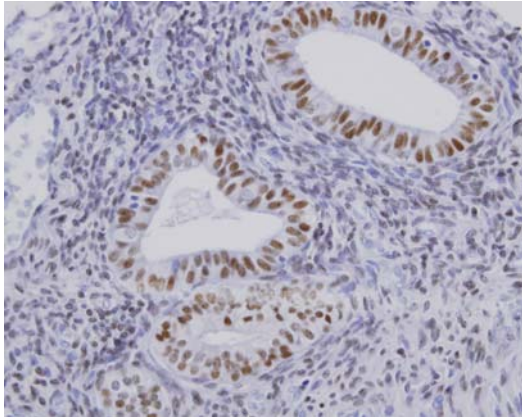
bcl-2 : 1/10<sup>e</sup>, prétraitement chaleur 30min pH7 (« CC1 court »), avec amplification.  
Impossible de concentrer plus. Certains substituts ne résisteront pas à un temps de prétraitement plus long. Solutions : changer de pH ou de formule de tampon ? Changer de clone ?

# Anticorps “difficiles”

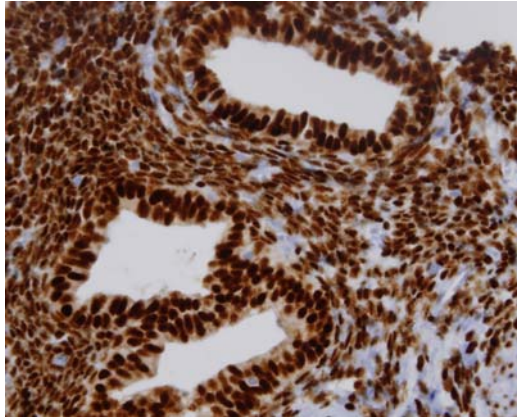
- Les sept diapositives suivantes montrent les résultats obtenus pour le récepteur à oestrogènes (Clone 6F11) pour le formol et les différents substituts
- Les variations ont porté sur la durée de prétraitement ou la concentration de l'anticorps
- Les tumeurs du sein étant souvent de petite taille (ne favorisant pas la réalisation de 6 cassettes de fixations différentes) et parfois inhomogènes, l'essai a été réalisé sur un myomètre
- Rappel: à conditions égales (ex: pas de prétraitement, Dil.1/5<sup>e</sup>), tous les substituts ont été traités sur la même lame
- La condition standard (protocole « formol ») utilisée au laboratoire est : PT 30min, pH7, dilution 1/20<sup>e</sup>

# Anticorps "difficiles" : RE-formol

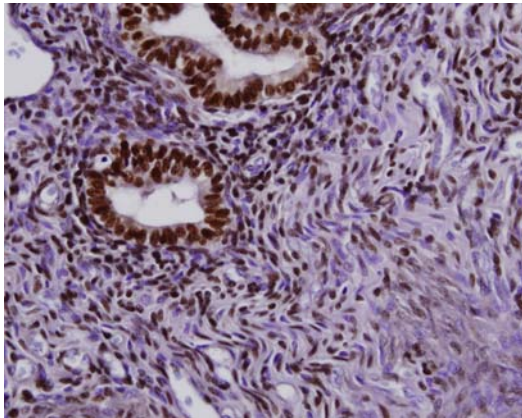
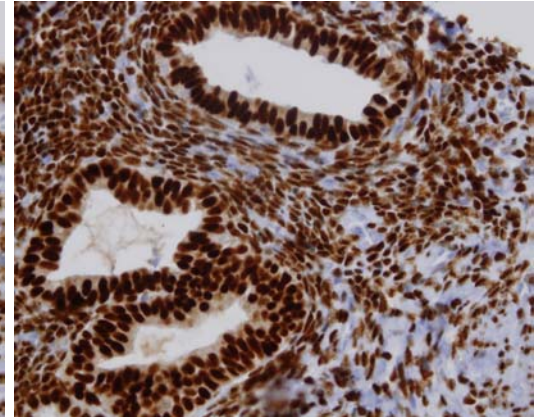
Sans PT – dil 1/20



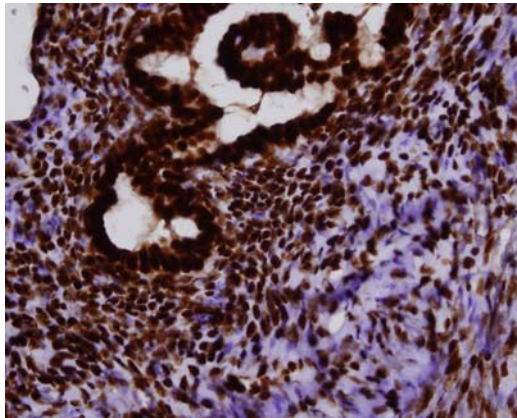
PT 30 min – dil 1/20



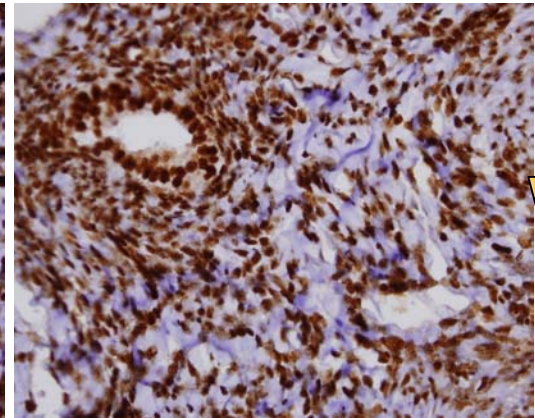
PT 60 min – dil 1/20



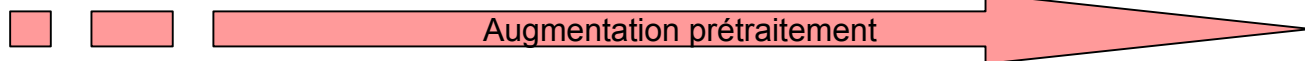
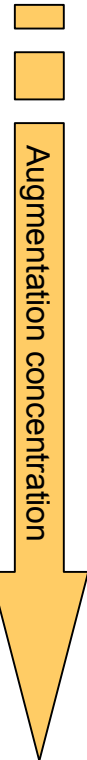
Sans PT – dil 1/5



PT 30 min – dil 1/5

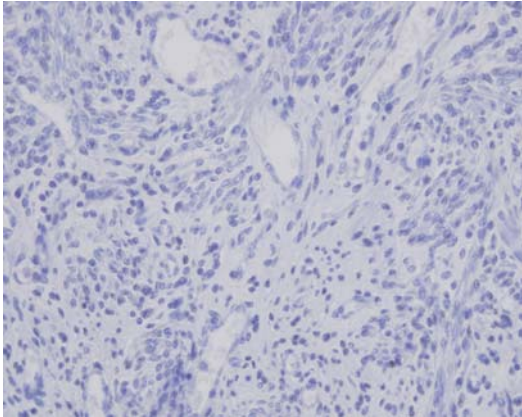


PT 60 min – dil 1/5

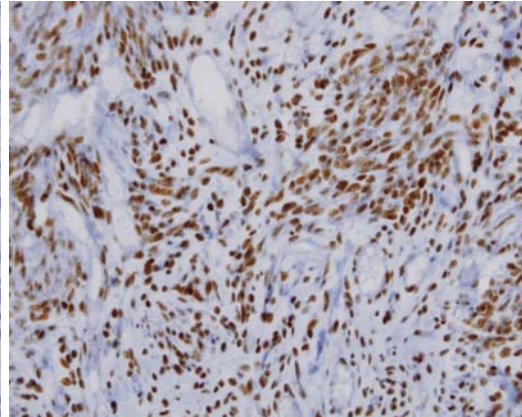


# Anticorps “difficiles” : RE-Rcl2

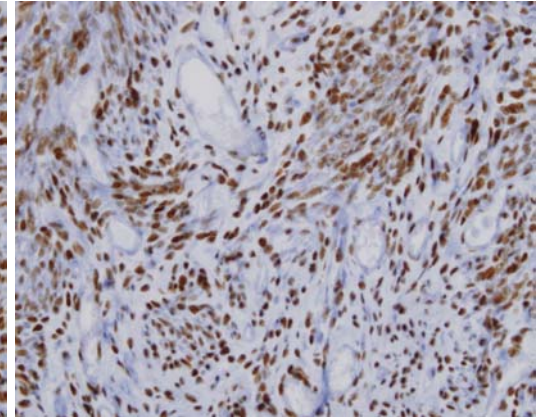
Sans PT – dil 1/20



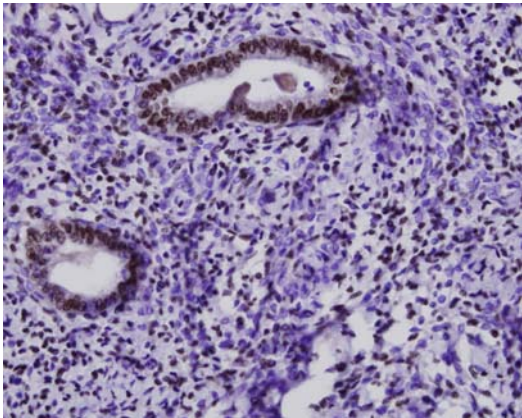
PT 30 min – dil 1/20



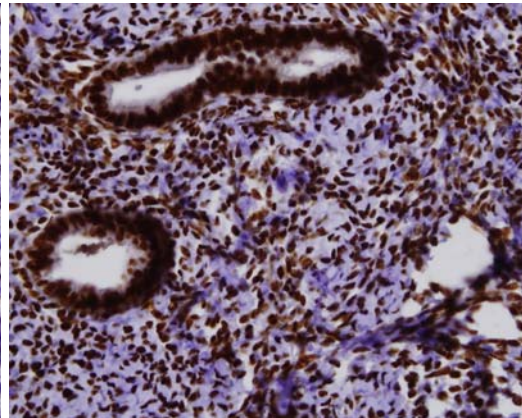
PT 60 min – dil 1/20



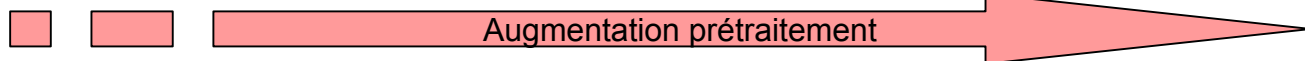
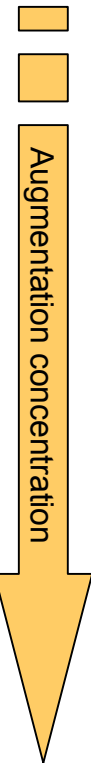
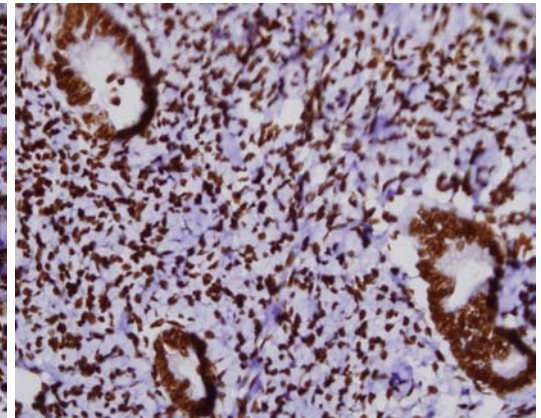
Sans PT – dil 1/5



PT 30 min – dil 1/5



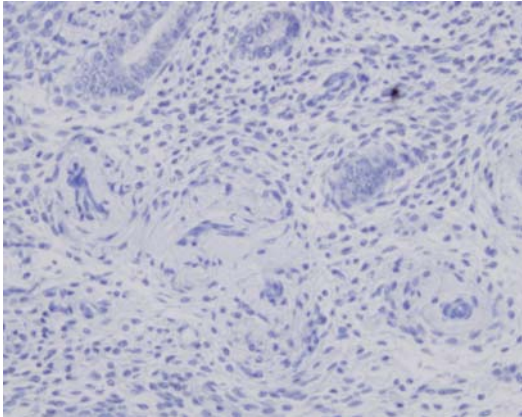
PT 60 min – dil 1/5



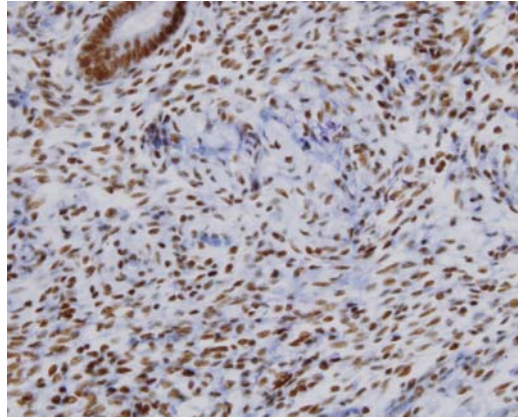


# Anticorps "difficiles" : RE-Hydrosafe

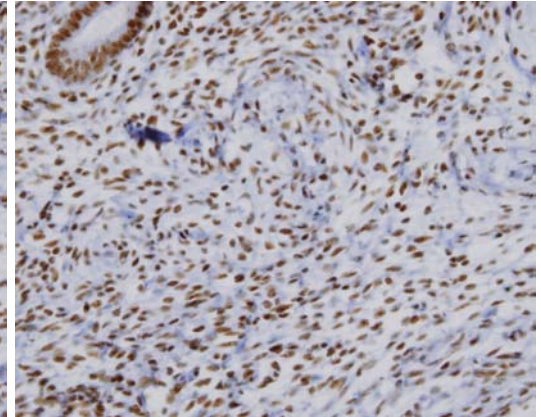
Sans PT – dil 1/20



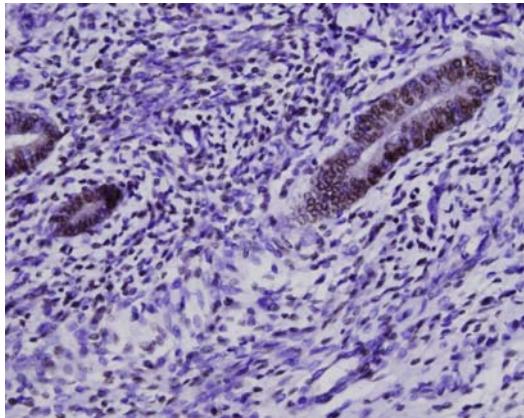
PT 30 min – dil 1/20



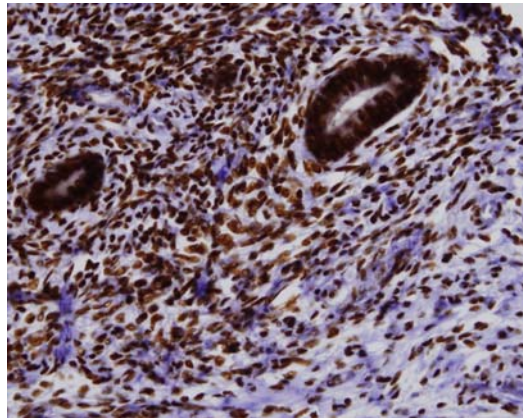
PT 60 min – dil 1/20



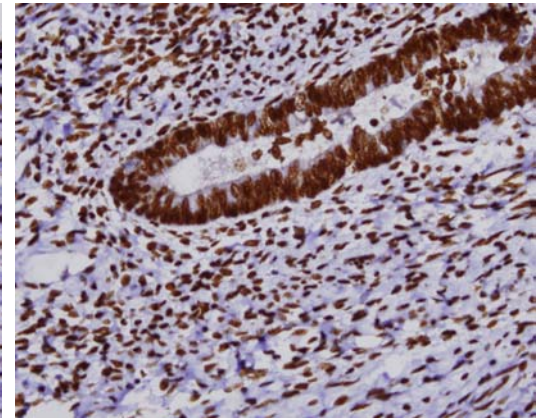
Augmentation concentration



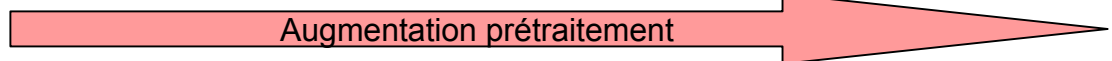
Sans PT – dil 1/5



PT 30 min – dil 1/5

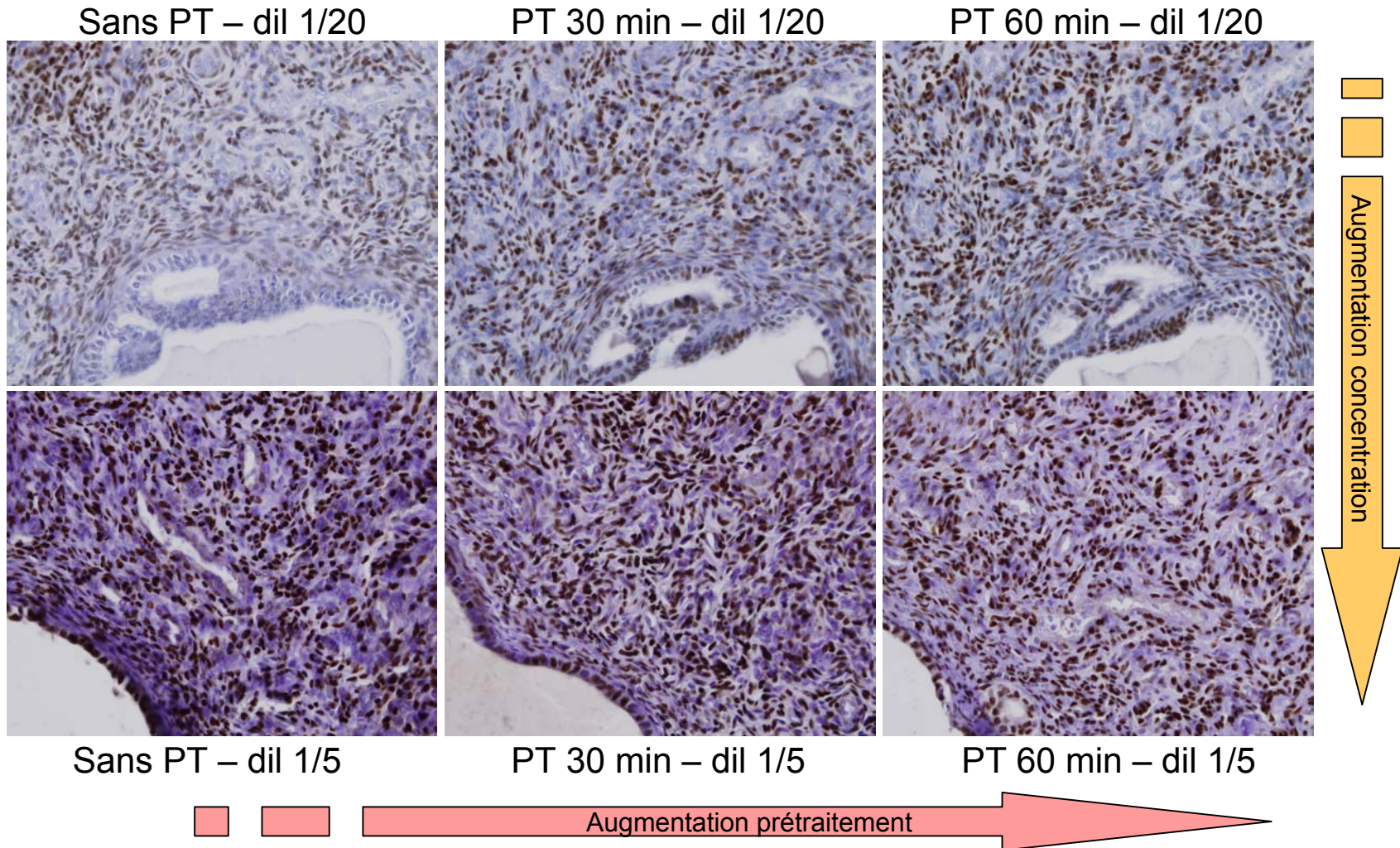


PT 60 min – dil 1/5

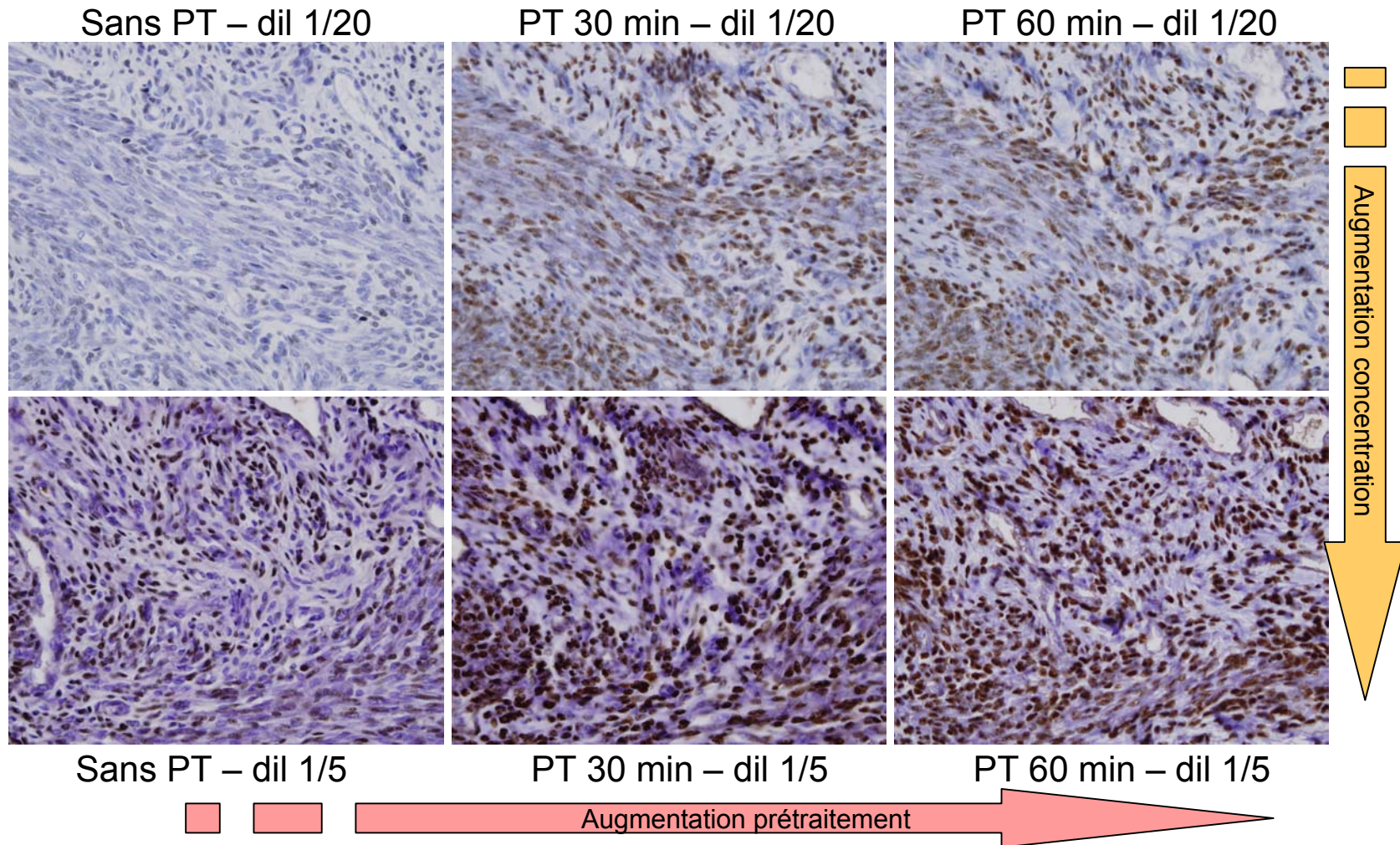


Augmentation prétraitement

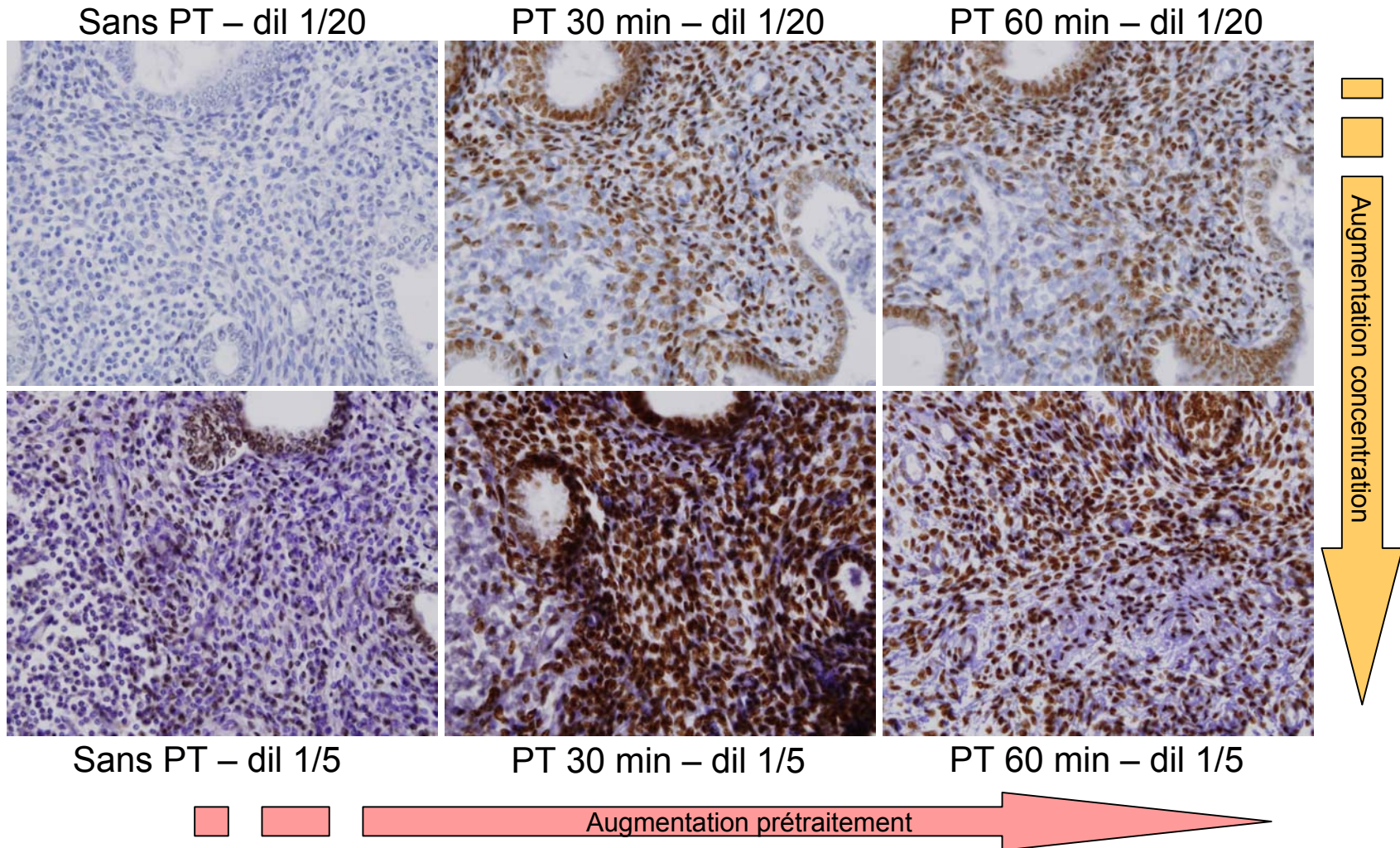
# Anticorps "difficiles" : RE-Excell



# Anticorps “difficiles” : RE-Glyo-fixx



# Anticorps “difficiles” : RE-Xp Fix

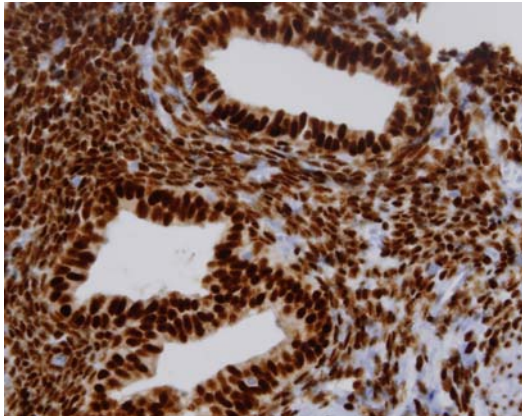


# Synthèse RE

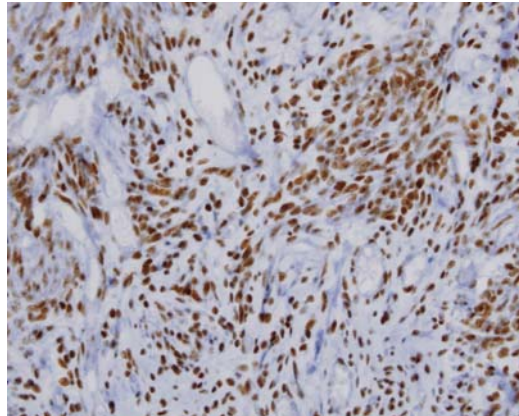
Formol/Substitut Prétraitement 30 min, dil 1/20<sup>ème</sup>

**Comparaison des résultats par transfert du protocole formol non modifié**

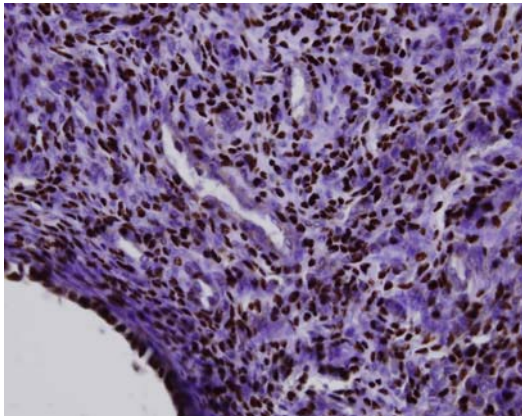
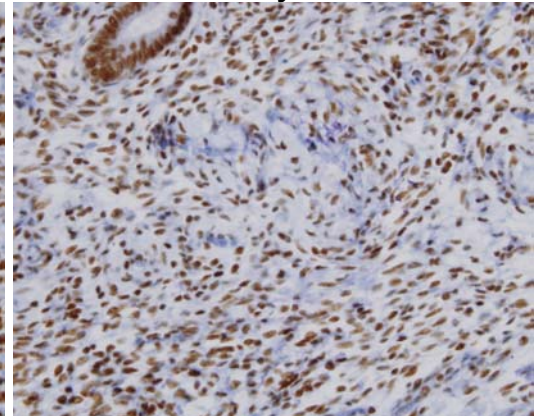
Formol



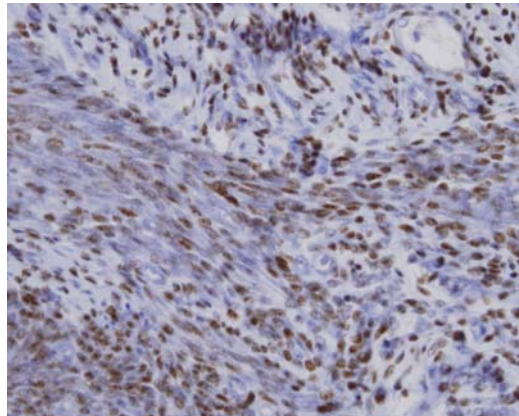
Rcl2



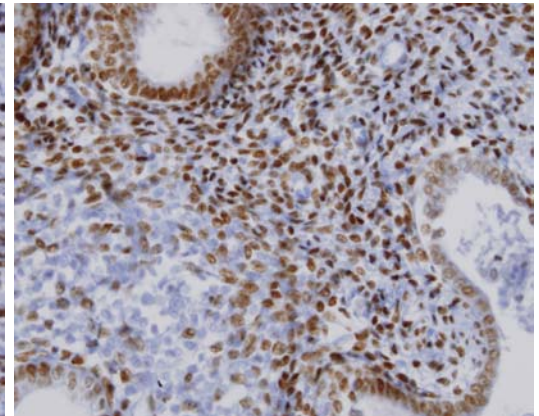
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



Xp Fix

# Anticorps “difficiles” : Observations

- La prolongation du prétraitement n'augmente pas l'intensité du signal pour la plupart des substituts; on observe même souvent une diminution du signal pour un prétraitement plus long, en raison d'une destruction de l'antigène cible et de la morphologie (aspect “cuit” des lames); à nouveau, à l'exception de la fixation par Excell, les tissus se comportent généralement comme des tissus “sous-fixés”.
- L'obtention d'un signal équivalent à celui obtenu pour le formol passe souvent par une augmentation de la concentration plus ou moins conséquente de l'anticorps primaire.

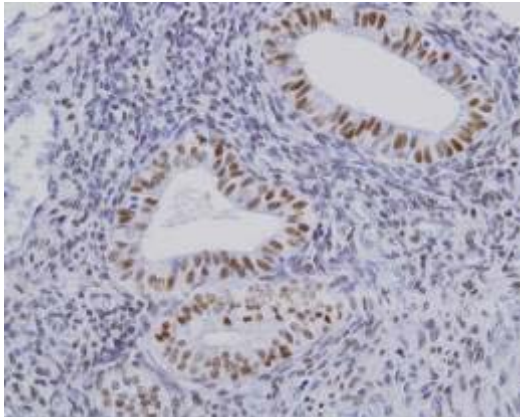
# Anticorps “difficiles” : Observations

- Les marquages obtenus sans prétraitement ne sont généralement pas meilleurs que pour le formol, mais cette remarque n'est pas généralisable à tous les anticorps.
- Les diapositives à venir vont témoigner de la disparité des résultats et de l'absence de « règle d'or ».

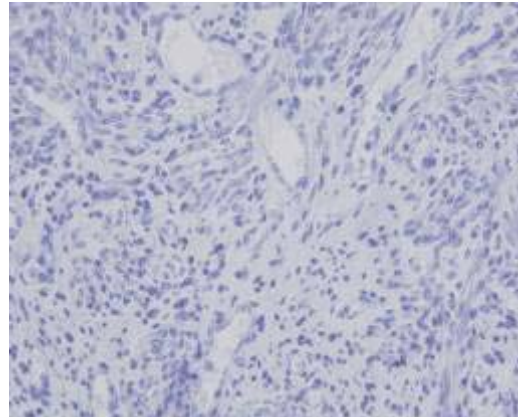
# Anticorps “difficiles” sans PT

Ex : RE (clone 6F11, 1/20e) – Formol/Substitut

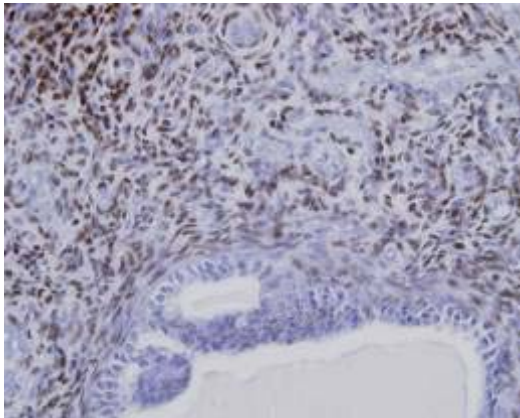
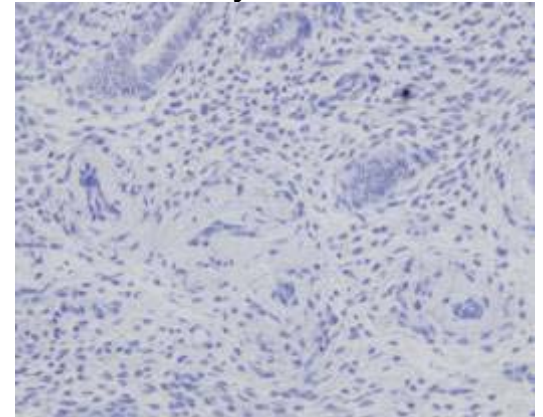
Formol



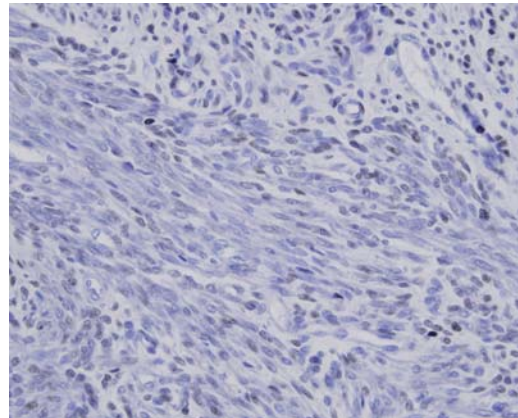
Rcl2



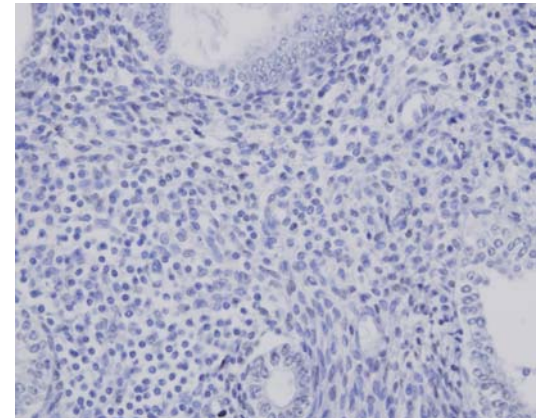
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



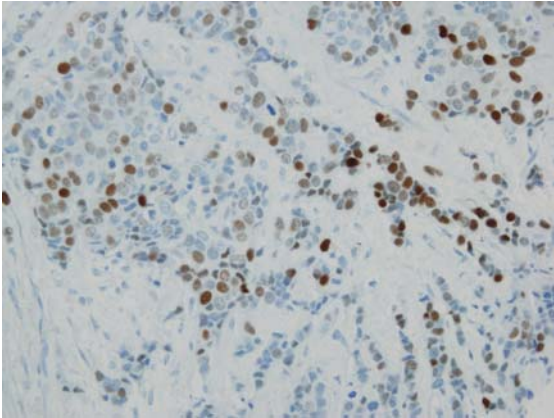
Xp Fix



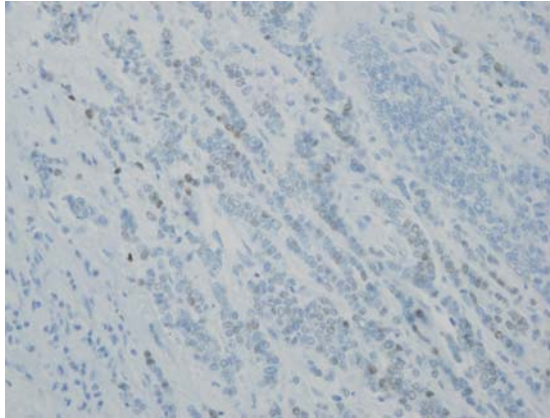
# Anticorps “difficiles” sans PT

Ex : RP (clone16, 1/100e) - Formol/Substitut

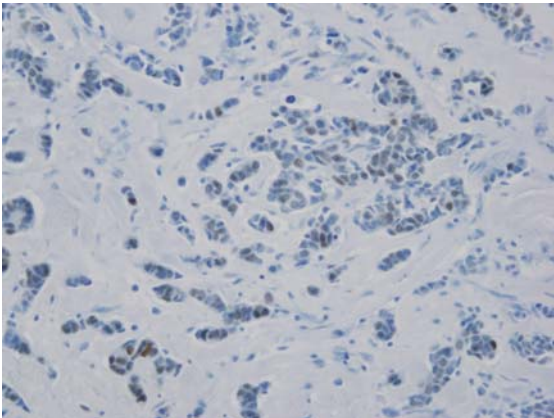
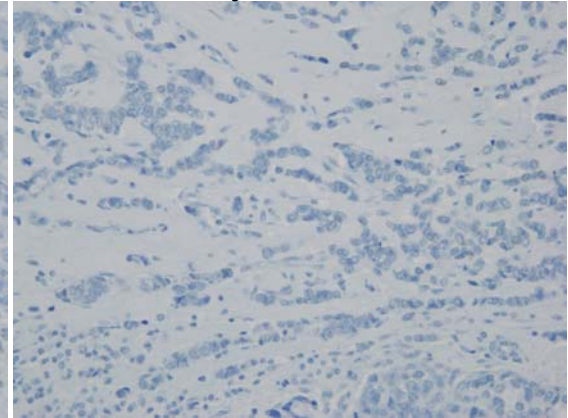
Formol



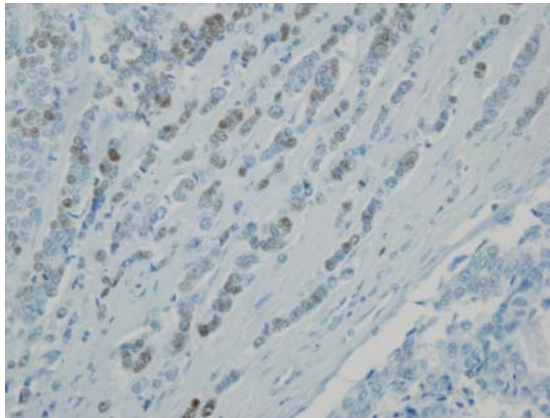
Rcl2



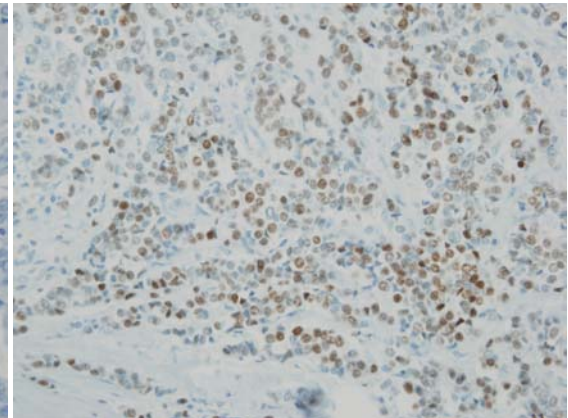
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx

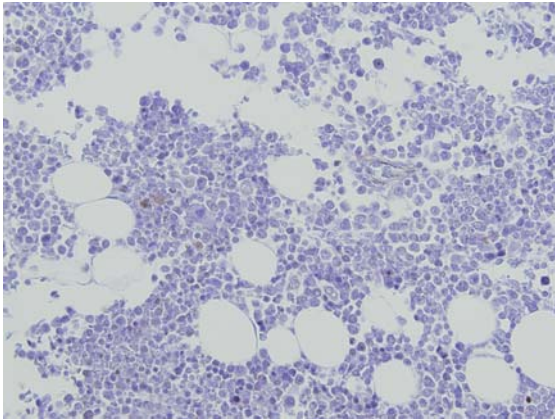


Xp Fix

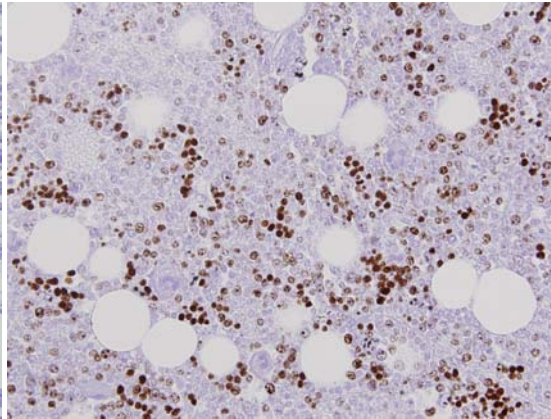
# Anticorps “difficiles” sans PT

Ex : Ki67 (clone SP6, 1/100e)- Formol-Substitut

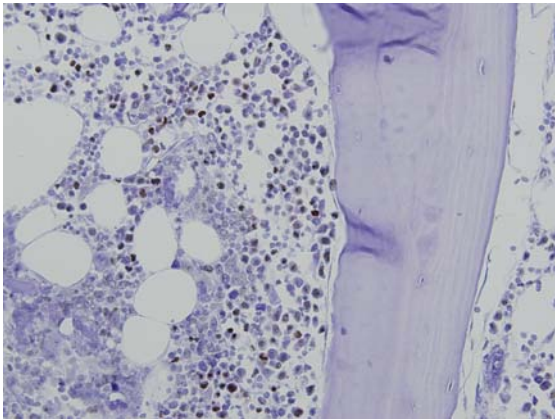
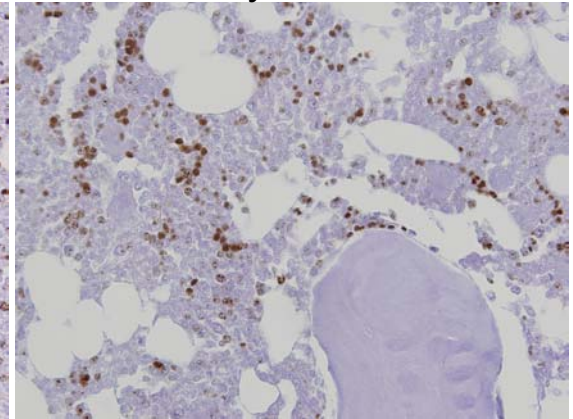
Formol



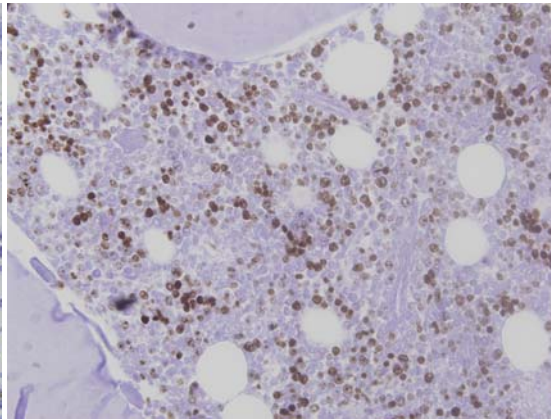
Rcl2



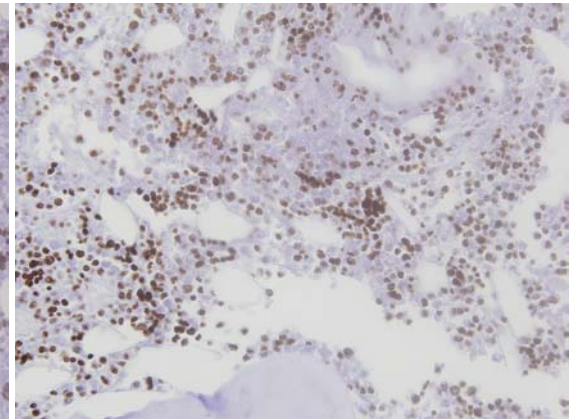
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



Xp Fix

# Anticorps “difficiles” : importance des paramètres annexes ?

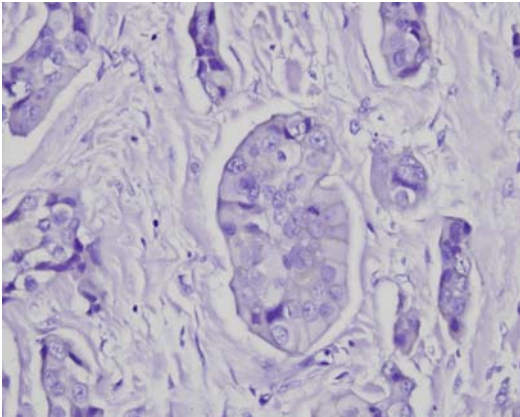
- Anecdote Récepteur - Oestrogènes
  - Lors de la réalisation de cette étude, un laboratoire utilisant un protocole identique au nôtre (même clone, même protocole, même automate, même système de révélation) nous a contacté pour un problème d'absence total de marquage des récepteurs avec le substitut Excell.
  - Les marquages obtenus pour les autres anticorps, dans ce laboratoire, étaient pourtant acceptables.
  - Les paramètres annexes ont été comparés et le protocole de déshydratation/infiltration de l'automate d'inclusion a été ajusté sur celui de Strasbourg, conduisant à une restitution des marquages RE.
  - Le substitut lui-même n'est pas seul responsable des effets (positifs ou délétères) observés. Importance des paramètres « annexes » ?
  - Les autres substituts auraient-ils réagi différemment dans notre propre étude avec des processus annexes différents ?

# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2

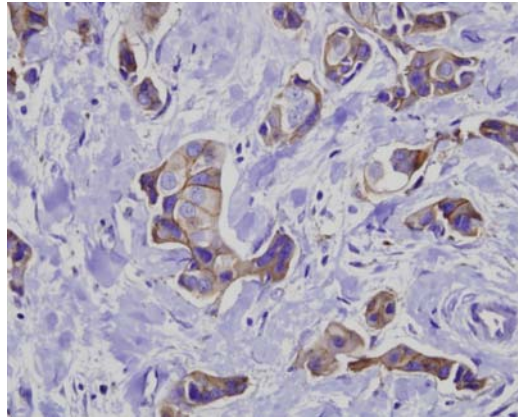
- Les sept diapositives suivantes montrent les résultats obtenus pour Her2 avec le formol et les différents substituts
- Les variations ont porté sur :
  - la durée de prétraitement (0 ou 30 min)
  - le pH de la solution de prétraitement (pH 6 ou 7)
  - le clone utilisé (monoclonal souris CB11 ou monoclonal lapin 4B5)
  - une coloration automatisée ou manuelle (3h ou O/N)
- Les prélèvements utilisés pour les substituts proviennent de la même tumeur. *Note: le prélèvement fixé en Rcl2 s'est avéré contenir plus de cellules isolées que d'îlots de cellules, ce qui rend certaines photos moins représentatives (biais).*
- Rappel: à conditions égales, tous les substituts ont été traités sur la même lame

# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2-formol

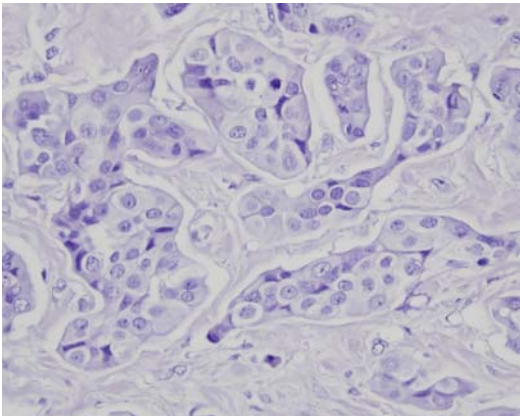
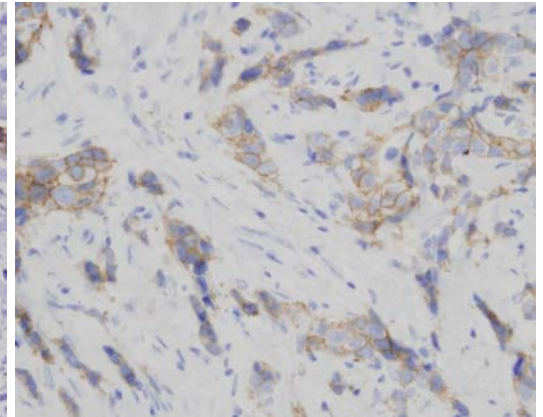
Sans PT – clone CB11  
Automatisé



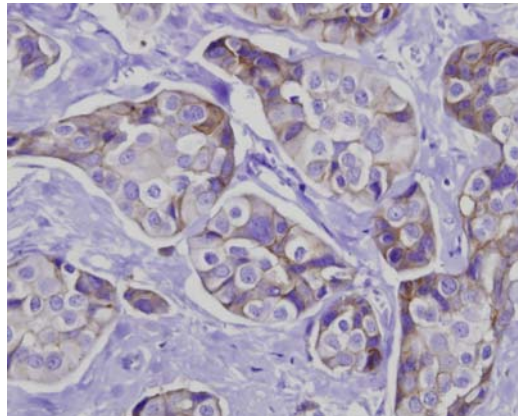
PT 30', pH7– clone CB11  
Automatisé



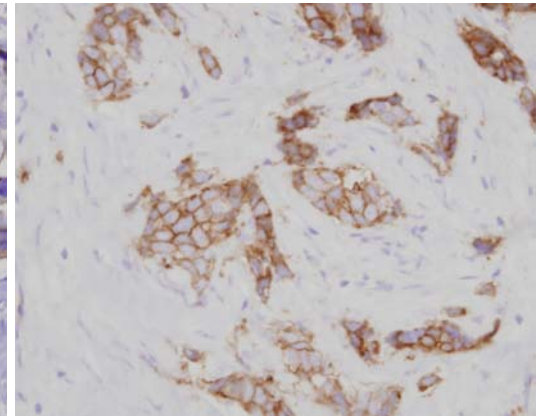
PT 30', pH6– clone CB11  
Manuel



Sans PT – clone 4B5  
Automatisé



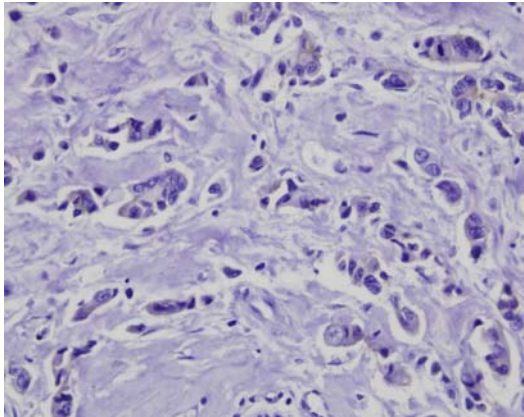
PT 30', pH7– clone 4B5  
Automatisé



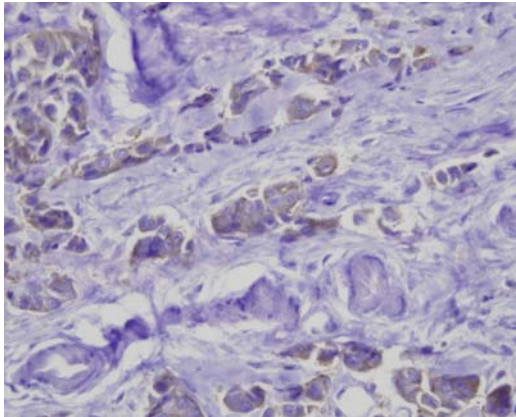
PT 30', pH6– clone 4B5  
Automatisé

# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2-Rcl2

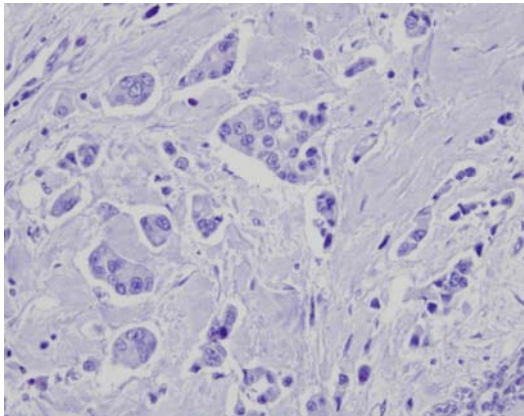
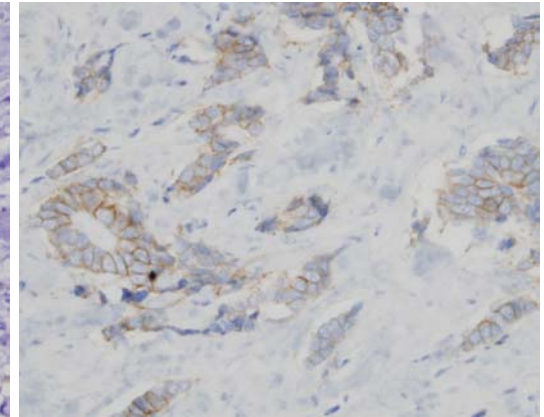
Sans PT – clone CB11  
Automatisé



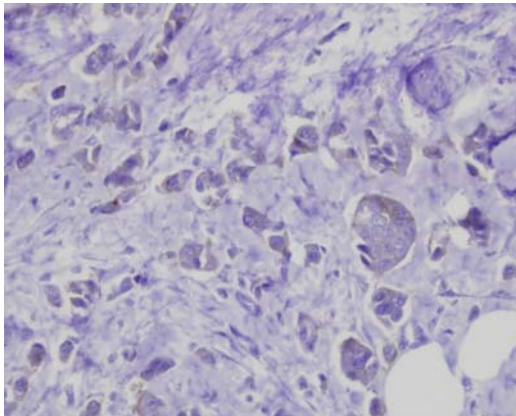
PT 30', pH7– clone CB11  
Automatisé



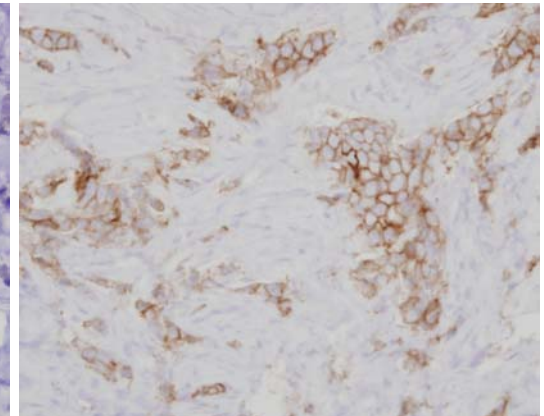
PT 30', pH6– clone CB11  
Manuel



Sans PT – clone 4B5  
Automatisé



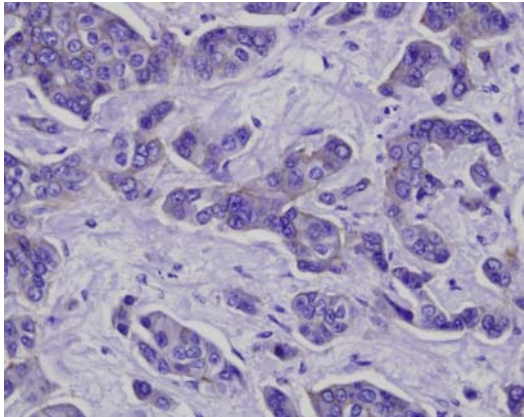
PT 30', pH7– clone 4B5  
Automatisé



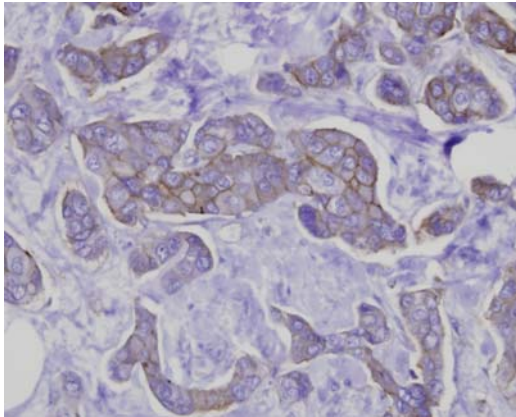
PT 30', pH6– clone 4B5  
Automatisé

# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2-Hydrosafe

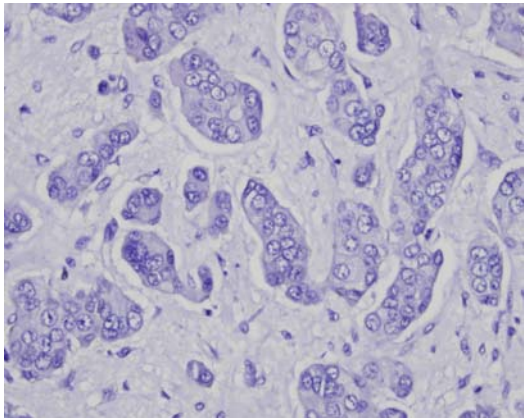
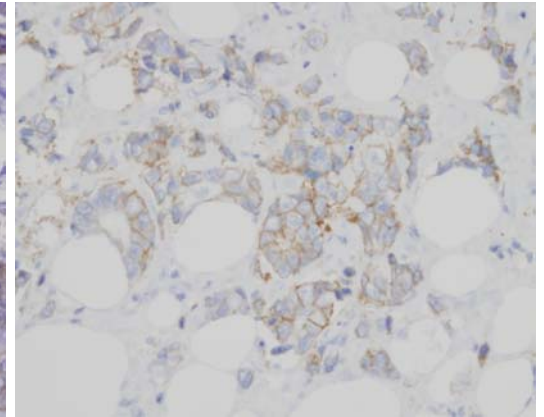
Sans PT – clone CB11  
Automatisé



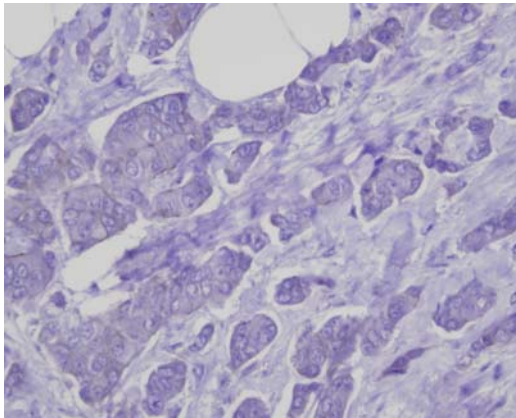
PT 30', pH7– clone CB11  
Automatisé



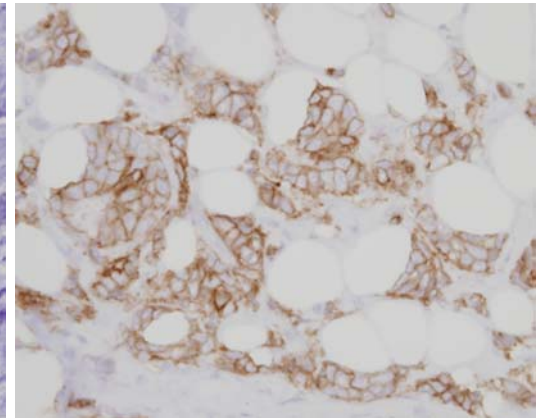
PT 30', pH6– clone CB11  
Manuel



Sans PT – clone 4B5  
Automatisé



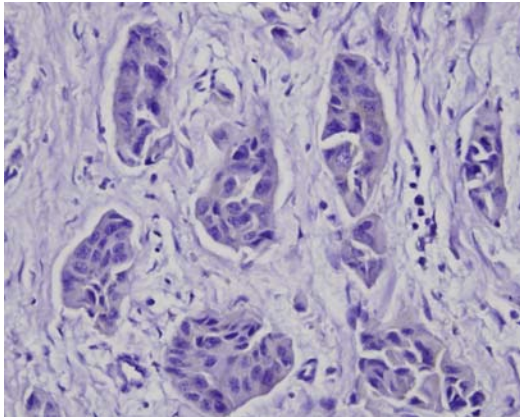
PT 30', pH7– clone 4B5  
Automatisé



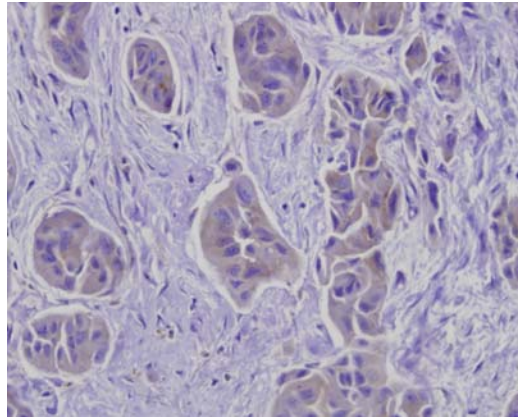
PT 30', pH6– clone 4B5  
Automatisé

# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2-Excell

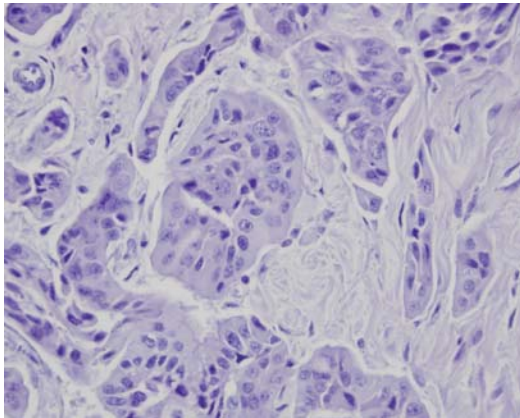
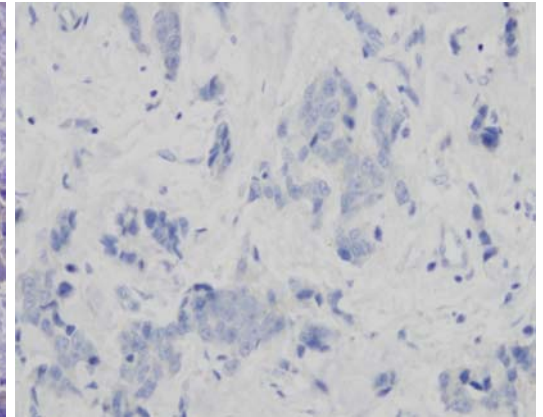
Sans PT – clone CB11  
Automatisé



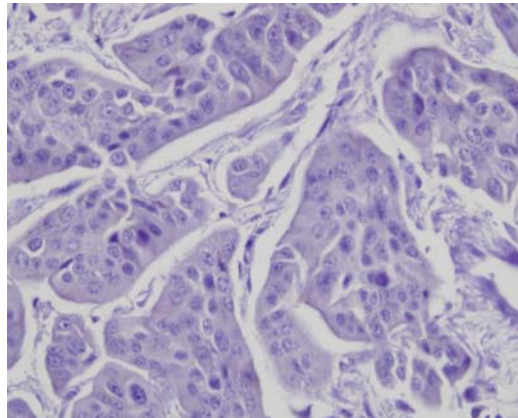
PT 30', pH7– clone CB11  
Automatisé



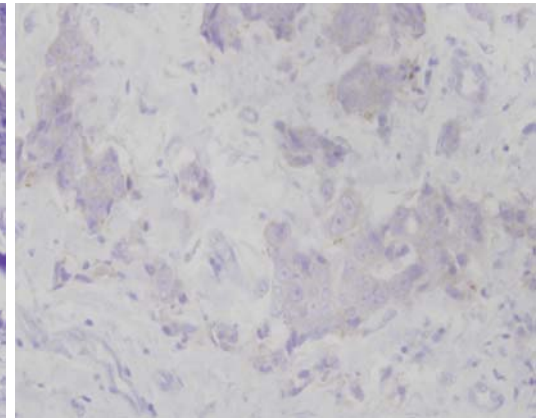
PT 30', pH6– clone CB11  
Manuel



Sans PT – clone 4B5  
Automatisé



PT 30', pH7– clone 4B5  
Automatisé

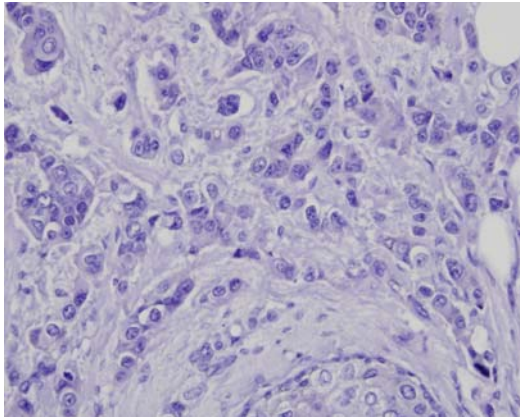


PT 30', pH6– clone 4B5  
Automatisé

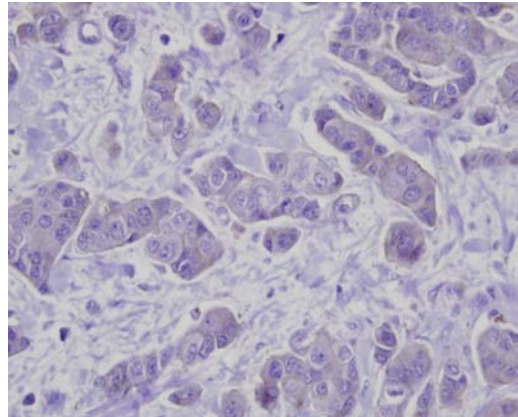


# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2-Glyo-Fixx

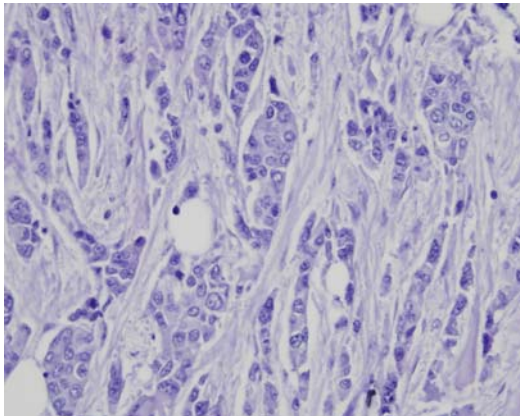
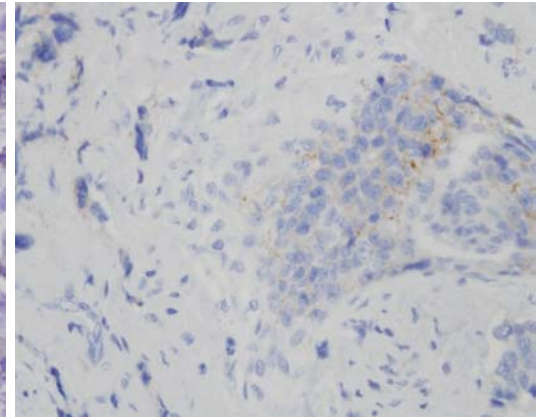
Sans PT – clone CB11  
Automatisé



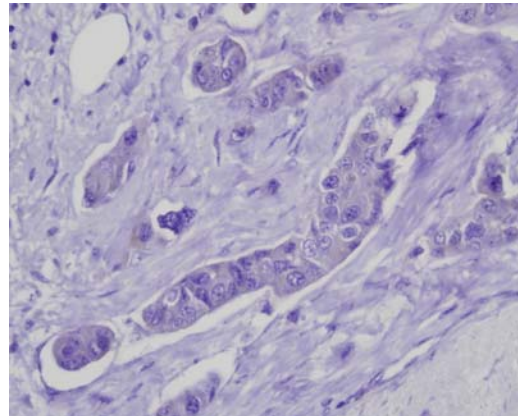
PT 30', pH7– clone CB11  
Automatisé



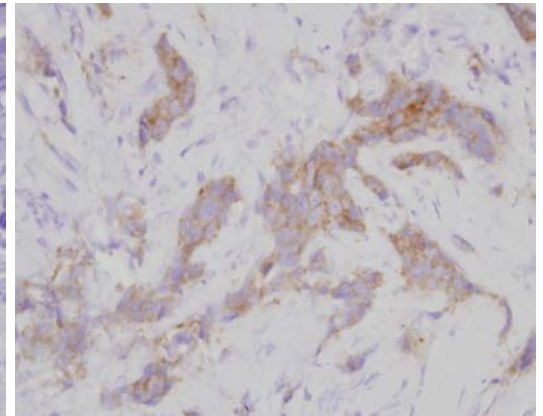
PT 30', pH6– clone CB11  
Manuel



Sans PT – clone 4B5  
Automatisé



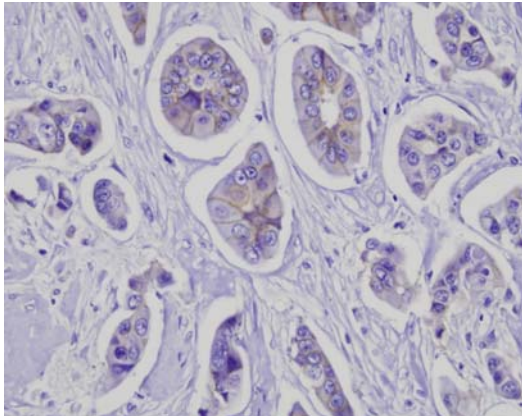
PT 30', pH7– clone 4B5  
Automatisé



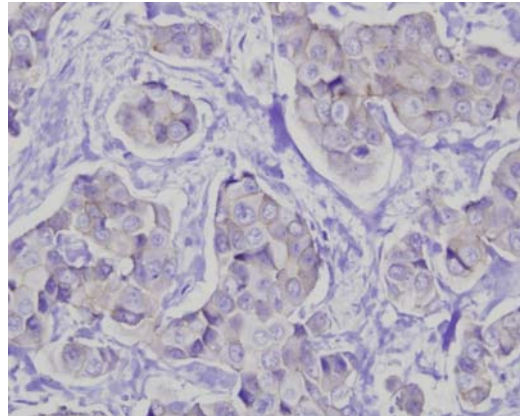
PT 30', pH6– clone 4B5  
Automatisé

# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2-Xp Fix

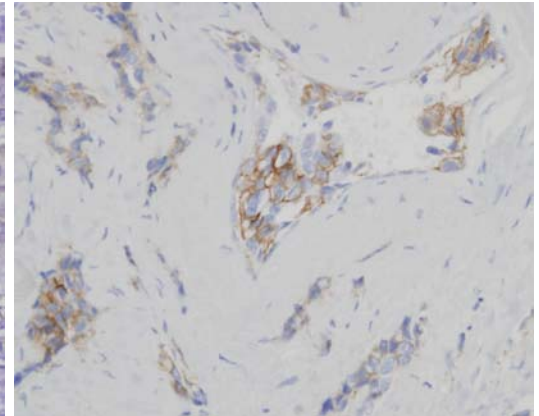
Sans PT – clone CB11  
Automatisé



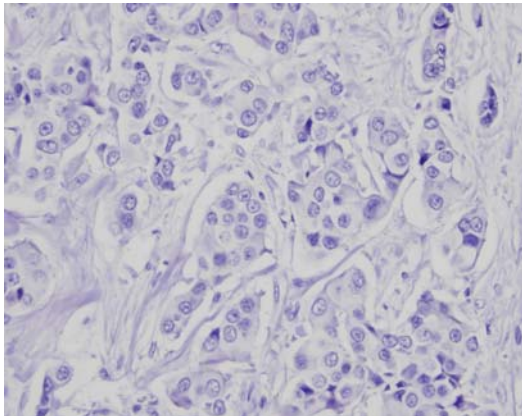
PT 30', pH7– clone CB11  
Automatisé



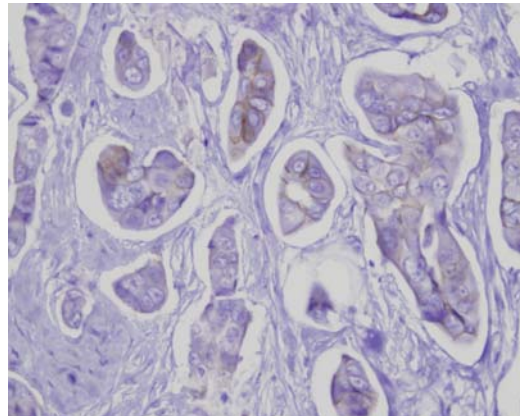
PT 30', pH6– clone CB11  
Manuel



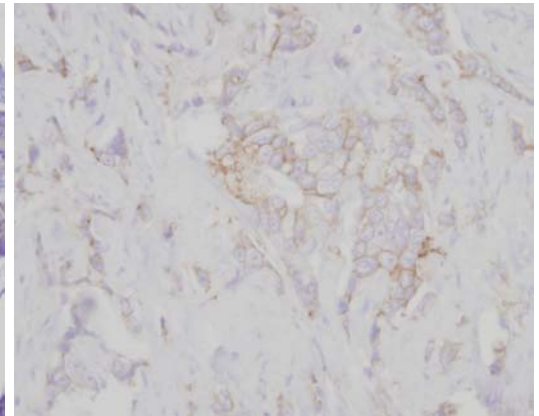
Sans PT – clone 4B5  
Automatisé



PT 30', pH7– clone 4B5  
Automatisé



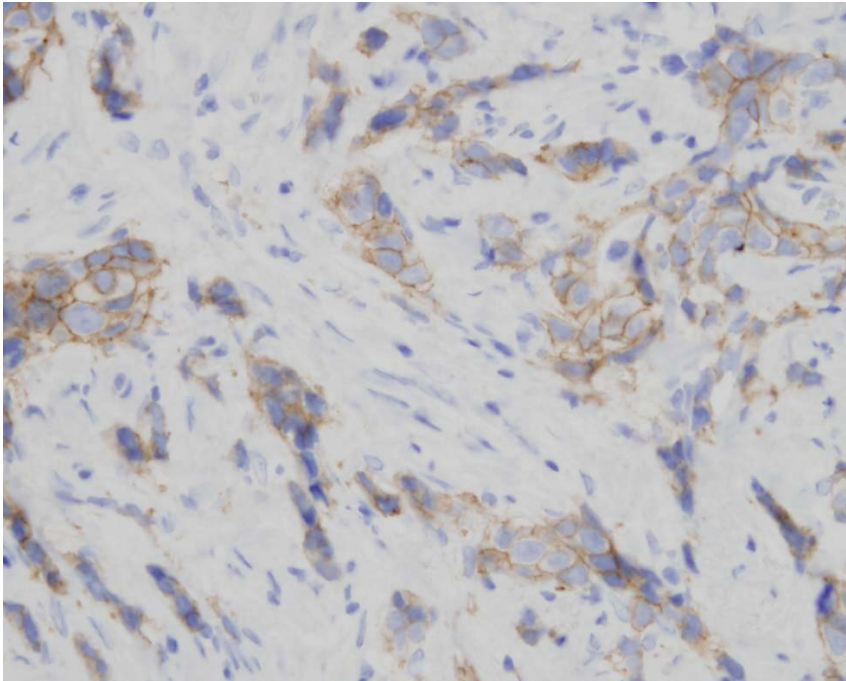
PT 30', pH6– clone 4B5  
Automatisé



# Anticorps “difficiles”: Her2

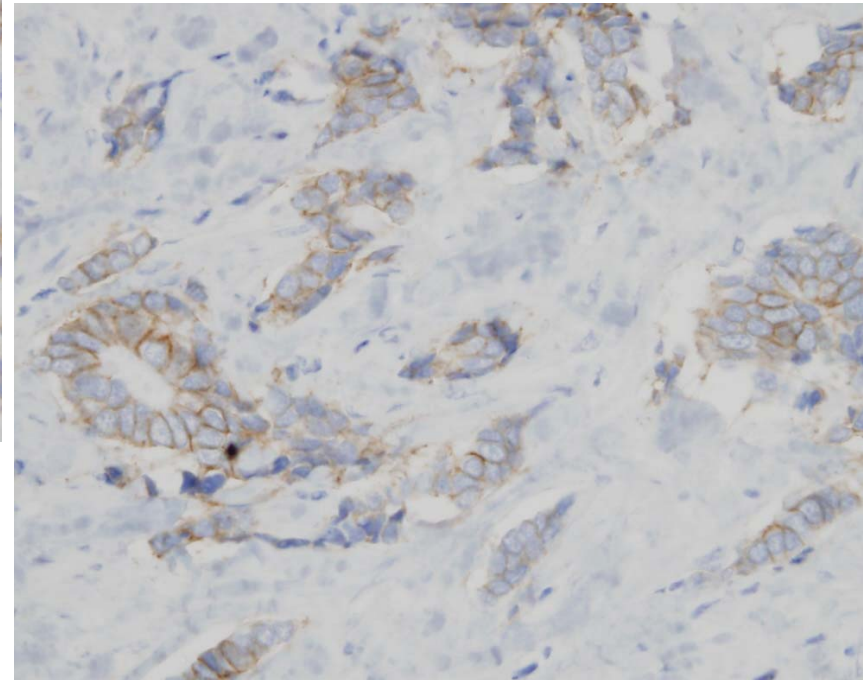
Prétraitement 30min, pH6, clone CB11 (1/100e),

**Formol**



Comparaison des résultats  
par transfert du protocole  
formol non modifié

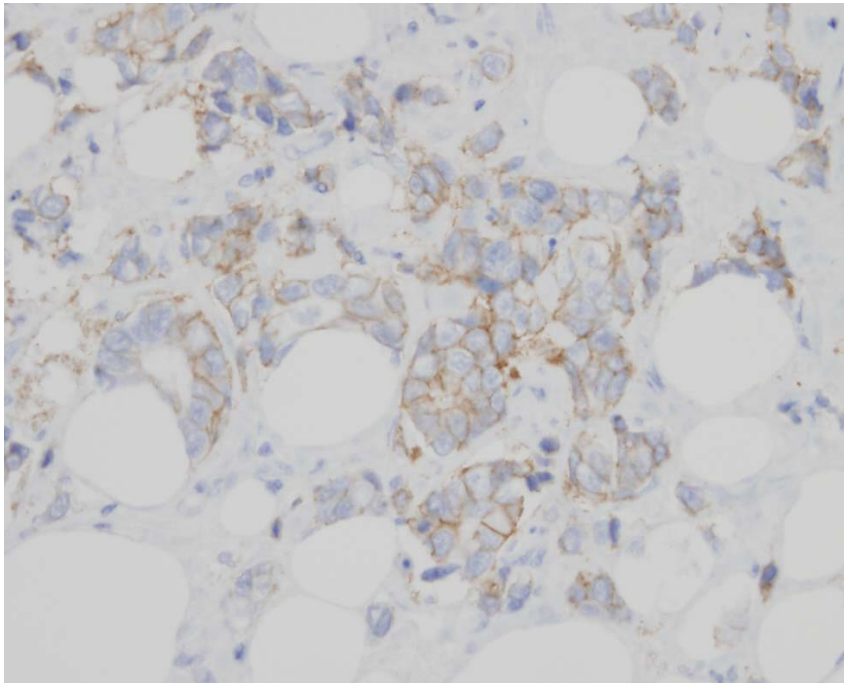
**Rcl2**



# Anticorps “difficiles”: Her2

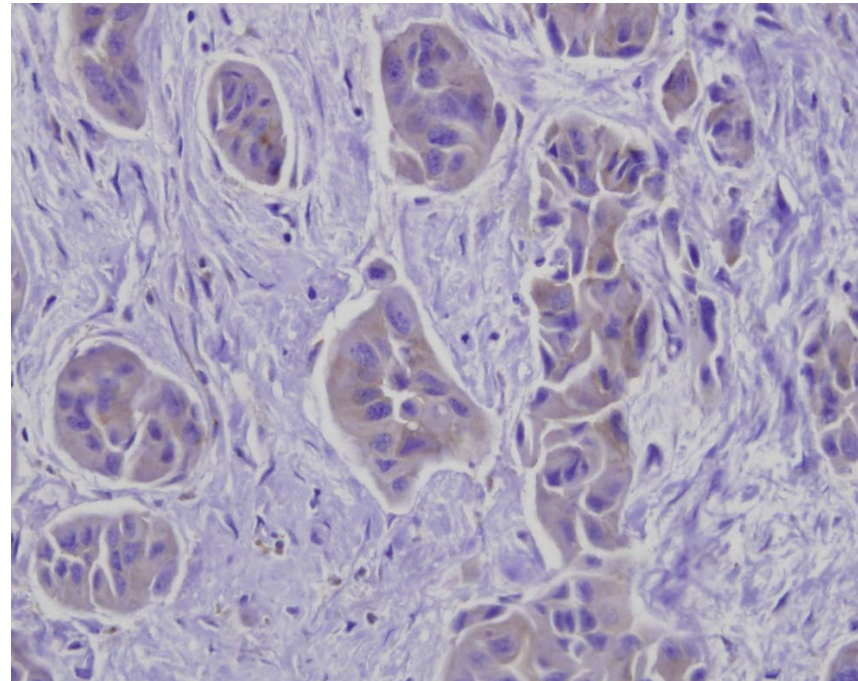
Prétraitement 30min, pH6, clone CB11 (1/100e)

**Hydrosafe**



Comparaison des résultats  
par transfert du protocole  
formol non modifié

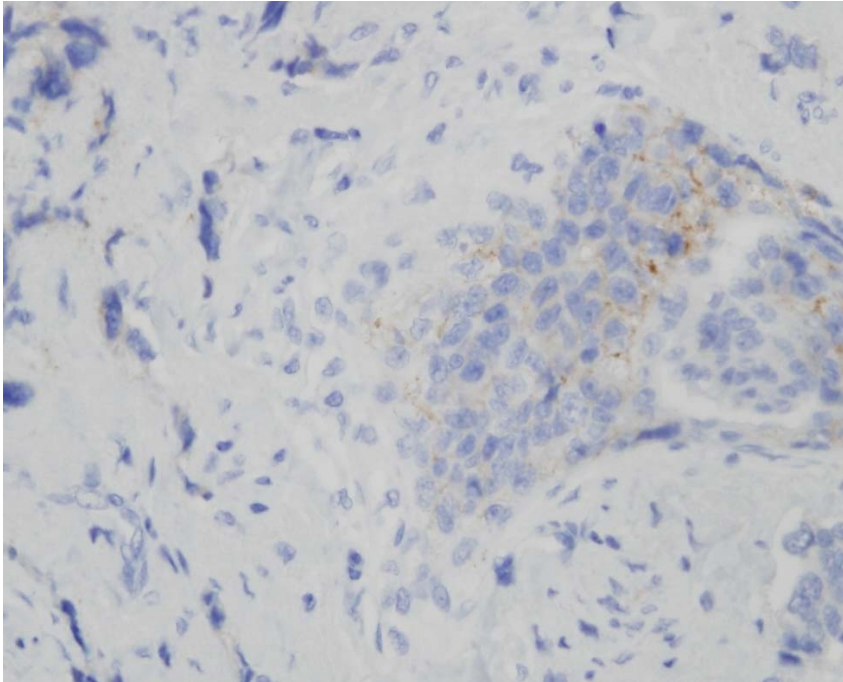
**Excell**



# Anticorps “difficiles”: Her2

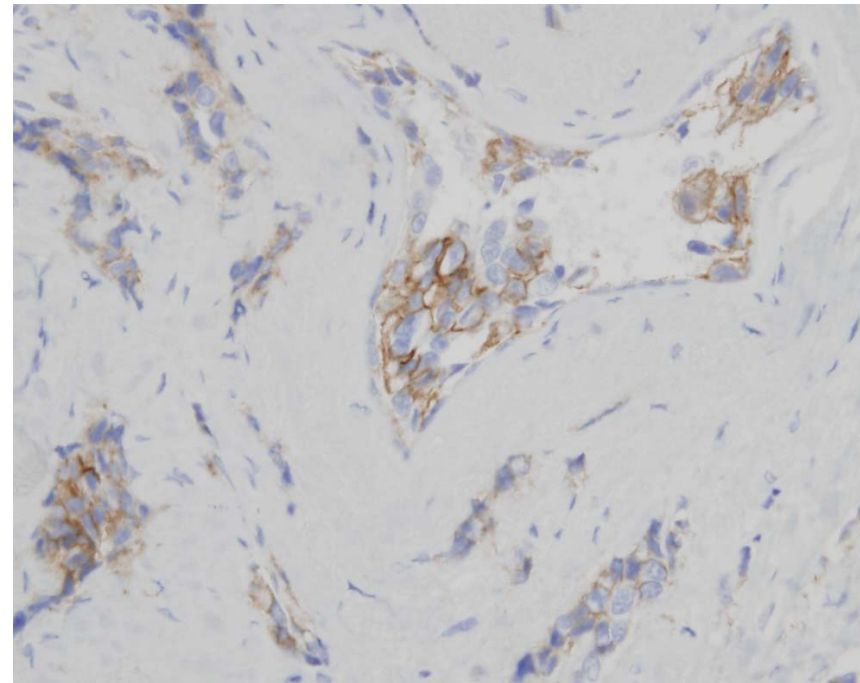
Prétraitement 30min, pH6, clone CB11 (1/100e)

**Glyo-Fixx**



Comparaison des résultats  
par transfert du protocole  
formol non modifié

**Xp Fix**



# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2

- Les résultats ont été synthétisés dans le tableau suivant, sans “scoring” Her2. Les résultats ont simplement été classés en:
  - Coloration membranaire négative (-)
  - Présence d’une coloration membranaire faible (+/-)
  - Coloration membranaire acceptable (+)

Fixateur	Pas de PT, clone CB11, Autom.	PT 30' pH7, clone CB11, Autom.	PT 30' pH6, clone CB11, Manuel.	Pas de PT, clone 4B5, Autom.	PT 30' pH7, clone 4B5, Autom.	PT 30' pH6, clone 4B5, Autom.
Formol	-	+	+	-	+	+
Rcl2	-	+/-	+	-	-	+
Hydrosafe	+	+	+	-	+/-	+
Excell	-	-	-	-	-	-
Glyo-Fixx	-	+/-	+/- (granuleux)	-	-	+/- (granuleux)
Xp Fix	+	+	+	-	+	+

# Anticorps “difficiles” – Ex : Her2

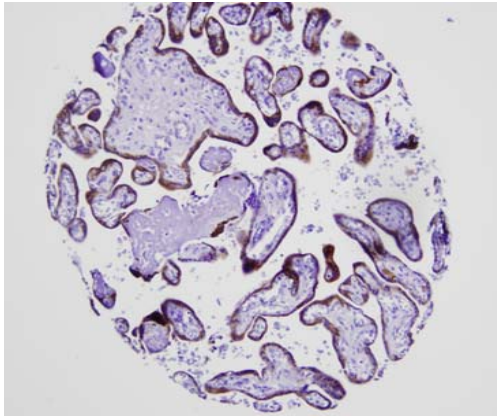
- Les résultats Her2 sont très disparates, et les substituts réagissent très variablement au changement de pH, de clone et à la durée du prétraitement.
- Ces résultats sont assez représentatifs, dans leur disparité, de ce qui est obtenu pour d'autres anticorps “difficiles”  
→ il n'y a aucune généralisation possible

# Les Anticorps “difficiles”

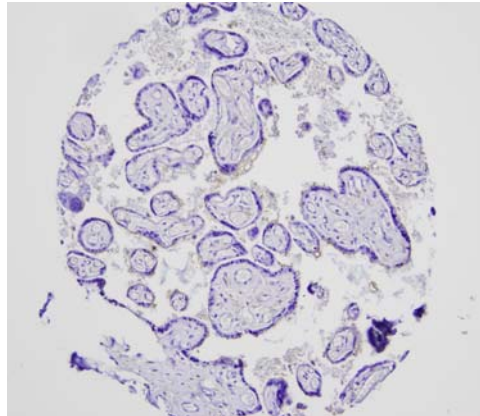
... ne sont pas toujours ceux qu'on croit...

**Résultats obtenus pour KL1.  
Sans prétraitement, dilution 1/50**

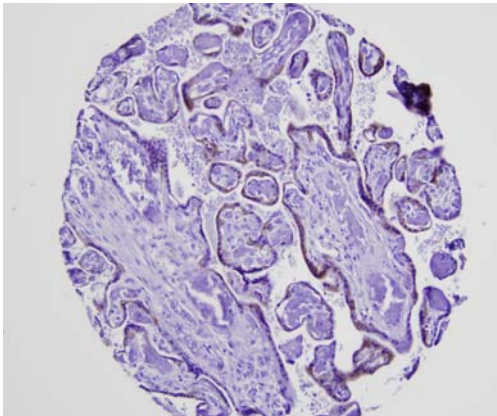
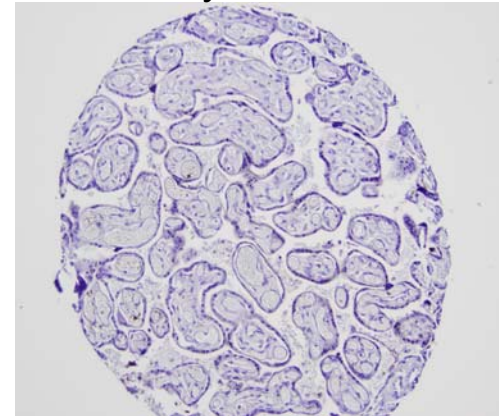
Formol



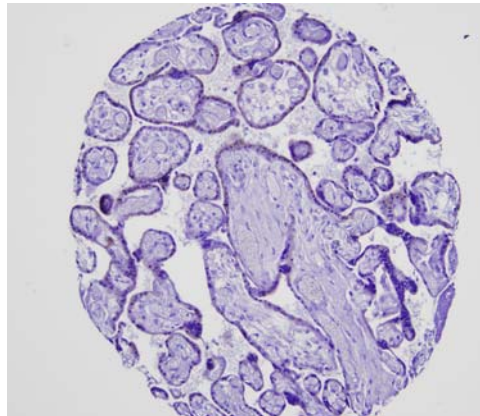
Rcl2



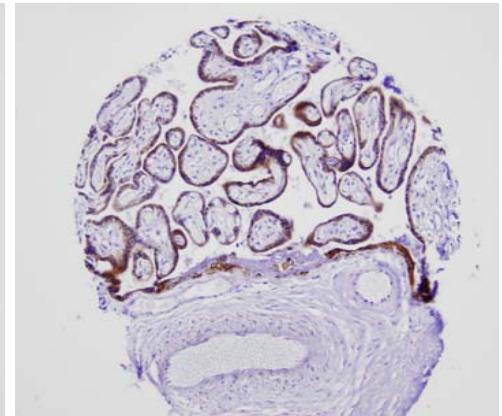
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



Xp Fix

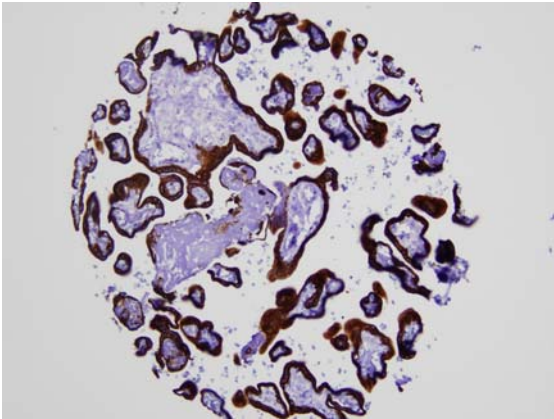


# Les Anticorps “difficiles”

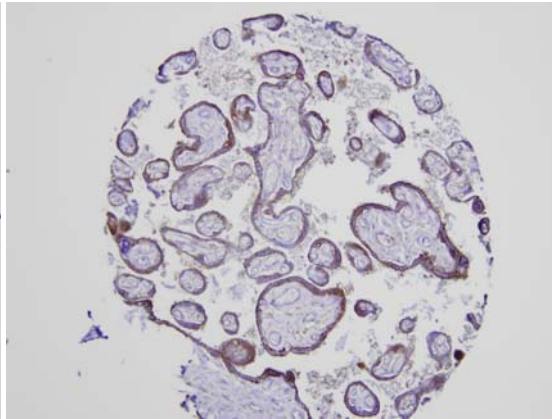
... ne sont pas toujours ceux qu'on croit...

**Résultats obtenus pour KL1.  
Avec prétraitement 30min, pH7, dilution 1/50**

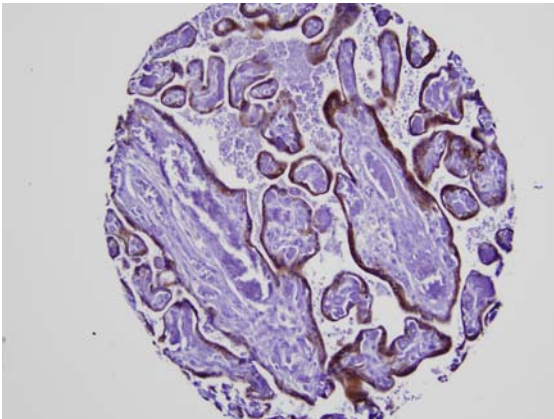
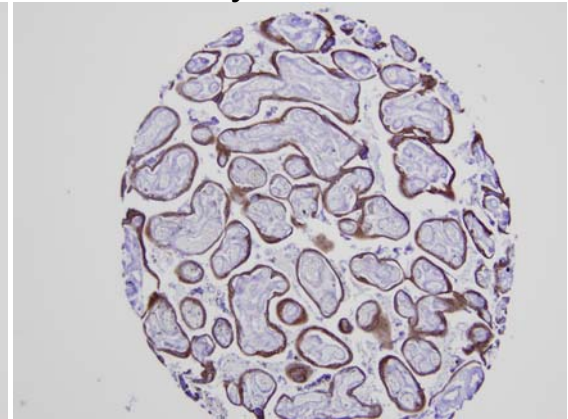
Formol



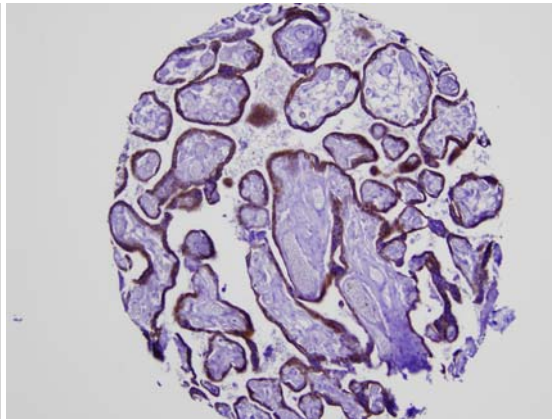
Rcl2



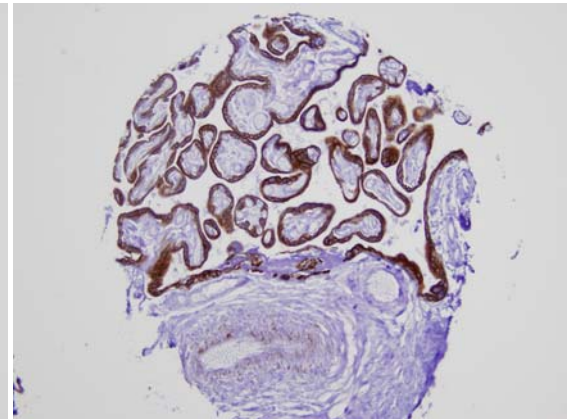
Hydrosafe



Excell



Glyo-Fixx



Xp Fix

# IHC : conclusion

- La combinaison Substitut/IHC nécessite de:
  - Revoir les enzymes ou tampons de prétraitement utilisés
    - Formulation du tampon (citrate, Tris...) ?
    - pH du tampon; nécessité de pH extrêmes (pH2, pH10) pour certaines combinaisons substituts/tampons ?
  - Revoir les “fenêtres de temps” de prétraitement
  - Sélectionner d’autres clones ?

**Il faut “oublier” ses réflexes  
et “réinventer” l’IHC pour environ 20% des anticorps  
(et ces anticorps sont différents  
d’un substitut à l’autre)**

# Résultats – Utilisation en SISH

- En cours d'étude
- Les données préliminaires montrent :
  - des résultats prometteurs en SISH Chr17/Her2 pour : Xpress Fix, Excell, Glyo-Fixx
  - peu ou pas de résultats concluants obtenus à ce jour sur : Rcl2, Hydrosafe

# Résultats moléculaires - ADN

Organe	fixateur	conc µg/µl	volume éluat	qué totale en mg
Foie	formol	25	100	2.5
Foie	rcl2	94	100	9.4
Foie	hydro	118	100	11.8
Foie	excel	23	100	2.3
Foie	glyo	70	100	7.0
Foie	xp	38	100	3.8
Rein	formol	34	100	3.4
Rein	rcl2	165	100	16.5
Rein	hydro	190	100	19.0
Rein	excel	11	100	1.1
Rein	glyo	87	100	8.7
Rein	xp	84	100	8.4
Rate	formol	283	100	28.3
Rate	rcl2	11	100	1.1
Rate	hydro	171	100	17.1
Rate	excel	67	100	6.7
Rate	glyo	70	100	7.0
Rate	xp	109	100	10.9
Côlon	formol	33	100	3.3
Côlon	rcl2	70	100	7.0
Côlon	hydro	101	100	10.1
Côlon	excel	26	100	2.6
Côlon	glyo	80	100	8.0
Côlon	xp	55	100	5.5

- Résultats moléculaires
  - Extraction d'ADN, kit Qiagen (spécial FFPE)
    - À partir de 4 coupes/tube, épaisseur totale de 40µm

Fixateur	Qté totale extraite, tous organes confondus (mg)
Hydrosafe	58.0
Formol	37.5
Rcl2	34.0
Glyo	30.7
Xpress Fix	28.6
Excell	12.7

# Résultats moléculaires - ADN

- Un système modèle a été utilisé pour tester l'intégrité de l'ADN extrait: la puce "HEA" (Human Erythrocyte Antigen) destiné classiquement au génotypage des groupes sanguins mineurs ( [www.bioarrays.com](http://www.bioarrays.com) )
- Le système est basé sur le principe d'une élongation de sonde, permettant de détecter le type de SNP impliqué
- Les amplicons amplifiés par PCR multiplex représentent des fragments d'ADN allant de 90 à 390 paires de base
- Chaque échantillon est testé pour 16 amplicons différents, représentant un total de 64 amplicons analysés par substitut

# Résultats moléculaires - ADN

- Exemple de résultats obtenus : les sigles « \*\*LS » ou « \*\*IC » indiquent que l'amplicon n'est pas analysable

ChipName	Sample	Substitut	WarnMsg	c	e	E	K	k	JK <sup>a</sup>	JK <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Di <sup>a</sup>	Di <sup>b</sup>
HEA08011_1	31011 F	Formol	LS(2),IC(3)	+	+	**IC	+	+	**IC	+	0	+	0	+	0	+	+	+	**LS	**LS
HEA08012_1	31025 F	Formol	LS(2),IC(1)	+	**LS	**LS	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	+
HEA08162_1	31031 F	Formol	LS(2),IC(2)	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	**IC	+	**LS	**LS
HEA08163_1	31128 F	Formol	LS(9)	**LS	**LS	**LS	0	+	+	+	+	+	+	+	**LS	**LS	0	+	**LS	**LS

Substitut	% d'amplicons non analysables
Formol	14.7
Excell	6.9
Glyo-Fixx	2.6
Hydrosafe	0.9
Xp Fix	0.9
Rcl2	0.0

A base d'aldéhyde (Formol, Excell, Glyo-Fixx)  
 Sans aldéhyde (Hydrosafe, Xp Fix, Rcl2)

Observation:

**Les organes fixés en substituts à base d'aldéhyde produisent de l'ADN plus fragmenté, et donc moins adapté à l'analyse par PCR multiplex**

# Résultats moléculaires - ARN

Organe	Fixateur	conc µg/µl	volume éluat	qué ARN totale en mg
Foie	Formol	432	18	7.8
Foie	Rcl2	220	18	4.0
Foie	Hydro	328	18	5.9
Foie	Excel	278	18	5.0
Foie	Glyo	350	18	6.3
Foie	Xpress Fix	242	18	4.4
Tumeur rein	Formol	190	18	3.4
Tumeur rein	Rcl2	152	18	2.7
Tumeur rein	Hydro	363	18	6.5
Tumeur rein	Excel	285	18	5.1
Tumeur rein	Glyo	231	18	4.2
Tumeur rein	Xpress Fix	206	18	3.7
Rate	Formol	176	18	3.2
Rate	Rcl2	482	18	8.7
Rate	Hydro	227	18	4.1
Rate	Excel	306	18	5.5
Rate	Glyo	214	18	3.9
Rate	Xpress Fix	175	18	3.2
Côlon	Formol	184	18	3.3
Côlon	Rcl2	110	18	2.0
Côlon	Hydro	138	18	2.5
Côlon	Excel	75	18	1.4
Côlon	Glyo	124	18	2.2
Côlon	Xpress Fix	96	18	1.7

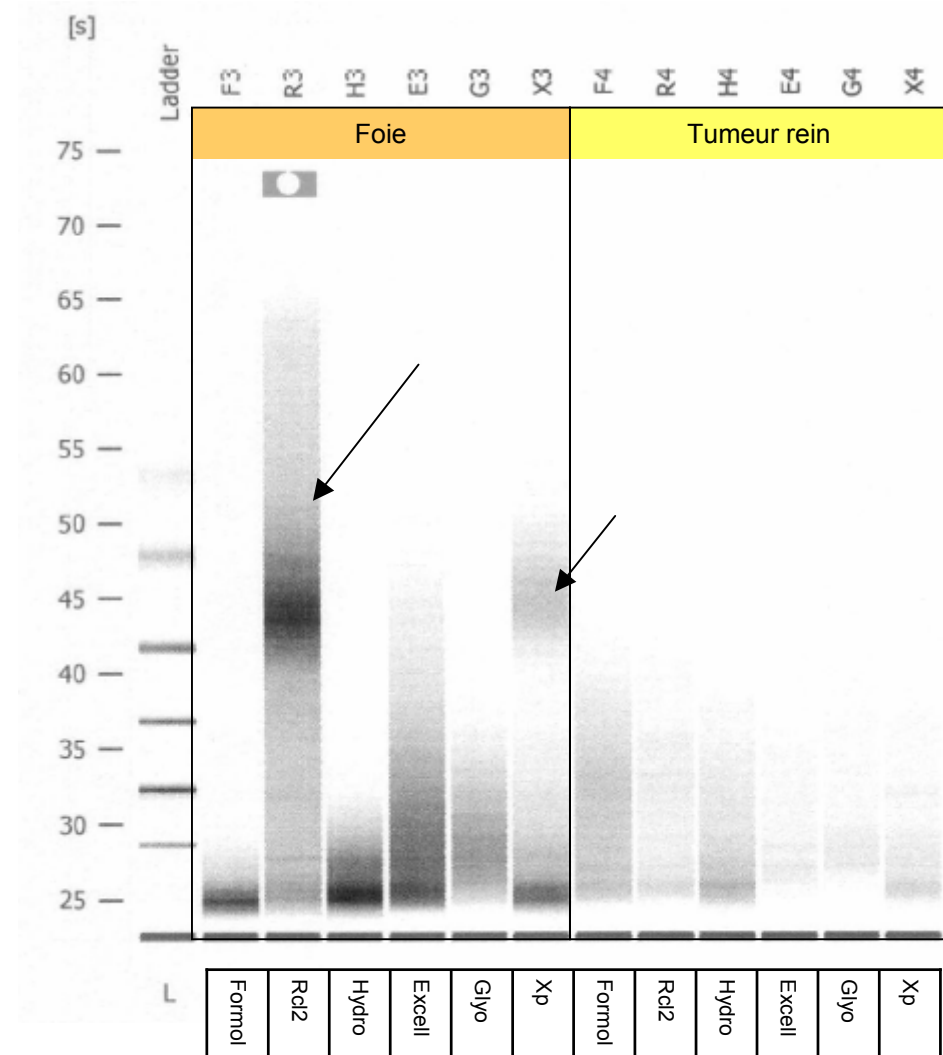
- Extraction d'ARN, kit Qiagen (spécial FFPE)
  - À partir de 4 coupes/tube, épaisseur 10µm

	Qté totale ARN extraite, tous organes confondus (mg)
Hydrosafe	19.0
Formol	17.7
Rcl2	17.4
Excel	17.0
Glyo	16.5
Xpress	12.9

# Résultats moléculaires - ARN

## Observation:

- Les profils obtenus sur Agilent montrent un ARN très dégradé dans la plupart des extractions
- Seuls 2 échantillons sur 24 (flèches) présentent un profil montrant la présence de fragments d'ARN de taille "acceptable"





# Résultats moléculaires : conclusion

- Ces résultats sont à prendre avec précaution
- L'étude a été “superficielle”, utilisant un seul type de kit d'extraction – pour FFPE (**Formalin Fixed, Paraffin Embedded**).
  - Tester d'autres méthodes ?
- Pas de différence notoire entre les substituts à l'exception:
  - d'Excell qui donne un mauvais rendement en quantité d'ADN extrait
  - de Rcl2 et Xp Fix qui donnent une qualité d'ARN légèrement supérieure à celle des autres substituts

# Observations & Réflexions

- Difficultés rencontrées:
  - Les différences entre substituts, pour un même anticorps, dépendent de l'organe testé – problème de pénétration ?
    - IHC sur le colon + permissif – peu de différences observées entre substituts, quelque soit l'anticorps
  - Démasquage antigénique (Micro-ondes ou Enzymes) affecte + facilement la morphologie des substituts (exception: Excell)
  - Une telle étude nécessite d'étudier de multiples prélèvements/organes: mise en oeuvre de tissus-arrays (possible dans tous les labos?)
    - Défaut des tissus-arrays: carottes se décolle + facilement (sein +++), échantillon pas toujours représentatif
  - Implication des facteurs extérieurs au substitut ? (Importance du protocole de déshydratation ? Autres paramètres ?)

# Observations & Réflexions

- Autres considérations
  - Adéquation des automates commerciaux de colorations spéciales ou d'immunohistochimie ?
    - Automates développés et validés sur tissus FFPE
      - Flexibilité des protocoles disponibles pas toujours adaptée
      - Présence de détergents ( $\pm$  délétères aux tissus “sous-fixés”)
    - Certains automates plus adaptés à certains substituts ? Etude préliminaire réalisée sur Ventana – mêmes conclusions sur Vision, Dako ?
  - Clones d'anticorps disponibles sur le marché:
    - Sélectionnés pour la reconnaissance optimale d'antigènes fixés au formol
    - Validés et marqués CE pour utilisation sur tissus congelés ou FFPE
    - Peu de clones disponibles pour certains anticorps (TTF1) – que faire en cas de résultats négatifs si pas d'autres clones disponibles ?

# Observations & Réflexions

- Implications “légales”: dans le cadre d’une certification, il n’est pas possible d’utiliser des réactifs ou procédures validés pour une application donnée (“intended use”), pour d’autres applications, sans validation extensive à la charge du laboratoire
  - Tous les anticorps devraient être vérifiés par coloration d’un “tour of the body”, pour vérifier de l’absence de cross-réactivité inconnue dans ce nouveau contexte de fixation (le “tour of the body” est une procédure de validation classique à la FDA)
  - Validation des anticorps à visée pronostique: étude d’équivalence
    - % de noyaux/cytoplasme/membranes marqués
    - Intensité de marquage
    - Nombre de cas présentant une positivité (ex: Her2)

# Observations & Réflexions

- Les fixateurs à base de glyoxal produisent des préparations au comportement proche de celui du formol
  - Moins de travail d'adaptation, même si le résultat n'est pas garanti (difficulté avec Her2, TTF-1...)
  - Toxicité inférieure à celle du formol, mais présente

Produit	Glyoxal	Formol
VL exp (USA)	0,1 mg/m <sup>3</sup>	0,37 mg/m <sup>3</sup>
Tension de vapeur	2,4 kPa à 20°C	517 kPa à 20°C

*Malgré une valeur limite d'exposition inférieure à celle du formol, le glyoxal devrait être, à concentration aqueuse égale, beaucoup moins toxique car beaucoup moins volatile.*

- Les fixateurs moléculaires (souvent à base d'alcool) produisent des préparations avec une morphologie plus éloignée du formol
  - Demandent un travail d'adaptation plus long
  - Toxicité nulle
  - Plus adaptés aux analyses moléculaires

# Conclusion (1)

- Substituer aujourd'hui =
  - S'engager dans l'inconnu au niveau de la quantité de travail requis pour réadapter tous ses protocoles
  - Prendre des risques importants de faux diagnostics (TTF-1) ou de diagnostics incomplets (HER2)
  - Ne recevoir que peu de support technique et scientifique : les publications et les banques de données industrielles sont basées sur "l'expérience formol"

# Conclusion (2)

- Comment avancer dans la démarche de substitution ? :
  - Obtenir les résultats de tous les sites ayant une expérience importante dans le domaine, en France et à l'international.
  - Rechercher le soutien des fabricants (substituts, IHC, ISH) et des organismes de santé gouvernementaux.
  - Engager une étude complémentaire nationale, avec une méthodologie rigoureuse et inattaquable. Un tel travail demanderait au moins 2 ans de travail avec une équipe dédiée et devrait être validé internationalement.