

R É S U M É

ÉVALUATION ET STANDARDISATION DES MÉTHODES UTILISÉES POUR LA CRÉATION DE PRÉPARATIONS HISTOLOGIQUES MULTIPLEX TISSUE MICROARRAY

Doctorant: ȘTEFAN Alina Elena

Coordinateur scientifique: *Prof. univ. Dr. MILITARU Manuella*

MOTS-CLÉS: BxChip™, BxFrame™, diagnostic clinique, histologie, matériau biomimétique, matrices sectionnables, microréseau tissulaire

La technique de multiplexage de plusieurs blocs de paraffine "donneur" dans un seul bloc de paraffine "récepteur" est appelée "tissue microarray" (TMA). Le but de l'utilisation de cette technique de multiplexage était de comparer plusieurs tissus différents sur une seule lame histologique de manière rentable, en économisant du travail et en réduisant les consommables, en garantissant les avantages de conditions de coloration identiques pour tous les échantillons insérés et la possibilité de tracer facilement l'identité de chaque spécimen. Le nombre d'échantillons pouvant être multiplexés dans un même bloc de paraffine receveur peut varier entre 2 et 10 000, et leur taille entre 0,1 mm et 5 mm. Les échantillons qui peuvent être multiplexés dans une MAT sont: les cellules (provenant d'épanchements), les lignées cellulaires et les tissus (biopsies au trocart à partir d'aiguilles de biopsie ou d'échantillons de résection).

Les coupes histologiques issues des blocs de paraffine TMA sont utilisées dans de nombreuses catégories d'analyses (immunohistochimie, hybridation in situ, histochimie, etc.) et ont prouvé dans de multiples tests que ces puces sont représentatives des tissus des blocs donneurs même s'ils sont de petite taille. La technique est à la base d'expérimentations dans différents domaines de recherche car les résultats obtenus peuvent être transmis à des applications cliniques.

Les méthodes internationales actuelles d'obtention de blocs de paraffine TMA utilisent exclusivement des blocs de paraffine donneurs collectés dans des hôpitaux ou des centres de recherche, et les domaines d'intérêt sont souvent des fragments cylindriques inclus en paraffine. La technique d'obtention des blocs de paraffine TMA est difficile, lente et souvent les blocs de paraffine du donneur sont compromis. Pour fusionner des fragments cylindriques avec de la paraffine dans le bloc récepteur, l'assemblage créé doit être chauffé et refroidi à plusieurs reprises, et ce processus peut dégrader les cibles moléculaires d'intérêt. Les blocs donneurs utilisés pour obtenir des préparations de TMA ayant une très grande variabilité des méthodes pré-analytiques, l'efficacité des diagnostics obtenus est très faible. Par conséquent, il serait optimal que les tissus d'intérêt soient multiplexés avant les processus histologiques.

LA PREMIÈRE PARTIE DE LA THÈSE est représentée par l'**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**, rédigée en 40 pages environ et comprend les sujets cibles suivants : généralités et applications de la technique TMA (**CHAPITRE I**), techniques d'obtention de blocs TMA (**CHAPITRE II**) et immunohistochimie appliquée à TMA (**CHAPITRE III**).

Le **chapitre I** décrit la méthode conventionnelle où des échantillons de tissus sont extraits de blocs de paraffine "donneur" archivés (jusqu'à 1000 blocs différents) puis insérés dans un bloc de paraffine "receveur". Ce chapitre décrit également le modèle matriciel dans lequel les fragments de tissus sont disposés, ce qui a permis la traçabilité des données cliniques jusqu'aux tissus individuels, les types de MAT sont classés (MAT de tissus normaux, MAT de tissus expérimentaux, MAT progressive, etc.), sont détaillés les aspects qualitatifs sous-

jacents à une MAT (la qualité du tissu, le diagnostic pathologique, la qualité de la procédure expérimentale, la qualité des données cliniques) ainsi que la représentativité de la technique (la taille de la pièce retirée du bloc donneur, le nombre de fragments de tissus nécessaires pour construire une TMA, le diamètre optimal pour un fragment de tissu prélevé dans un bloc donneur, etc.).

Le **chapitre II** détaille les méthodes les plus importantes et les plus différentes pour la construction de TMA dans l'ordre chronologique. En 2014, Ulrich Vogel a centralisé toutes ces méthodes, en commençant par la première description d'une TMA en 1965 et en terminant par la mention de cinq techniques différentes pour obtenir une TMA en 2013. La technique TMA la plus souvent mentionnée dans l'histoire de l'obtention de TMA est celle utilisée par H. Battifora, en 1986, qui a obtenu un bloc de tissus multitu-moraux pour tester de nouveaux anticorps pour l'immunohistochimie. À la fin du chapitre, une nouvelle technique d'obtention de MAT est décrite, mais pour la première fois dans l'histoire de la technique, elle a une applicabilité exclusive dans l'obtention de diagnostics cliniques. Cette technique repose sur une matrice sectionnable (BxChip™) composée d'un matériau biomimétique aux propriétés modulables spécialement conçu pour le multiplexage des biopsies de petits diamètres cylindriques (20G, 18G, 16G, 14G, 12G, etc.) évitant leur fragmentation ou leur perte lors de la processus histologique.

Le **chapitre III** expose la méthodologie standard de la technique d'immunohistochimie et précise les facteurs potentiels pouvant compromettre la qualité de la coloration : facteurs tissulaires (fixation, traitement), facteurs dépendants des solvants et réactifs (température, solutions tampons et diluants), facteurs procéduraux (conditions de conservation des blocs de paraffine et des lames histologiques).

LA DEUXIÈME PARTIE DE LA THÈSE est représentée par **PROPRE RECHERCHE** et commence par le but général et les objectifs proposés, suivis de quatre chapitres : les caractéristiques du matériau sectionnable (**CHAPITRE IV**), la matrice biomimétique BxFrame™ (**CHAPITRE V**), l'utilité comparative et les techniques de coloration histo-chimique (**CHAPITRE VI**), la puce biomimétique BxChip™ (**CHAPITRE VII**).

Le **chapitre IV** développe les expérimentations réalisées sur le matériau biomimétique suite à la résistance de 15 matériaux sectionnables de consistances différentes en les immergeant dans différentes solutions de décalcification couramment utilisées dans les laboratoires de pathologie (acide formique 10%, acide chlorhydrique 5% et EDTA 10%) et en les soumettant à leurs tests de rhéologie. Après avoir terminé les périodes d'immersion dans les solutions de décalcification, les matériaux sont traités histologiquement avec un protocole de déshydratation de 9 heures, en étant comparés dans le même protocole avec d'autres tissus : rate, foie, peau, cerveau, rein, cœur et poumon. Les résultats sont délimités par l'application de qualifications (Très bon, Bon, Suffisant et Insuffisant). Toujours dans ce chapitre, la préservation structurale des 15 matériaux biomimétiques est suivie en les soumettant à des protocoles de déshydratation de durées différentes (Protocole 1 – 4h30min, Protocole 2 – 5h50min, Protocole 3 – 7h, Protocole 4 – 9h, Protocole 5 – 13h) . Le rétrécissement des matériaux est observé en les mesurant en longueur, largeur et hauteur avant et après la réalisation des processus de déshydratation.

Le **chapitre V** vise à développer une nouvelle matrice sectionnable, BxFrame™, pour multiplexer des tissus de formes irrégulières de différentes tailles. Dans le premier sous-chapitre, 7 modèles de matrices rectangulaires d'une épaisseur allant jusqu'à 3 mm sont testés, ayant des puits pré-réglés de différentes formes (puits carrés, ronds, hexagonaux) tous numérotés pour améliorer la traçabilité des tissus. Ces matrices sont testées avec des tissus de porc (rein, foie, cœur et peau). Grâce à cette expérience aux résultats prometteurs, un modèle unique est établi, le BxFrame™ GRID, matrice sectionnable de type mesh accompagnée d'une base perforée du même matériau pour supporter le chargement des biopsies. Dans le deuxième sous-chapitre l'efficacité apportée par BxFrame™ en termes de temps et de coûts de consommables par la méthode de multiplexage par rapport à un procédé histologique usuel est démontrée. Les tests sont réalisés sur un nombre limité de tissus : queue, intestin, cerveau et cœur de souris C57BL/6, peau de porc domestique. La nouvelle méthode de multiplexage réduit de trois fois le temps de travail requis pour le même nombre de biopsies par rapport à la méthode conventionnelle, et les coûts peuvent être réduits jusqu'à 50 %.

Le **chapitre VI** présente le test et l'utilisation des matrices BxFrame™ dans deux états différents au cours du processus histologique : brutes, fixées au formol à 4 % et pré-déshydratées (selon un protocole de déshydratation lente) et incluses en paraffine. Le but de cette expérience est de déterminer les avantages possibles de l'utilisation de tableaux en fonction du stade du processus histologique de multiplexage tissulaire. L'expérience est réalisée sur des queues de souris albinos et décrite dans la première sous-section. Les tests de trois colorants histochimiques (hématoxyline-éosine, safranine et Fast Green, rouge pricosirius) sur des coupes de matrice sont présentés dans la deuxième sous-section. Dans le sous-chapitre trois, le rôle des matrices sectionnables dans le domaine pédagogique est mis en évidence, un projet réalisé avec l'aide du Département d'Anatomie Pathologique de la Faculté de Médecine Vétérinaire. Ce projet a été réalisé avec des blocs de paraffine de donneurs de rein pour créer des matrices éducatives de TMA.

Le dernier chapitre de la thèse, le **chapitre VII**, est représenté par la matrice sectionnelle BxChip™ et est composé de deux sous-chapitres. Dans le premier sous-chapitre, l'augmentation du rendement diagnostique est prouvée grâce à l'utilisation de la matrice mentionnée précédemment, à travers une étude réalisée à l'hôpital clinique "Prof. Dr Theodor Burghele" de Bucarest. Pour 24 patients, des biopsies ont été recueillies par la procédure TRUS (Transrectal Ultrasound), dont le processus histologique habituel a été effectué pour la première moitié des patients, dans lequel les biopsies ont été pliées dans du papier histologique mince et soumises au processus de déshydratation et infiltration à la paraffine, et pour la seconde moitié les biopsies ont été placées dans des puces BxChip™ suivant le même protocole de déshydratation et d'infiltration à la paraffine. Dans les deux catégories de patients, les biopsies récoltées ont été mesurées avant et après le processus de déshydratation (biopsies brutes, puis biopsies sur lames histologiques). L'étude est complétée par l'évocation des multiples avantages apportés par la matrice sectionnable BxChip™ et souligne que grâce à son utilisation les rendements diagnostiques augmentent d'au moins 10% par rapport à la méthode conventionnelle. Le deuxième sous-chapitre offre une nouvelle perspective dans l'histoire de la MAT, à savoir que le multiplexage est et sera utilisé avec un grand intérêt en pathologie digitale. Cette sous-section décrit la puce BxChip™ ainsi que le logiciel de visionneuse de diapositives histologiques BxLink™. Grâce à la forme compacte de cette matrice, les techniciens de laboratoire peuvent appliquer trois sections de paraffine BxChip™ (représentant trois niveaux de profondeur dans le bloc de paraffine) sur des lames d'histologie. Les lames résultantes sont colorées avec des colorants histochimiques standard, puis numérisées pour être saisies sous forme d'images dans des systèmes informatiques. Une fois dans le système de stockage BxLink™, ils peuvent être facilement observés à l'aide de l'échelle de taille similaire aux objectifs de microscope et accessibles n'importe où et n'importe quand par des médecins spécialistes et des pathologistes pour déterminer les diagnostics.