



HAL
open science

Influence de la méthode de préparation de l'échantillon sur la structure histologique et la composition du muscle de truite

Valentine Vannaire, Thierry Astruc

► To cite this version:

Valentine Vannaire, Thierry Astruc. Influence de la méthode de préparation de l'échantillon sur la structure histologique et la composition du muscle de truite. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03822340


HAL Id: hal-03822340

<https://hal.inrae.fr/hal-03822340>

Submitted on 20 Oct 2022

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

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



Influence de la méthode de préparation de
l'échantillon sur la structure histologique et
la composition du muscle de truite

Ecole d'ingénieur SIGMA Clermont-Ferrand

20 avenue Blaise Pascal

63 178 Aubière

Responsable : ASTRUC Thierry

INRAE Unité « Qualité des Produits Animaux », INRAE, centre Clermont-Auvergne Rhône-Alpes

Route de Theix

63 122 Saint-Gènes-Champanelle

Valentine Vannaire

2A - ANNEE SCOLAIRE 2021-2022

Je tiens tout d'abord à remercier M. Thierry Astruc, mon maître de stage, qui m'a accueillie comme stagiaire dans son unité, pour le temps qu'il a consacré à mon projet et à ma formation. Je remercie également Annie Vérien et Christine Ravel, pour le savoir et leur savoir-faire, mais aussi pour leur disponibilité et leur entrain à me former.

J'adresse ensuite mes remerciements les plus sincères aux membres du CICS, sans qui les études histologiques auraient été bien compliquées.

Enfin, j'aimerais remercier l'ensemble du labo 4, avec qui l'intégration a été facile et toujours très agréable. Merci pour les moments partagés en pause qui sont tellement importants dans la cohésion d'une équipe.

Abréviation

ACP : analyse en composantes principales

EMSC : correction de diffusion multiplicative étendue

FA : formaldéhyde

FFPE : fixation dans le formol et inclusion dans la paraffine

FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Fourier transform infrared)

GA : glutaraldéhyde

GMA : méthacrylate de glycol

HES : hématoxyline – éosine – safran

IR : infrarouge

MO : microscopie optique

MSC : correction de diffusion multiplicative

OSC : correction orthogonale de la diffusion

PFA : paraformaldéhyde

Table des matières

Résumé.....	1
Introduction.....	2
L'institut.....	2
L'unité QuaPA.....	2
Le projet	2
Le stage.....	3
Matériels et méthodes.....	5
Matériel d'étude et réactifs	5
Poissons	5
Réactifs	6
Matériel et équipements.....	6
Préparation des échantillons.....	7
Exérèse	7
Identification échantillon	7
Préparation des échantillons.....	8
Acquisition des données.....	9
Prétraitement des données.....	9
Correction de la ligne de base	9
MSC.....	9
EMSC.....	10
Analyses statistiques	10
Résultats et discussion	11
MO.....	11
FTIR.....	13
Impact du fixateur	16
Impact de la paraffine	20
Impact du déparaffinage	23
Qu'est-ce qui est plus semblable à la cryofixation ?	25
Conclusion	29
Références.....	1
Annexes	2
Histologie.....	2
Inclusion en paraffine.....	2
Déparaffinage	2
Coloration.....	2

Déshydratation	3
ACP complètes, avec certaines composantes principales et variance expliquées.....	1
Impact du fixateur	1
Impact de la paraffine	14
Impact du déparaffinage	18

Table des illustrations

Figure 1 : Fixation par PFA.....	4
Figure 2 : Fixation par GA	5
Figure 3 : Préparation des filets	7
Figure 4 : Nomenclature des échantillons.....	7
Figure 5 : échantillons cryofixé (en haut à gauche), fixé au glutaraldéhyde et inclus en paraffine (en haut au milieu), fixé au glutaraldéhyde et cryofixés (en haut à droite), fixé au paraformaldéhyde et cryofixé (en bas à gauche) et fixé au paraformaldéhyde et inclus en paraffine (en bas au milieu), coloré au HES et observé au microscope optique grossissement x100	11
Figure 6 : spectre IR des différentes conditions (basé sur les moyennes de chaque point de tous les spectres après EMSC), comparé à un spectre de la paraffine pure.	13
Figure 7 : ACP des échantillons C (bleu), GC (rouge) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.	16
Figure 8 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zones des lipides (4) zone des protéines mais comparés aux échantillons C (bleu).	17
Figure 9 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) et C (bleu) sur (1) spectre complet (2) spectre des protéines (3) spectre complet mais regroupé en échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) (4) spectre des lipides.....	18
Figure 10 : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.	20
Figure 11 : ACP des échantillons GP (vert), GPd (gris) et GC (rouge) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.	21
Figure 12 : ACP des échantillons PP (gris) et PPd (rose) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.....	23
Figure 13 : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.	24
Figure 14 : ACP des échantillons C, PC, PPd, GC, GPd sur tout le spectre (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeaux, PPd en rose, GC en rouge et GPd en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge).....	26
Figure 15 : ACP des échantillons C, PC, PPd, GC, GPd sur la zone des protéines (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeaux, PPd en rose, GC en rouge et GPd en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge).....	27

Figure 16 : ACP des échantillons C, PC, PPd, GC, GPd sur la zone des lipides (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeau, PPd en rose, GC en rouge et GPd en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge).....	28
Figure 22 : ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 3 et variance expliquée.....	1
Figure 23 : ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre des protéines, composante principale 2, ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre des protéines et variance expliquée.....	2
Figure 24 : ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée.....	3
Figure 25 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre complet et variance expliquée.....	4
Figure 26 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre des protéines, composante principale 1, composante principale 3 et variance expliquée.....	5
Figure 27 : ACP des échantillons PP (gris), C (bleu) et GP (vert) sur spectre des protéines, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée.....	6
Figure 28 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 3 et variance expliquée.....	7
Figure 29 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée.....	8
Figure 30 : ACP des échantillons PPd (rose), C (bleu) et GPd (gris) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre complet et composante principale 3.....	9
Figure 31 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) sur spectre des protéines, composante principale 2, composante principale 4 et variance expliquée.....	10
Figure 32 : ACP des échantillons PPd (rose), C (bleu) et GPd (gris) sur spectre des protéines, composante principale 2, composante principale 3 et variance expliquée.....	11
Figure 33 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) sur spectre des lipides, composante principale 2, composante principale 4 et variance expliquée.....	12
Figure 34 : ACP des échantillons PPd (rose), C (bleu) et GPd (gris) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée.....	13
Figure 35 : ACP des échantillons PC (bordeaux), PP (gris) et PPd (rose) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre complet, composante principale 2.....	14
Figure 36 : ACP des échantillons PC (bordeaux), PP (gris) et PPd (rose) sur spectre des protéines, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre des protéines, variance expliquée.....	15
Figure 37 : ACP des échantillons GC (rouge), GP (vert) et GPd (gris) sur spectre complet, composante principale 2, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre complet, composante principale 3.....	16

Figure 38 : ACP des échantillons GC (rouge), GP (vert) et GPd (gris) sur spectre des protéines, composante principale 2, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre des protéines, composante principale 3.....	17
Figure 39 : ACP des échantillons PP (gris) et PPd (rose) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée.....	18
Figure 40 : ACP des échantillons PP (gris) et PPd (rose) sur spectre des protéines, composante principale 2, composante principale 3, variance expliquée	19
Figure 41 : ACP des échantillons PP (gris) et PPd (rose) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée	20
Figure 42 : ACP des échantillons PC (bordeaux), PP (gris) et PPd (rose) sur spectre des lipides, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre des lipides, composante principale 2.....	21
Figure 43 : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (gris) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée.....	22
Figure 44 : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (gris) sur spectre des protéines, composante principale 4, composante principale 5, variance expliquée.....	23
Figure 45 : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (gris) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée	24
Figure 46 : ACP des échantillons GC (rouge), GP (vert) et GPd (gris) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée.....	25
Figure 47 : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose), GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons déparaffinés (vert) et déparaffinés (rouge) sur spectre complet, ACP des échantillons PFA (vert) et GA (bleu) sur spectre complet.....	26
Figure 48 : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose), GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur spectre des protéines, composante principale 3, ACP des échantillons déparaffinés (vert) et déparaffinés (rouge) sur spectre des protéines, ACP des échantillons PFA (vert) et GA (bleu) sur spectre des protéines....	27
Figure 49 : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose), GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur spectre des lipides, composante principale 1, ACP des échantillons déparaffinés (vert) et déparaffinés (rouge) sur spectre des lipides, ACP des échantillons PFA (vert) et GA (bleu) sur spectre des lipides	28

Liste des tableaux

Tableau 1 : Echantillons utilisés.....	5
Tableau 2 : Mode opératoire de préparation des échantillons	8
Tableau 3 : Attribution des principaux pics des spectres présentés en figure 518.....	14
Tableau 4 : Programme utilisé par l'automate pour l'inclusion en paraffine	2
Tableau 5 : Bains à effectuer pour déparaffiner les échantillons	2
Tableau 6 : Bains à effectuer pour colorer les échantillons avec la coloration HES	2
Tableau 7 : Bains à effectuer pour colorer les échantillons avec la coloration Rouge Sirius	2
Tableau 8 : Bains à effectuer pour déshydrater les échantillons	3

Résumé

L'analyse structurale des tissus biologiques nécessite souvent la confection de coupes histologiques, qui peuvent être utilisées pour caractériser la structure moléculaire ou la composition macromoléculaire. Il n'existe actuellement aucune comparaison de méthode, et ce constat nous a amené à les étudier, puis à les comparer. L'objectif de ces travaux est d'investiguer si l'inclusion en paraffine permet d'acquérir des signaux IR exploitables pour caractériser in situ la composition du tissu et la structure macromoléculaire des protéines musculaires.

Les deux principaux modes de préparation des échantillons (fixation chimique avec inclusion en paraffine et cryofixation) ont été réalisés, ainsi que des variants (double fixation) puis étudiés en microscopie optique et en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

En MO, on constate qu'une fixation chimique et une inclusion en paraffine sont les meilleures garantes d'une observation fidèle à la nature de l'échantillon. En FTIR, on constate qu'une inclusion en paraffine altère les structures, et, si une cryofixation classique n'est pas envisageable, une double fixation offre une alternative. Si les molécules d'intérêt sont des protéines, le fixateur de choix est le glutaraldéhyde, et si les molécules d'intérêt sont des lipides, le fixateur de choix est le paraformaldéhyde.

Mots-clés : cryofixation, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), inclusion chimique, microscopie photonique, muscle de truite

Keywords : cryofixation, Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy, chemical inclusion, photonic microscopy, trout muscle

Introduction

L'institut

L'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) est le premier organisme de recherche au monde à être spécialisé dans 3 domaines différents : l'agriculture, l'alimentation et l'environnement.

L'INRAE œuvre aujourd'hui à répondre aux nouveaux enjeux sociétaux engendrés notamment par le changement climatique et par l'augmentation et le vieillissement de la population. Les compétences scientifiques et technologiques permettent à l'institut de s'intéresser à des thématiques telles que la sécurité alimentaire et nutritionnelle, la préservation des ressources naturelles, etc. Ces missions sont assurées grâce à l'implication de plus de 450 partenaires sociaux économiques, un budget de plus d'un milliard d'euros par an et la collaboration avec de nombreux partenaires académiques (universités, écoles, organismes de recherches). En effet, une des missions de l'INRAE est la formation à et par la recherche.

L'INRAE compte à ce jour plus de 12 000 employés, dont 2 000 doctorants, répartis sur 18 centres de recherches dans toute la France. Il existe 14 départements de recherche qui regroupent les 231 unités de recherches expérimentales et de service. Parmi ces départements, certains sont centrés sur la génomique animale et végétale. Le département TRANSFORM, auquel est rattachée l'unité Qualité des Produits Animaux (QuaPA) œuvre notamment sur la transformation de matières organiques en aliments et produits biosourcés avec une valorisation des résidus de l'activité humaine.

L'unité QuaPA

L'unité QuaPA est localisée sur le site de Theix du centre Clermont-Auvergne-Rhône-Alpes et comprend 36 permanents et une vingtaine de personnels temporaires. L'unité est composée de 3 équipes, BPM (Biochimie et Protéines du Muscle), MASS (Microcontaminants, Arômes et Sciences Séparatives), IT (Imagerie et Transfert) et deux plateformes : AgroRésonance et Protéomique. La problématique de QuaPA porte sur la construction de l'aliment, essentiellement d'origine carnée, et sa déconstruction dans le tube digestif.

Les missions scientifiques de QuaPA répondent donc à des enjeux sociétaux dont le but est d'anticiper la transition alimentaire mondiale et réfléchir à un meilleur équilibre entre les différentes sources de protéines qui sont à ce jour en majeure partie d'origine animale et qui sont parfois mal adaptées selon le type de population (séniors, sportifs, etc.). Deux axes de recherche se distinguent pour répondre à ces objectifs : la conception raisonnée d'aliments carnés spécifiques ainsi que l'amélioration de la durabilité des systèmes alimentaires dans un contexte de transition alimentaire mondiale.

Les objectifs de l'équipe Imagerie et Transfert (IT) s'inscrivent dans ceux de l'unité et visent à maîtriser la qualité des produits à travers les transformations technologiques et à concevoir les aliments du futur. L'équipe dispose de prototypes permettant d'étudier des procédés de transformation innovants (barattage, impression additive d'aliments, etc.) et d'équipements permettant d'analyser la structure de tels produits à différentes échelles et au cours du temps.

Le projet

Innosalt est un projet de l'équipe IT, qui vise à la diminution de la teneur en sel dans les poissons. Il a en effet été remarqué que la consommation de sel était trop importante pour une majorité des Français, et que celui-ci avait un effet délétère sur la santé. Cependant, le sel a un rôle important dans pour améliorer la saveur, la couleur et la texture des filets de poissons, et ils inhibent la multiplication de la plupart des bactéries.

Cette balance avantage/inconvénient a amené l'équipe à étudier la diffusion du sel dans les poissons, pour caractériser cette diffusion, puis la modéliser pour pouvoir facilement adapter le process (taux de sel, durée de salage, température) à la variabilité de la matière première.

Le stage

L'analyse structurale des tissus biologiques nécessite souvent la confection de coupes histologiques, qui sont ensuite utilisées pour caractériser la structure en microscopie optique (MO), ou la composition et la structure macromoléculaire par des approches de microspectroscopie (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), Raman, fluorescence ultraviolette, fluorescence X, etc.).

L'utilisation de la spectroscopie FTIR est un domaine de recherche en pleine expansion pour l'analyse non-destructive et rapide d'échantillons biologiques et sa pertinence dans le diagnostic cytologique et histologique^{1,2,3,4,5}.

Les trois principaux modes de mesure de FTIR sont la transmission, la réflexion et la réflectance totale atténuée. Chaque mode offre des avantages et inconvénients mais cet éventail de possibilité permet de s'adapter à la nature de l'échantillon à analyser. Ici, le mode de transmission qui impose la confection de coupes histologiques mais qui permet l'acquisition de spectres très bien résolus, sera utilisé.

La spectroscopie FTIR en transmission repose sur le principe suivant : lorsqu'un échantillon est sondé par un faisceau infrarouge (IR), les groupes fonctionnels de l'échantillon absorbent le rayonnement IR et les caractéristiques vibratoires de chaque groupe fonctionnel sont alors reflétées⁶. En IR, les différences dans la composition macromoléculaire des cellules et des tissus produisent des modèles spectroscopiques vibratoires uniques (entre 1800 cm^{-1} - 850 cm^{-1}) qui ressemblent à l'empreinte digitale de l'environnement, d'où le nom de région de l'empreinte digitale.

Il reste encore plusieurs défis à relever dans le développement de la FTIR, notamment à propos de la préparation des échantillons, puisque celle-ci peut grandement modifier la réponse en FTIR. De plus, malgré la publication de nombreux articles sur l'analyse en microspectroscopie FTIR d'échantillons biologiques, aucune comparaison de méthodes n'est disponible dans la littérature scientifique. C'est ce constat qui nous a amené à les étudier, puis à les comparer, en histologie comme en FTIR.

En histologie, la fixation du tissu est indispensable pour figer sa structure et s'assurer qu'elle ne sera pas modifiée lors des étapes suivantes d'inclusion et de confection des coupes. Cependant, la succession d'étapes de préparation de l'échantillon peut entraîner des modifications biochimiques⁷ du tissu, que ce soit à cause de la dessiccation, du séchage, de la substitution de l'éthanol ou de la fixation chimique, ce qui peut impliquer des changements détectés dans les intensités et les positions des bandes d'absorption IR.

Il existe 2 principaux types de préparation de l'échantillon pour analyse histologique et microspectroscopique des tissus :

- La cryofixation qui consiste en une congélation ultra-rapide de l'échantillon à l'aide d'azote liquide ($\text{N}_2(l)$) ou d'un fluide refroidi par l'azote liquide (pour les études de lipides ou de protéines par exemple) et en utilisant parfois un cryoprotecteur, suivie de coupes à congélation à l'aide d'un cryomicrotome.
- La fixation chimique qui consiste à perfuser l'organe ou à incuber un échantillon de l'organe dans une solution tampon contenant un fixateur chimique (la plupart du temps du

paraformaldéhyde (PFA) ou du glutaraldéhyde (GA)). Dans ce cas, le fixateur chimique crée des ponts entre les molécules pour stabiliser les structures. A l'issue de la fixation chimique, les échantillons sont déshydratés par incubation successives dans des bains d'alcool de plus en plus concentrés, puis dans de l'ottix pur avant d'être « inclus » dans de la paraffine fondue (chauffée à 56°C) ou de la résine plastique (à température ambiante pour les études sensibles à la chaleur).

La préparation de l'échantillon, en particulier dans le cas de tissus fixés chimiquement et inclus en paraffine ou en résine, est susceptible de donner des signaux FTIR caractéristiques des produits chimiques utilisés, voire des réactions qu'ils peuvent générer au sein de l'échantillon. Dans ce contexte, les cryofixations et coupes à congélation sont privilégiées car elles sont vierges de tout produit chimique dont le signal pourrait masquer ou distordre les pics d'intérêt. Le problème majeur avec l'utilisation de coupes à congélation réside dans le fait qu'il est difficile de descendre en dessous de 8-10 µm d'épaisseur de coupe, avec pour conséquence une moindre résolution de l'image que lors de coupes incluses en paraffine (voir ci-dessous)⁸. D'autres part, pour des raisons de sécurité et/ou économiques, il n'est pas toujours possible de transporter de l'azote liquide sur le site de prélèvement, puis de transporter les échantillons cryofixés jusqu'au laboratoire.

Les coupes en paraffine de 1 - 2 µm d'épaisseur autorisent une très bonne résolution de l'image lors de l'observation en MO, mais la fixation chimique tend à masquer les sites antigéniques, et les immunomarquages sont moins performants que sur des coupes à congélation (10 µm), dont la résolution optique est cependant moindre, ce qui sous-entend que le signal FTIR en transmission puisse également être modifié.

Malgré cela, la méthode avec fixation dans du formol et inclusion à la paraffine (FFPE) a été utilisée avec succès pour différencier les tissus cancéreux du sein des tissus normaux par microscopie IR^{9,10,11}.

Un fixateur très utilisé en microscopie est le PFA. Pour être efficace, il doit contenir du formaldéhyde monomère comme soluté principal. Celui-ci est obtenu à partir de PFA ; l'action d'ion HO⁻ brise le polymère en monomère de formaldéhyde. Il est admis que ce processus prend quelques jours si l'on utilise de l'eau, mais qu'il est presque instantané avec une solution tampon au pH physiologique¹² : l'hydrolyse des polymères est catalysée par les ions hydroxydes présents dans la solution légèrement alcaline¹³[Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#). Le groupe aldéhyde peut se combiner avec l'azote et certains autres atomes des protéines, ou avec deux de ces atomes s'ils sont très proches l'un de l'autre, formant ainsi une liaison transversale -CH₂- appelée pont méthylène (**Figure 1** : Fixation par PFA).

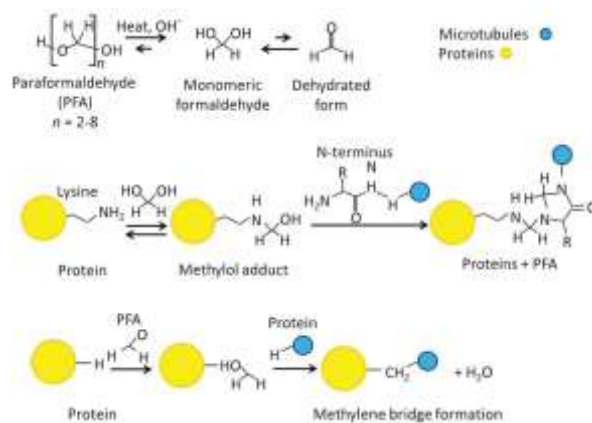


Figure 1 : Fixation par PFA

Le nombre de ces réticulations augmente avec le temps¹⁴. L'action fixatrice du formaldéhyde est probablement exclusivement due à ses réactions avec les protéines ; la liaison initiale du formaldéhyde aux protéines étant largement achevée en 24 heures¹⁵. Les substances telles que les hydrates de carbone, les lipides et les acides nucléiques sont piégées dans une matrice de molécules de protéines insolubilisées et réticulées mais ne sont pas chimiquement modifiées par le formaldéhyde, à moins que la fixation ne soit prolongée pendant plusieurs semaines¹³.

Un autre fixateur très utilisé pour faire de la MO est le GA¹⁵, fixateur à pénétration plus rapide qui insolubilise complètement les protéines. Le GA est une petite molécule composée de deux groupes aldéhyde, séparés par une chaîne flexible de 3 ponts méthylène. Le potentiel de réticulation est évidemment beaucoup plus important qu'avec le formaldéhyde (FA) car il peut se produire à travers les deux groupes -CHO et sur des distances variables. Dans les solutions aqueuses, le GA est présent en grande partie sous forme de polymères de taille variable. Il y a un groupe aldéhyde libre qui dépasse du côté de chaque unité de la molécule de polymère, ainsi qu'à chaque extrémité. Tous ces groupes -CHO se combineront avec les azotes des protéines avec lesquels ils entrent en contact ; il y a donc un énorme potentiel de réticulation. Cependant, il reste également de nombreux groupes aldéhydes libres qui ne peuvent pas être éliminés du tissu par lavage¹³ qui pourraient générer un signal parasite lors de l'analyse FTIR (**Figure 2**).

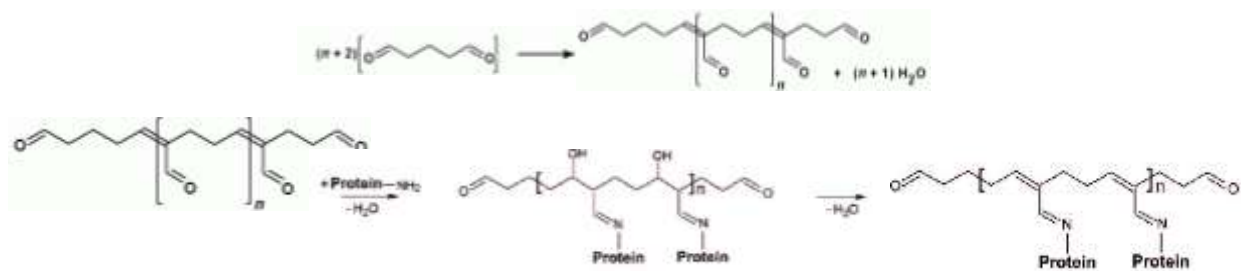


Figure 2 : Fixation par GA

L'objectif de ces travaux est de comparer les 2 méthodes de préparation de l'échantillon (cryofixation et coupes à congélation *versus* fixation chimique-inclusion en paraffine et coupes) sur du muscle de poisson pour analyse en histologie et en microspectroscopie FTIR.

Un objectif majeur est d'investiguer si l'inclusion en paraffine, agressive pour l'échantillon mais qui préserve bien la structure tissulaire, permet d'acquérir des signaux IR exploitables pour caractériser *in situ* la composition du tissu et la structure macromoléculaire des protéines musculaires, comme on peut le faire sur des coupes à congélation.

Matériels et méthodes

Matériel d'étude et réactifs

Poissons

Tableau 1 : Echantillons utilisés

	Truite 1	Truite 2	Truite 3
Poids	106 g	88 g	108 g
Lot	120722		
Fournisseur	Les Viviers de Haute Corrèze		
Date abattage et filetage	15/07/2022		
Date de préparation des échantillons	18/07/2022 – J3		

Réactifs

Ethanol pur (Carlo Erba, lot 3086052)

Azote liquide (air liquide, lot non précisé)

Isopentane (Sigma-Aldrich, lot STBJ9625)

Tampon phosphate (PBS) congelé, composé de : NaCl (Sigma-Aldrich, lot 487E1587), KCl (Sigma-Aldrich, lot 268D4214), Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, lot 116H1016) et KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, lot 137G1354)

Eau milliQ (Millipore Corporation)

PFA 16% (Electron microscopy sciences, lot 210220-50, expiration en 02/2024) dilution au quart dans du PBS.

GA 50% (Electron microscopy sciences, lot 2210119, expiration en 01/2023), dilution au 20ème dans du PBS.

Ottix plus (Diapath, lot 2020X21114)

Paraffine (Diapath, lot 2021X08725)

Tissue freezing medium (Microm microtech France, lot A79258)

Coloration HES : hématoxyline de Harris (DiaPath, lot 2021X09052), éosine (DiaPath, lot 2019X14018), safran (Qpath VWR Chemicals lot 21C024126)

Coloration Rouge Sirius : acétone (Sigma-Aldrich, lot 08469EC), aldéhyde formique (Fisher, lot 2030274), acide picrique (Microm microtech, lot 09004LH), rouge sirius (BDH laboratory, lot 4706870N), HCl (Sigma-Aldrich, lot SZBD2250V), méthylcyclohexane (Honeywell, lot ES435).

Eukitt (Sigma-Aldrich, Fluka analytical, lot BCBG59986V)

Matériel et équipements

LEICA CM1950 (LEICA biosystème) (*cryomicrotome*)

STP 120 (Microm microtech France) (*automate à inclusion*), EC 350-1 (Microm microtech France) (*appareil de mise en cassette*), LEICA RM2245 (LEICA biosystème) (*microtome*), HistoCore Arcadia C (LEICA biosystème) (*plaque à givre*), MEDAX (Microm microtech France) (*bain-marie*)

Lame BaF₂ 13mm dia x 1 mm polished window (CRYSTAN LIMITED, lot 64800)

OMNIC Picta (*logiciel FTIR*), NICOLET iN10 MX (Thermo Scientific) (*appareil FTIR*)

Superfrost plus adhesion microscope slides, white tab, clipped corner (Eoredia, lot 0881) (*lame MO*)

Olympus BX61 (*MO*), cellSense (*logiciel capture d'image*), Olympus DP71 (*caméra*)

Unscrambler version 9.8 (*logiciel data analyse*)

Préparation des échantillons

Exérèse

Chaque poisson sert de sujet et de témoin ; les filets droit et gauche sont séparés et utilisés comme décrit sur la [Figure 3](#) : Préparation des filets et identifiés comme décrits sur la

[Figure 4](#) : Nomenclature des échantillons.



- | | |
|---|---|
| 1. Fixé dans le PFA, inclus dans la paraffine | 1'. Cryofixé |
| 2. Fixé dans le PFA, inclus dans la paraffine | 2'. Cryofixé |
| 3. Fixé dans le PFA, inclus dans la paraffine | 3'. Cryofixé |
| 4. Fixé dans le PFA puis cryofixé | 4'. Fixé dans le GA, puis cryofixé |
| 5. Fixé dans le PFA puis cryofixé | 5'. Fixé dans le GA, inclus dans la paraffine |
| 6. Fixé dans le PFA puis cryofixé | 6'. Fixé dans le GA, inclus dans la paraffine |

Figure 3 : Préparation des filets

Ils sont préparés 3 jours après abattage (J3).

Identification échantillon



- = numéro truite (1, 2 ou 3)
- = type de fixation (P pour PFA, G pour GA ou vide)
- = type d'inclusion (P pour paraffine, C pour cryo)
- = numéro d'échantillon (1, 2, 3 ou vide)

Note : dans le cadre de l'analyse FTIR, un petit d sera rajouté pour indiquer que les échantillons ont été déparaffinés (ex : PPD désigne un échantillon fixé par le PFA, inclus dans la paraffine et déparaffiné avant analyse, selon le mode opératoire décrit en [Déparaffinage](#)).

	Truite 1	Truite 2	Truite 3	
Filet gauche	1PP1	2PP1	3PP1	Tête
	1PP2	2PP2	3PP2	
	1PP3	2PP3	3PP3	
	1PC1	2PC1	3PC1	Queue
	1PC2	2PC2	3PC2	
	1PC3	2PC3	3PC3	
Filet droit	1_C1	2_C1	3_C1	Tête
	1_C2	2_C2	3_C2	
	1_C3	2_C3	3_C3	
	1GC_	2GC_	3GC_	Queue
	1GP1	2GP1	3GP1	
	1GP2	2GP2	3GP2	

Figure 4 : Nomenclature des échantillons

Préparation des échantillons

Tableau 2 : Mode opératoire de préparation des échantillons

	Inclusion dans la paraffine	Double fixation	Cryofixation	Double fixation 2	Inclusion dans la paraffine 2
<i>Numéros correspondants</i>	1 2 3	4 5 6	1' 2' 3'	4'	5' 6'
<i>Identifiants échantillons</i>	1PP1 1PP2 1PP3 2PP1 2PP2 2PP3 3PP1 3PP2 3PP3	1PC1 1PC2 1PC3 2PC1 2PC2 2PC3 3PC1 3PC2 3PC3	1C1 1C2 1C3 2C1 2C2 2C3 3C1 3C2 3C3	1GC 2GC 3GC	1GP1 1GP2 2GP1 2GP2 3GP1 3GP2
<i>Fixation</i>	PFA 4% 48h conservation à 4°C	PFA 4% 48h conservation à 4°C	n/a, conservation à - 80°C	GA 2,5% 48h conservation à 4°C	GA 2,5% 48h conservation à 4°C
<i>Rinçage</i>	Ethanol 70%	Ethanol 70%	n/a	Ethanol 70%	Ethanol 70%
<i>Inclusion</i>	1. Déshydratation par des bains d'alcool croissants 2. Bains d'ottix+ 3. Paraffine	Isopentane refroidi par N _{2(l)}	Isopentane refroidi par N _{2(l)}	Isopentane refroidi par N _{2(l)}	1. Déshydratation par des bains d'alcool croissants 2. Bains d'ottix+ 3. Paraffine
<i>Coupe</i>	Microtome 6 µm pour le MO avec dépôt sur lames SuperFrost+ 3 µm pour le FTIR avec dépôt sur lames BaF ₂	Cryomicrotome, 10 µm avec dépôt sur lames SuperFrost+ pour le MO et dépôt sur lames BaF ₂ pour le FTIR	Cryomicrotome, 10 µm avec dépôt sur lames SuperFrost+ pour le MO et dépôt sur lames BaF ₂ pour le FTIR	Cryomicrotome, 10 µm avec dépôt sur lames SuperFrost+ pour le MO et dépôt sur lames BaF ₂ pour le FTIR	Microtome 6 µm pour le MO avec dépôt sur lames SuperFrost+ 3 µm pour le FTIR avec dépôt sur lames BaF ₂
<i>Coloration (uniquement MO)</i>	1. Déparaffinage par des bains d'ottix+, puis d'alcool décroissant et enfin à l'eau 2. Hématoxyline – éosine – safran (HES) ou Rouge Sirius	HES ou Rouge Sirius	HES ou Rouge Sirius	HES ou Rouge Sirius	1. Déparaffinage par des bains d'ottix+, puis d'alcool décroissant et enfin à l'eau 2. HES ou Rouge Sirius
<i>Montage (uniquement MO)</i>	1. Déshydratation par des bains d'alcool croissants 2. Bain d'ottix+ 3. Montage à l'Eukitt	Montage à l'Eukitt	Montage à l'Eukitt	Montage à l'Eukitt	1. Déshydratation par des bains d'alcool croissants 2. Bain d'ottix+ 3. Montage à l'Eukitt
<i>Déparaffinage (uniquement FTIR)</i>	Bain d'ottix+	n/a	n/a	n/a	Bain d'ottix+

Note : le déparaffinage avant analyse FTIR concerne uniquement la moitié des échantillons ; l'autre moitié est analysée paraffinée. La lettre d indique que l'échantillon est déparaffiné. Ainsi, il existe un échantillon 1PP1 et un échantillon 1PP1d, qui seront tous les deux analysés en FTIR.

Le mode opératoire pour l'inclusion en paraffine est développé [Inclusion en](#) paraffine.

Acquisition des données

L'appareil utilisé était le NICOLET iN10 MX (Thermo Scientific), et le logiciel OMNIC Picta :

- Le détecteur était refroidi à l'azote liquide.
- Le mode utilisé était le mode transmission.
- Le temps d'acquisition était de 12 secondes, avec 64 scans par spectre.
- La résolution était de 8 cm^{-1} .
- Le bruit de fond était acquis avant chaque échantillon.
- La donnée mesurée était l'absorbance.
- La taille de l'ouverture était $30 \mu\text{m}$ par $30 \mu\text{m}$.
- Le spectre était acquis entre 4000 et 675 cm^{-1} .

Prétraitement des données

Les spectres IR contiennent un mélange d'informations physiques et chimiques :

- Physique : épaisseur de l'échantillon, géométrie, changement d'indice de réfraction, bruit, pics, etc.
- Chimique : absorption IR de l'échantillon, contamination par d'autres bandes (vapeur d'eau, milieu d'inclusion ou agent fixateur)

Le prétraitement est indispensable pour pouvoir comparer les spectres issus de différentes acquisitions et pour extraire les informations chimiques pertinentes. Pour cela, il faut supprimer les déviations de la ligne de base, normaliser les spectres pour s'affranchir d'artefacts d'acquisition.

Le prétraitement peut augmenter le niveau d'information ou le contenu discriminant des spectres.

Le prétraitement peut être utile pour trier les spectres défectueux et éliminer les valeurs aberrantes :

- Spectres montrant des signes de saturation
 - Les spectres qui sont trop faibles
 - Spectres trop déformés pour être corrigés (par diffusion de Mie ou effet de bordure, encastrement)
- } Déviation selon la loi de Beer-Lambert

Correction de la ligne de base

Il existe différentes méthodes pour corriger la ligne de base ; ici nous effectuerons une correction de la ligne de base polynomiale, qui consiste à soustraire une ligne de base polynomiale d'ordre requis (ici d'ordre 2).

MSC

La MSC est une méthode de transformation utilisée pour compenser les effets multiplicatifs et additifs dans les données :

- Effets multiplicatifs : différences d'intensité
- Effets additifs : décalage de la ligne de base

En pratique, la MSC corrige l'intensité des spectres (normalisation) et la ligne de base en une seule étape.

La MSC modélise la déformation des spectres en utilisant un ensemble de bons spectres fournis par l'utilisateur ou en utilisant le spectre moyen comme référence. En conséquence, la MSC :

- Dépend du jeu de données
- Suppose une faible variabilité chimique dans l'échantillon
- Suppose que la plupart des spectres sont de bonne qualité
- Suppose que les spectres résultants sont similaires à l'intensité du spectre de référence, ligne de base, etc.

EMSC

L'EMSC est une extension de la MSC conventionnelle, qui ne se limite pas à la suppression des effets multiplicatifs et additifs des spectres.

Cette version étendue permet une séparation des effets physiques de diffusion de la lumière et des effets chimiques d'absorption de la lumière dans les spectres.¹⁷

Dans ce travail, nous utiliserons l'EMSC qui permet de s'affranchir de faibles variations de l'épaisseur de coupe, plutôt que la MSC pour traiter les données.

Analyses statistiques

Pour cette étude, nous avons décidé de faire des analyses multivariées non supervisées, sous forme d'analyse en composantes principales (ACP) à l'aide du logiciel Unscrambler (version 9.8).

Résultats et discussion

MO

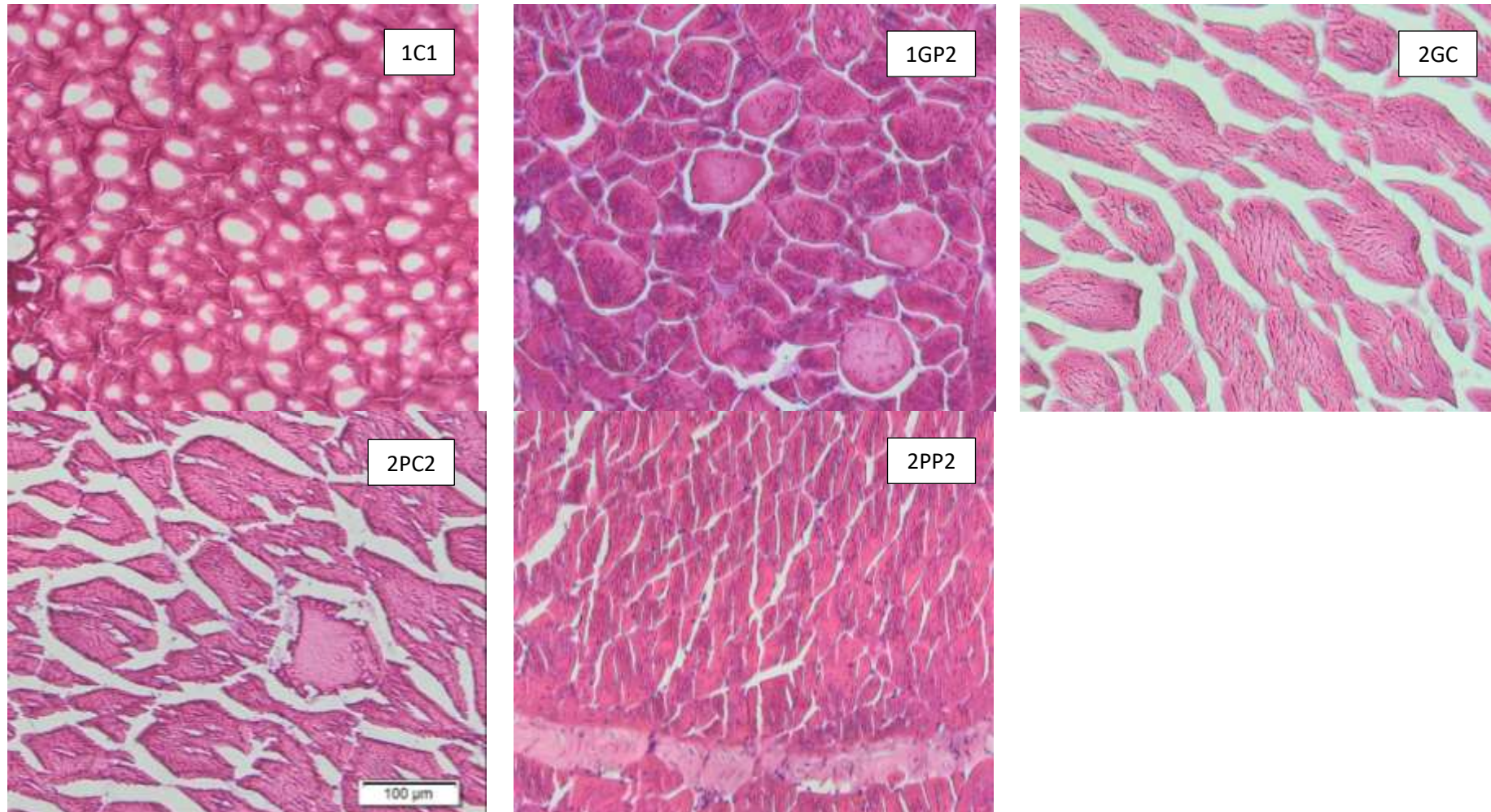


Figure 5 : échantillons cryofixé (en haut à gauche), fixé au glutaraldéhyde et inclus en paraffine (en haut au milieu), fixé au glutaraldéhyde et cryofixés (en haut à droite), fixé au paraformaldéhyde et cryofixé (en bas à gauche) et fixé au paraformaldéhyde et inclus en paraffine (en bas au milieu), coloré au HES et observé au microscope optique grossissement x100

Nous pouvons constater que l'échantillon cryofixé (1C1) présente de gros trous de congélation ; cela arrive lorsque l'échantillon est décongelé accidentellement. Nous n'avons donc pas pu nous baser sur cet échantillon, ni sur les autres cryofixés (qui présentent les mêmes artefacts).

Cet accident démontre l'attention qui doit être portée aux échantillons cryofixés ; s'ils ne sont pas préparés correctement, les échantillons sont alors inutilisables pour faire des études de morphologie.

Les échantillons qui ont été doublement fixés (en haut à droite dans le GA (2GC) et en bas à gauche dans le PFA (2PC2)) présentent de larges espaces intercellulaires, qu'on ne constate normalement pas dans l'échantillon cryofixés, qui sert de référence. Les échantillons fixés chimiquement puis inclus en paraffine (en haut au milieu dans le GA (1GP2) et en bas au milieu dans le PFA (2PP2)) ne présentent pas non plus ces espaces intercellulaires. Pour faire de l'observation morphologique, une fixation chimique et une inclusion en paraffine sont les meilleures garantes d'une observation fidèle à la nature de l'échantillon.

FTIR

La **Figure 6** présente les spectres moyens des échantillons préparés selon différents protocoles. L'axe des abscisse est gradué en nombre d'onde (cm^{-1}), et l'axe des ordonnées en absorbance (unité arbitraire).

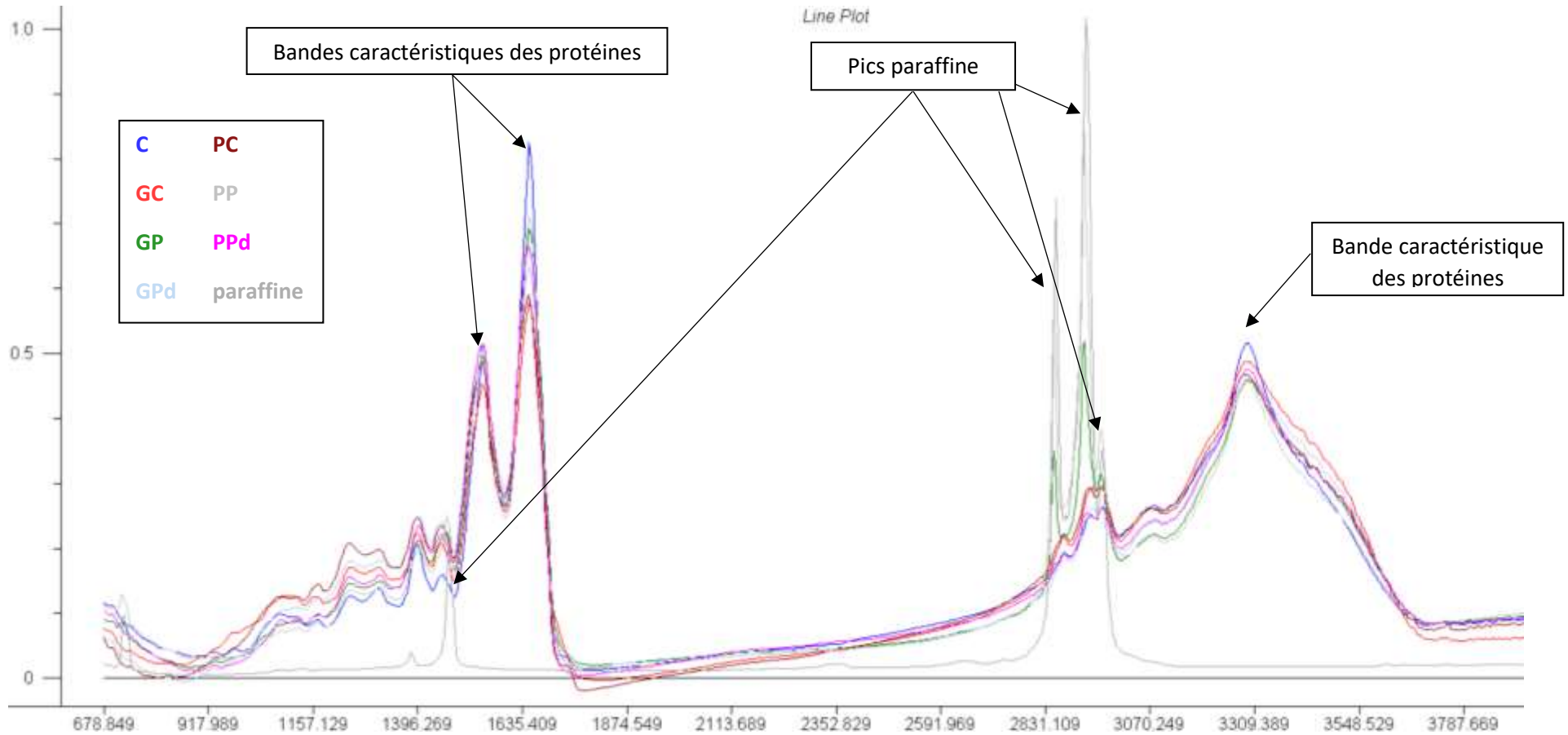


Figure 6 : spectre IR des différentes conditions (basé sur les moyennes de chaque point de tous les spectres après EMSC), comparé à un spectre de la paraffine pure.

Tableau 3 : Attribution des principaux pics des spectres présentés en figure 5¹⁸

	amine II (mélange de vibrations de flexion de la liaison N-H et d'étirement de la liaison C-H)	protéines (vibration des liaisons N-H des protéines aminées)	Acide gras (vibration d'étirement asymétrique des liaisons C-H)	Vibration asymétrique des Csp ³ -H	Acide gras (vibration d'étirement symétrique des liaisons C-H)	méthylène C-H	méthyle C-H	protéines (N-H amines secondaires)
C	1547	1651		2874		2931	2966	3294
GC	1547	1651		2874		2935	2958	3294
GP	1543	1651	2850	2874	2920		2958	3294
GPd	1543	1651		2874		2931	2962	3294
PC	1543	1651		2877		2935	2962	3290
PP	1547	1651	2850	2877 (épaulement)	2920		2958	3294
PPd	1547	1651	2850	2877	2920		2962	3294

Dans la suite de ce rapport, ne seront présentés que les ACP ; les détails de leur obtention sont disponibles en [ACP](#) complètes, avec certaines composantes principales et variance expliquées.

Le spectre IR présenté en [Figure 6](#) : spectre IR des différentes conditions (basé sur les moyennes de chaque point de tous les spectres après EMSC), comparé à un spectre de la paraffine pure. et dont les pics principaux ont été reportés et attribués en accord avec la littérature [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#) dans le [Tableau 3](#) : Attribution des principaux pics des spectres présentés en figure permet de voir plusieurs caractéristiques intéressantes.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la partie assignée aux lipides du spectre (2800 – 3030 cm⁻¹). On peut voir deux pics sur les échantillons PP (gris le plus clair) et GP (vert) à 2850 cm⁻¹ et 2920 cm⁻¹, qui correspondent à des vibrations d'étirement asymétrique des liaisons C-H et à des vibrations d'étirement symétrique des liaisons C-H. Habituellement en biologie, ces deux liaisons sont caractéristiques des lipides.

Cependant, l'opération d'inclusion en paraffine nécessite des passages dans des bains d'alcool de degré croissant, ce qui entraîne une dissolution des lipides (triglycérides pour la plupart). En théorie, ces bandes ne devraient pas être visibles. De plus, elles disparaissent dans les échantillons GPd (bleu pâle) et PPd (rose, même s'il reste un résidu à 2850 cm⁻¹).

Nous avons émis l'hypothèse que ces bandes, qui disparaissaient lors de déparaffinage, étaient dues à la présence de paraffine. Nous avons voulu savoir si elles étaient générées par la paraffine elle-même, ou par son interaction avec les molécules présentes dans l'échantillon.

Pour cela, nous avons acquis un spectre de paraffine pure (gris le plus foncé), qui révèle 3 pics : deux pics assignés à la bande des « lipides » dans les échantillons biologiques, et un autre pic à $2962 (\pm 4) \text{ cm}^{-1}$. Ce dernier pic a été identifié comme appartenant aux méthyles de bout de chaînes.

Les deux pics à 2850 cm^{-1} et 2920 cm^{-1} sont donc des pics dus à la paraffine elle-même, et pas à sa liaison avec les molécules présentes dans l'échantillon. Ces résultats sont en accord avec la littérature scientifique¹⁸.

Le dernier pic étant présent à la fois sur la paraffine pure, sur l'échantillon C et sur les échantillons déparaffinés, nous pouvons penser qu'il s'agit d'une liaison que l'on retrouve à la fois dans les protéines et dans les chaînes hydrocarbonées de la paraffine.

L'échantillon C présente deux bandes à $2933 (\pm 2) \text{ cm}^{-1}$ et $2962 (\pm 4) \text{ cm}^{-1}$ qui sont importantes car elles reflètent des liaisons typiques des groupes méthyle (CH_3) et méthylène (CH_2) des protéines et/ou des lipides. Le pic du méthylène n'est retrouvé que dans les échantillons GC, PC et GPd, tandis que celui du méthyle est retrouvé dans tous les échantillons.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la partie caractéristique des protéines du spectre IR ($1450 - 1830 \text{ cm}^{-1}$ et $3100 - 3600 \text{ cm}^{-1}$)[Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#) Nous pouvons voir qu'*a priori*, aucun traitement ne modifie la réponse des protéines, puisque les bandes à $1545 (\pm 2) \text{ cm}^{-1}$, 1651 cm^{-1} et $3292 (\pm 2) \text{ cm}^{-1}$ sont présentes dans tous les échantillons. Cependant, nous pouvons constater que le pic attribué à la vibration des liaisons N-H des protéines à 1651 cm^{-1} était plus important dans la condition de référence (cryofixation simple) que dans n'importe quelle autre condition. Cela s'explique par le mécanisme de fixation¹³, qui détruit la liaison N-H terminal des protéines pour former un pont méthylène qui liera cette protéine au fixateur (**Figure 1** : Fixation par PFA et **Figure 2**).

Pour la partie restante du spectre, la paraffine entraîne un pic à 721 cm^{-1} , assigné aux liaisons C-H, et ce pic, comme le précédent, disparaît avec le déparaffinage comme on peut le voir sur le spectre GPd (bleu pâle) et PPd (rose).

Sur ces critères purement visuels, les échantillons les plus proches de l'échantillon C semblent être les échantillons GC (double fixation GA-cryofixation), PC (double fixation PFA-cryofixation) et GPd (fixation GA, inclusion en paraffine et déparaffinage), ce qui pourrait aider les professionnels de santé. Les ACP vont permettre de faire des comparaisons entre certaines conditions pour confirmer ou infirmer cette impression.

Impact du fixateur

Pour caractériser l'influence du type de fixateur, nous avons comparés les échantillons cryofixés avec ou sans fixation chimique (GC, PC et C ; [Figure 7](#)), puis les échantillons inclus en paraffine (PP et GP ; [Figure 8](#)), et enfin les échantillons inclus en paraffine et déparaffinés (GPD et PPD ; [Figure 9](#)). Nous les avons effectués les analyses d'abord sur le spectre complet, puis sur la zone des protéines (1450-1830 cm^{-1}), et enfin sur la zone des lipides (2800-3030 cm^{-1}).

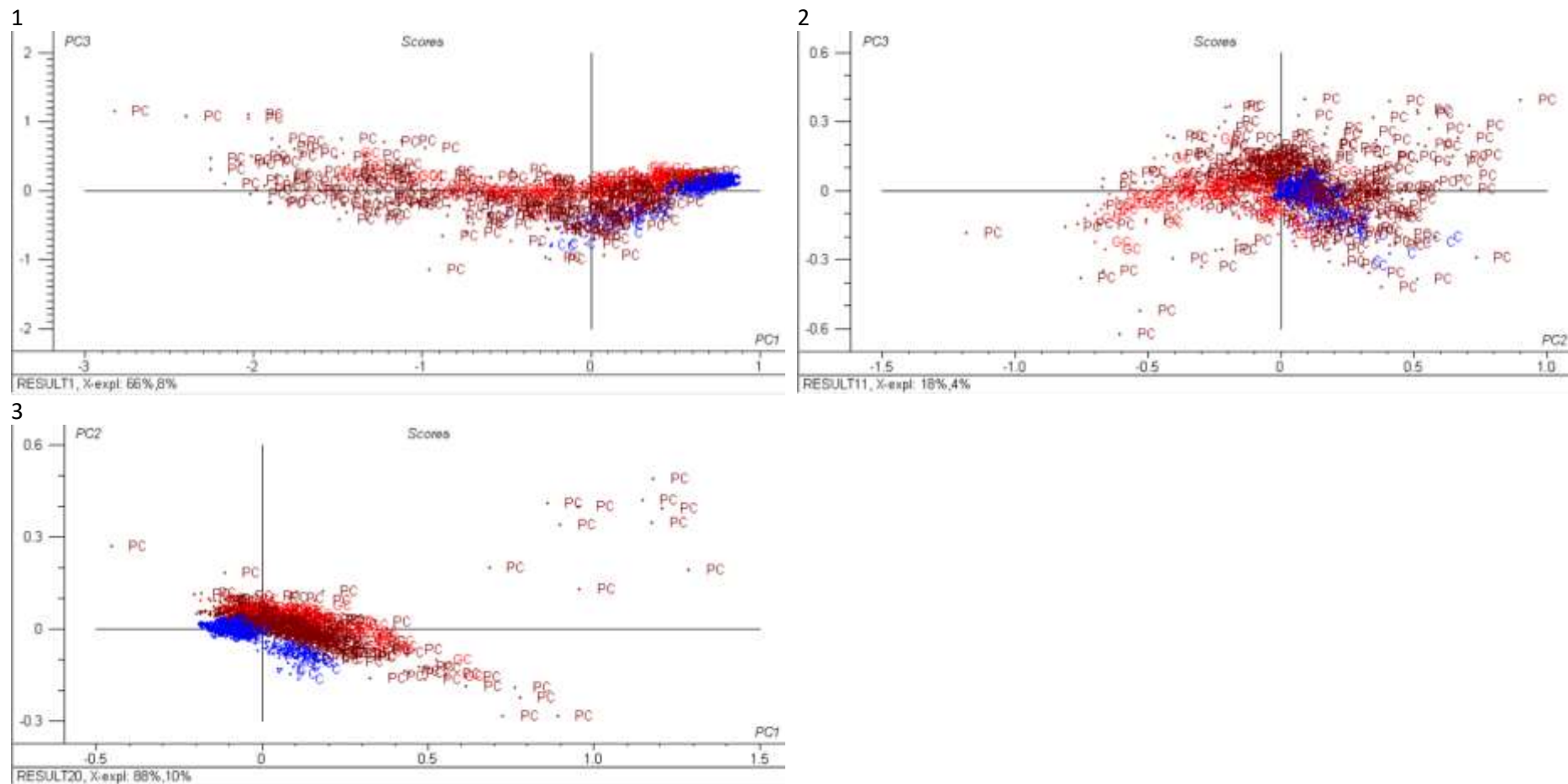
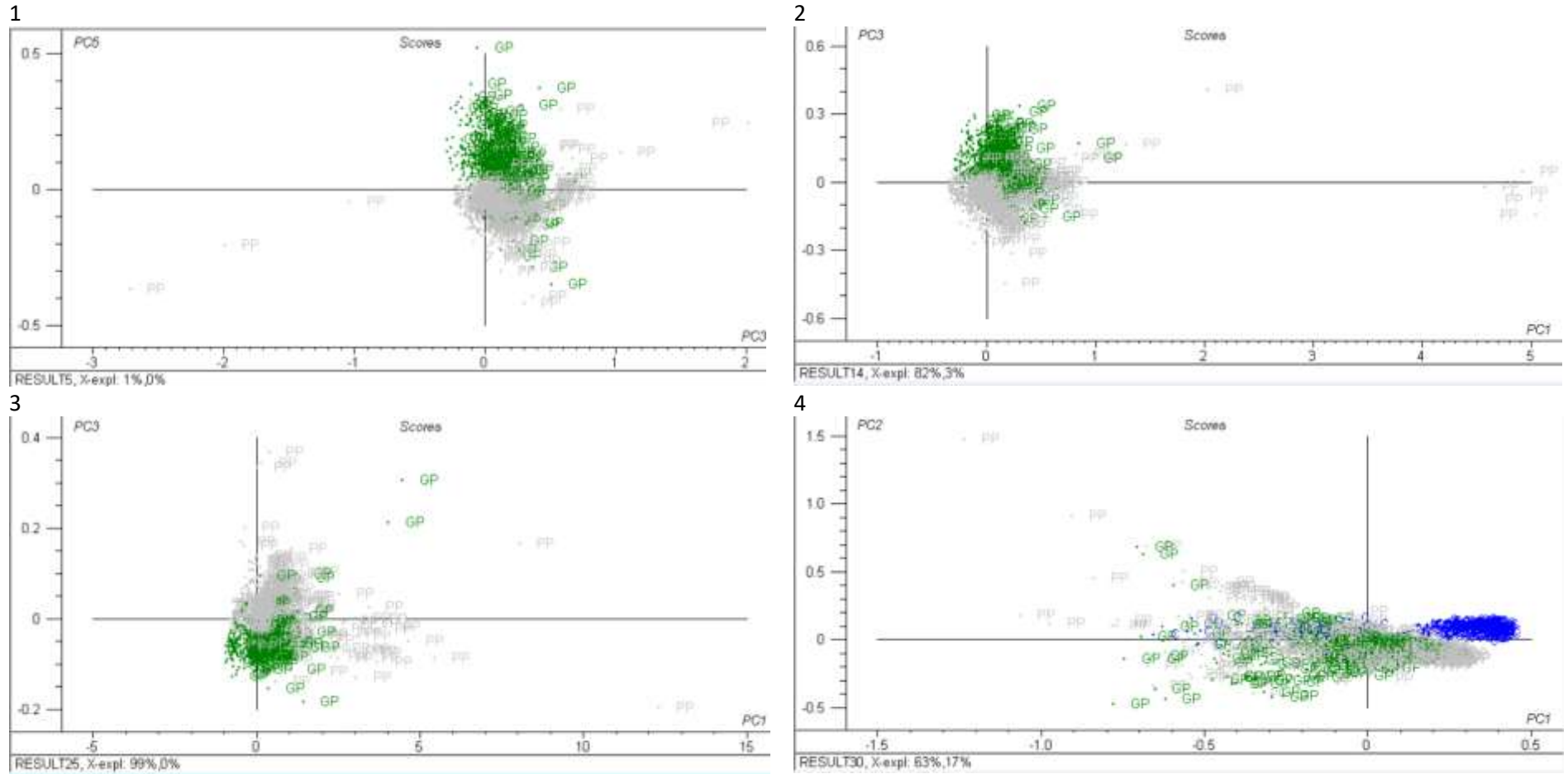


Figure 7 : ACP des échantillons C (bleu), GC (rouge) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.



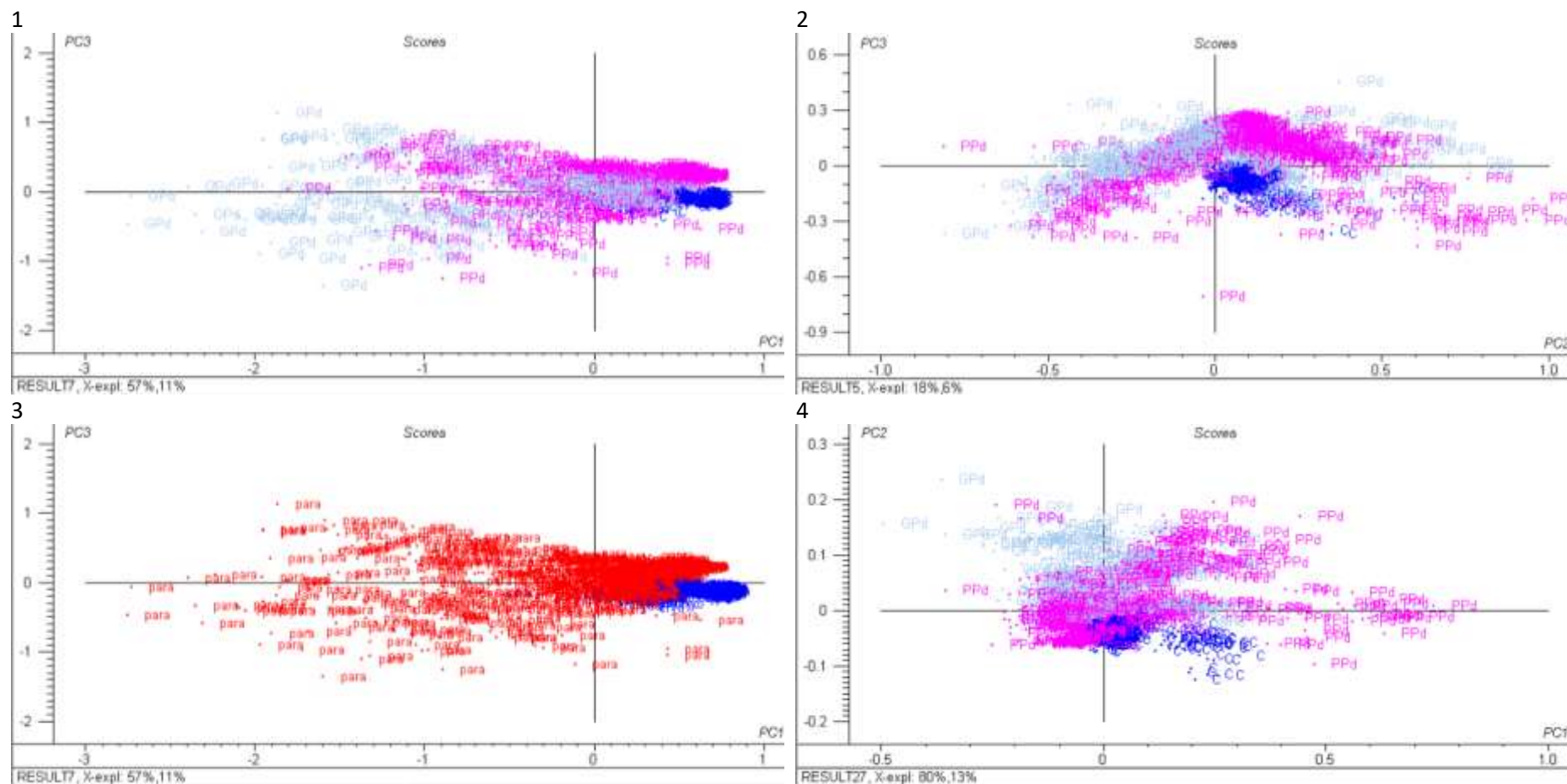


Figure 9 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) et C (bleu) sur (1) spectre complet (2) spectre des protéines (3) spectre complet mais regroupé en échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) (4) spectre des lipides.

L'ACP réalisée sur l'ensemble du spectre ($675\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) des échantillons cryofixés (Figure 7 : ACP des échantillons C (bleu), GC (rouge) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.), montre que les échantillons C sont très peu dispersés, que le GC est surtout dispersé selon la composante 1, et que les PC sont dispersés selon les deux composantes. Il y a donc plus de variabilité inter-échantillons en cas de fixation dans le PFA. Cependant, il est difficile de séparer GC et PC, mais ils se séparent facilement de C. Cela est confirmé par la Figure 8 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zones des lipides (4) zone des protéines mais comparés aux échantillons C (bleu, qui présente les échantillons

inclus en paraffine et qui montre qu'il est difficile de séparer les GP et PP ; seule la composante 5 en fonction de la composante 3 permet une amorce de séparation (appuyé par la [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#), où il est difficile de voir une séparation nette). Enfin, sur les échantillons inclus en paraffine puis déparaffinés ([Figure 9](#) : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) et C (bleu) sur (1) spectre complet (2) spectre des protéines (3) spectre complet mais regroupé en échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) (4) spectre des lipides.), on constate qu'il est difficile de séparer GPd et PPd (appuyé par la [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#), où il est difficile de voir une séparation nette) ; en revanche les échantillons C sont bien isolés des autres. Les GPd et PPd sont très dispersés par rapport aux C, ce qui est aussi vérifiable par la [Figure 9](#) : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) et C (bleu) sur (1) spectre complet (2) spectre des protéines (3) spectre complet mais regroupé en échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) (4) spectre des lipides., qui confirme que les échantillons cryofixés sont très concentrés et isolés.

On peut donc constater que les deux fixateurs ont un effet comparable sur les échantillons.

Cette observation semble se confirmer lorsqu'on se concentre sur la zone des protéines ($1450-1830\text{ cm}^{-1}$) du spectre. On peut voir les échantillons cryofixés sur la [Figure 7](#) : ACP des échantillons C (bleu), GC (rouge) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides., les échantillons inclus en paraffine puis déparaffinés sur la [Figure 9](#) : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) et C (bleu) sur (1) spectre complet (2) spectre des protéines (3) spectre complet mais regroupé en échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) (4) spectre des lipides. et les échantillons inclus en paraffine sur la [Figure 8](#) : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides (4) zone des protéines mais comparés aux échantillons C (bleu). L'ACP réalisée sur la zone des protéines des échantillons inclus en paraffine comparés aux échantillons C ([Figure 8](#) : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides (4) zone des protéines mais comparés aux échantillons C (bleu), les PP et les GP sont bien plus dispersés que les C, donc il y a beaucoup plus de variabilité avec un fixateur et/ou une inclusion dans la paraffine. Les échantillons C semblent plus proches des PP.

L'ACP réalisée sur la zone des protéines et sur spectre complet montre qu'il est difficile de séparer les échantillons en fonction du fixateur ; en revanche les échantillons cryofixés sont très bien séparés. Les échantillons fixés chimiquement sont très dispersés par rapport aux cryofixés.

L'ACP réalisée sur la zone des lipides ($2800-3030\text{ cm}^{-1}$) des échantillons cryofixés ([Figure 7](#) : ACP des échantillons C (bleu), GC (rouge) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.) montre que les C sont peu dispersés, comme les GC. Les PC sont très dispersés, mais ce sont aussi ceux qui sont les plus proches de C ; les séparations sont d'ailleurs nettes, contrairement aux échantillons inclus en paraffine ([Figure 8](#) : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides (4) zone des protéines mais comparés aux échantillons C (bleu). Concernant les échantillons inclus en paraffine puis déparaffinés, la [Figure 9](#) : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) et C (bleu) sur (1) spectre complet (2) spectre des protéines (3) spectre complet mais regroupé en échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) (4) spectre des lipides. montre qu'il est difficile de séparer GPd et PPd ; en revanche les échantillons C sont bien séparés. Les GPd et PPd sont très dispersés par rapport aux C.

De nos expériences, nous pouvons conclure que le PFA disperse plus que le GA quand ils sont suivis d'une cryofixation, mais que le choix du fixateur ne semble pas faire de différence en paraffine (avec ou sans déparaffinage), car les deux dispersent beaucoup les échantillons par rapport à une cryofixation sans fixateur chimique. Cela pourrait s'expliquer par les natures des deux fixateurs ; le FA est un mono-aldéhyde, et le GA un di-aldéhyde. De par sa nature, le GA peut former un réseau réticulé plus solide et plus serré que le FA¹³, ce qui pourrait expliquer la moins grande disparité des résultats obtenus en fixation par le GA.

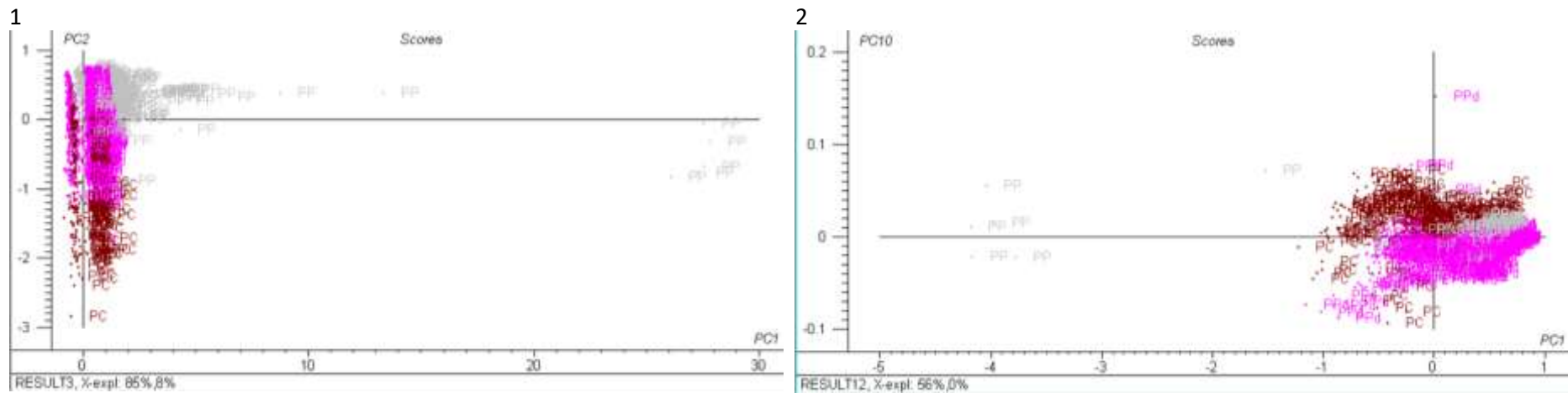
Le PFA et le GA ne sont cependant pas les seuls fixateurs qui existent, même si ce sont les plus utilisés en histologie pour de la MO.

Nous pouvons par exemple citer le liquide de Bouin (formol + acide picrique), qui était utilisé avant la démocratisation du PFA et du GA. En revanche, ce fixateur génère une auto fluorescence (à cause de l'acide picrique), ce qui rend toute étude à partir de fluorochromes impossible. De plus, il faudra prendre garde lors de la manipulation, car l'acide picrique est toxique (les bains utilisés pour la fixation seront donc à usage unique, ce qui peut poser un problème pour la gestion des déchets).

Nous pouvons également citer le tétr oxyde d'osmium, utilisé en microscopie électronique. Celui-ci préserve la structure cellulaire en se combinant avec les lipides, notamment dans les membranes, et en insolubilisant certaines protéines sans coagulation. Cependant, il est coûteux et toxique, pénètre les tissus extrêmement lentement et extrait beaucoup de protéines et d'ARN

Impact de la paraffine

Pour étudier l'influence du type d'inclusion, nous avons étudié les échantillons fixés par le PFA (PP, PPd et PC), puis les échantillons fixés par le GA (GP, GPd et GC). Nous les avons observés d'abord sur le spectre complet, puis sur la zone des lipides (2800-3030 cm^{-1}), et enfin sur la zone des protéines (1450-1830 cm^{-1}).



3

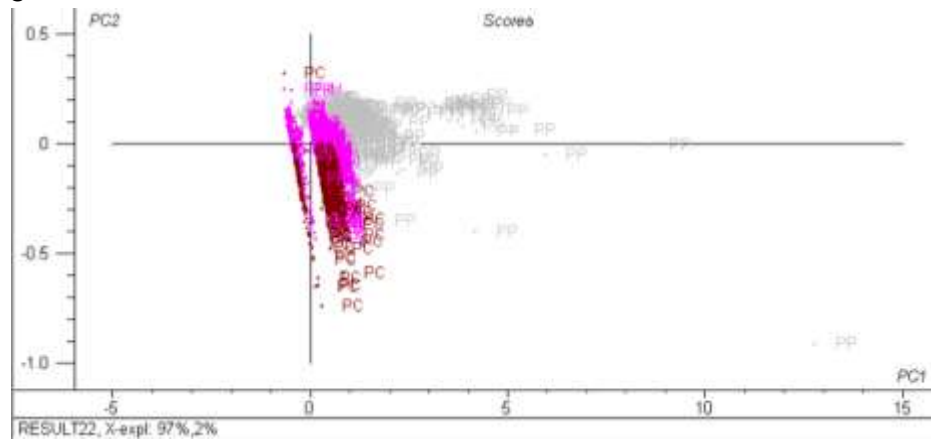
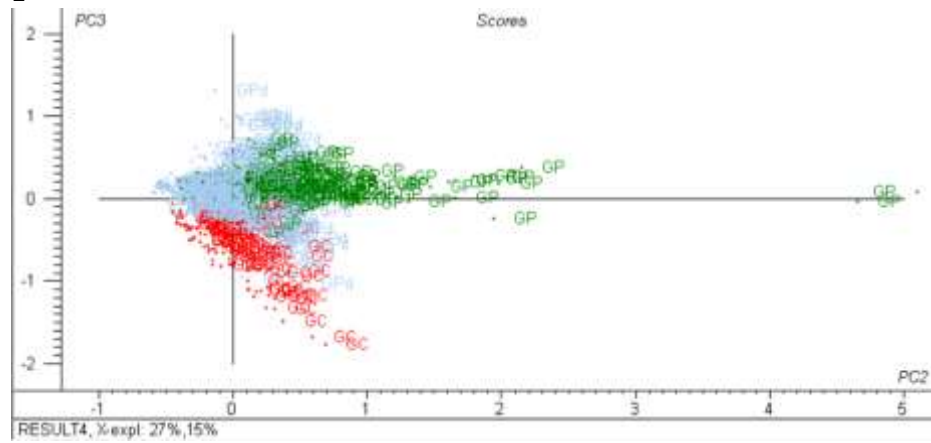
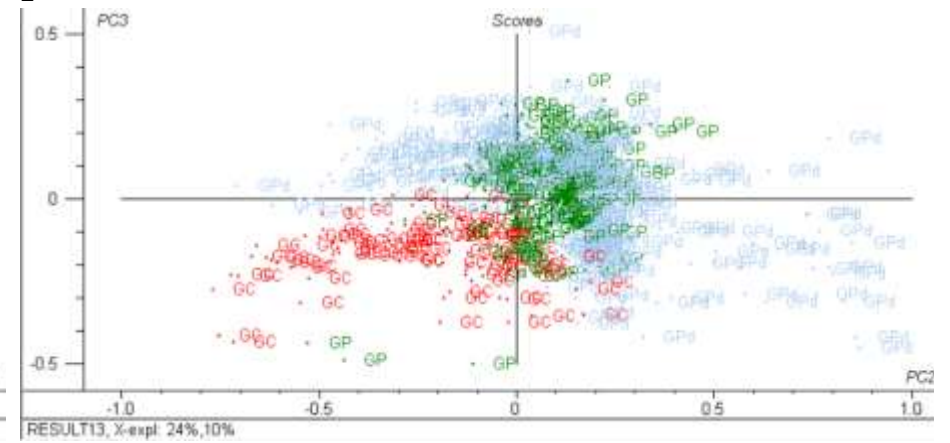


Figure 10 : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.

1



2



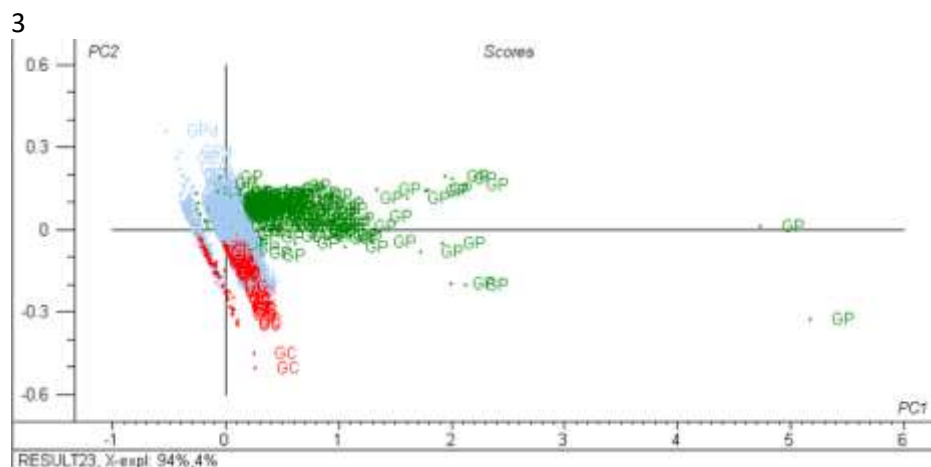


Figure 11 : ACP des échantillons GP (vert), GPd (gris) et GC (rouge) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.

L'ACP réalisée sur le spectre complet ($675\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) des échantillons fixés par le PFA ([Figure 10](#) : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.) montre une séparation nette, avec les échantillons PP d'un côté et les échantillons PPd (appuyé par la [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#)) et PC de l'autre, selon la PC1 (qui étudie les lipides, ce qui concorde avec la [Figure 10](#) : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.). La composante 2 permet de séparer PPd et PC, ce qui montre que les PC sont plus proches des PPd que des PP.

Il en va de même pour les échantillons fixés par GA, comme le montre les [Figure 11](#) : ACP des échantillons GP (vert), GPd (gris) et GC (rouge) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides. et [Erreur ! Source du renvoi introuvable.](#) (sur spectre complet) et les [Figure 11](#) : ACP des échantillons GP (vert), GPd (gris) et GC (rouge) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides. (sur spectre des lipides).

L'ACP réalisée sur la zone des protéines ($1450\text{-}1830\text{ cm}^{-1}$) des échantillons fixés dans le PFA, montre que les nuages de point de PPd, PP et PC sont plus difficile à séparer comme en témoigne la [Figure 10](#) : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose) et PC (bordeaux) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides., seule la composante 10 en fonction de la composante 1 permet une amorce de séparation ; cela signifie que les protéines sont peu influencées par la technique d'inclusion.

Pour les échantillons fixés dans le GA, il en va de même, et il est difficile des séparer les trois conditions comme on peut le constater sur la [Figure 11](#) : ACP des échantillons GP (vert), GPd (gris) et GC (rouge) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides., et c'est notamment dû au fait que les GPd sont très dispersés.

En conclusion, nous ne pouvons pas nous baser sur les spectres complets ou sur les spectres des lipides, pour la raison qui a été évoquée plus tôt et qui est renseignée dans la littérature¹⁸ : la paraffine génère des pics dans la zone des lipides, ce qui permet une nette discrimination des échantillons non déparaffinés par rapport aux autres. Il nous faut donc nous concentrer sur les protéines, et là, on peut constater que les échantillons sont plus délicats à séparer, ce qui signifie que les protéines sont peu influencées par le type d'inclusion.

La paraffine n'est cependant pas la seule méthode d'inclusion qui existe, même si c'est la plus utilisée lors d'étude en MO. Il est également possible d'utiliser d'autres type d'inclusion.

Nous pouvons citer par exemple la résine Epoxy, utilisée notamment en microscopie électronique. Grâce à sa miscibilité à l'eau, elle permet de s'affranchir des bains d'alcool qui détruisent les lipides. De plus, le fixateur utilisé lors de cette inclusion est le OsO_4 , qui est un fixateur reconnu pour préserver les lipides.

En termes de méthodes d'inclusion particulière, nous pouvons penser à la celloïdine (solution dans un mélange d'éther et d'éthanol), qui permet une imprégnation des tissus à froid. De plus, grâce à la miscibilité de ses constituants dans l'eau, il y a des chances qu'il n'y ait pas besoin de bain d'alcool pour déshydrater, ce qui permettrait une conservation des lipides. Mais c'est une méthode lente (plusieurs semaines sont nécessaires pour inclure correctement une pièce de dimensions moyennes), et certaines étapes sont de réalisation délicate. De plus, aucun mode opératoire précis n'est disponible dans la littérature¹⁹.

Pour pallier ce problème de durée, une double inclusion en celloïdine et en paraffine est possible. Cette méthode comporte certains avantages de la celloïdine (maintien correct de tissus durs et de consistances variées, possibilité de grandes coupes) et de la paraffine (rapidité, coupes fines...) ²⁰.

Une autre méthode particulière peut être l'utilisation de méthacrylate de glycol (GMA) qui génère un profil immunophénotypique similaire à celui obtenu avec des coupes congelées. L'utilisation de l'incorporation tissulaire de GMA avec fixation dans l'acétone est compatible avec la préservation de l'épitope pour de nombreux réactifs d'anticorps qui sont souvent détruits par des fixateurs de réticulation chimiques (ce qui peut être intéressant pour réaliser une ELISA par exemple). Le GMA est une résine d'incorporation miscible à l'eau, ce qui permet de conserver les lipides²¹.

Impact du déparaffinage

Pour étudier l'influence du déparaffinage, nous avons étudié les échantillons fixés par le PFA et inclus dans la paraffine (PP et PPd), et les échantillons fixés par le GA et inclus en paraffine (GP et GPd). Nous les avons observés d'abord sur le spectre complet, puis sur la zone des lipides, et enfin sur la zone des protéines.

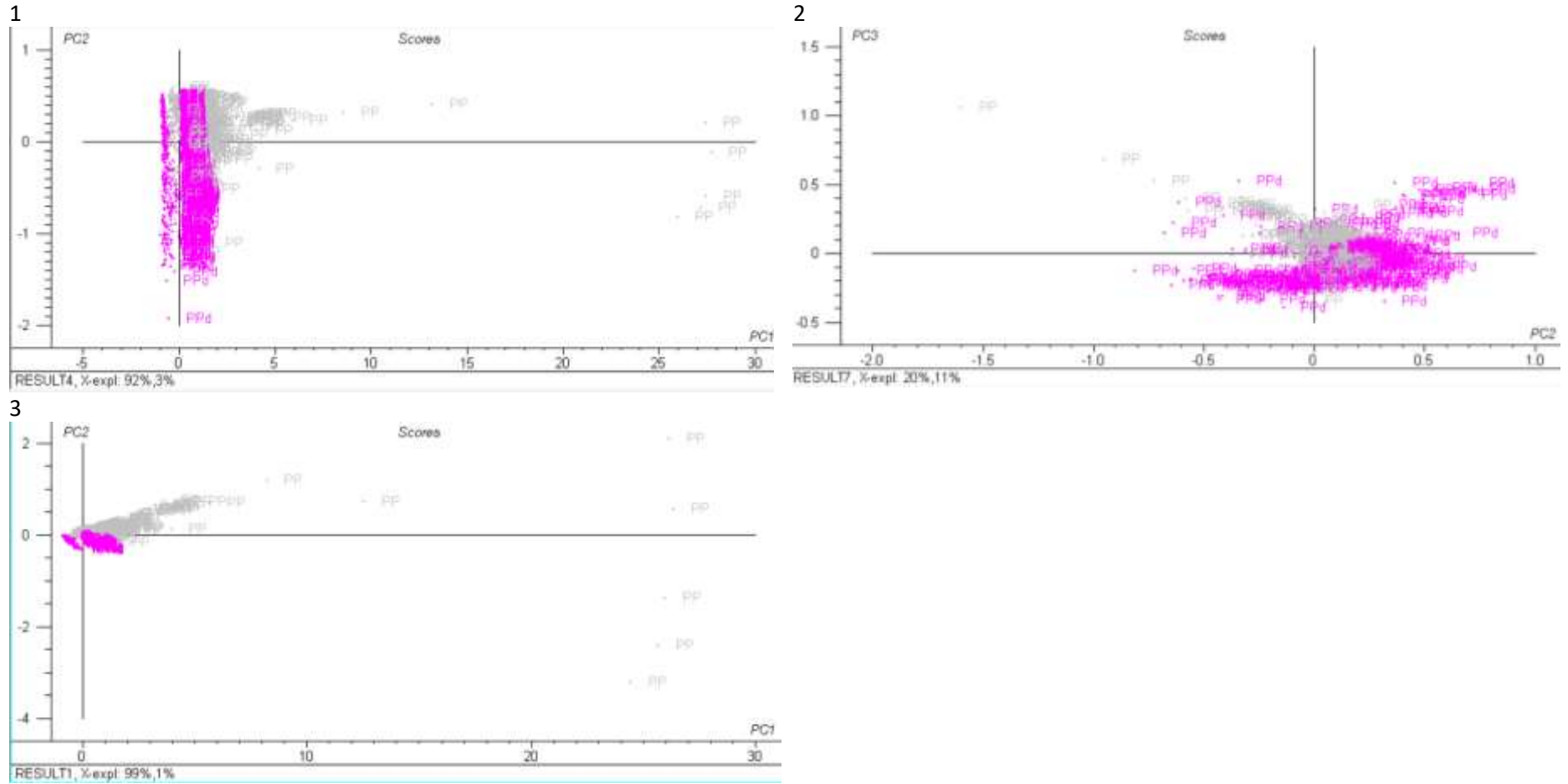


Figure 12 : ACP des échantillons PP (gris) et PPd (rose) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.

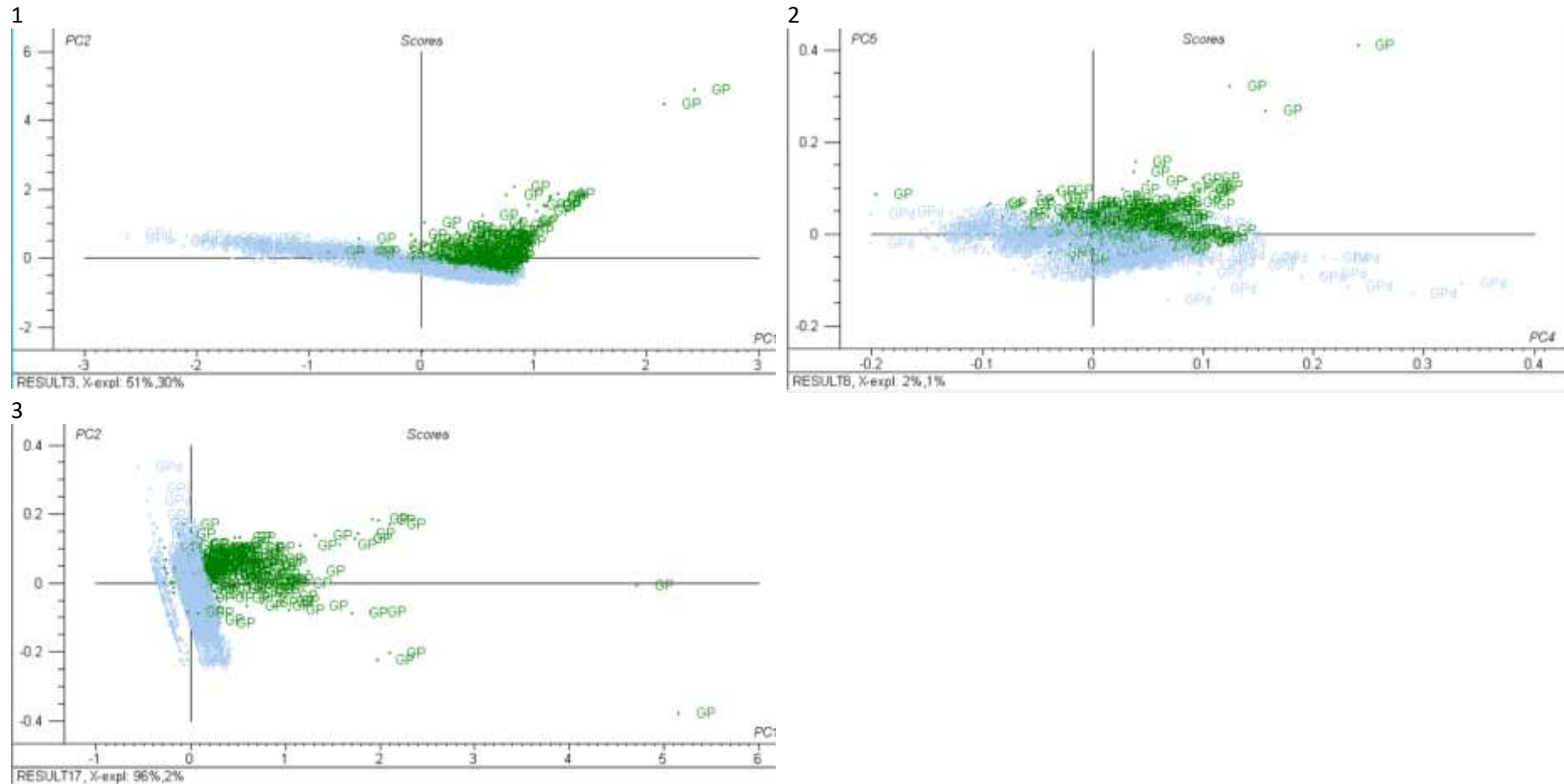


Figure 13 : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.

L'ACP réalisée sur le spectre complet ($675\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) ou sur la zone des lipides ($2800\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$) montre qu'il est très aisé de séparer les PPd des PP (respectivement [Figure 12 : ACP des échantillons PP \(gris\) et PPd \(rose\)](#) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.) ainsi que de séparer les GPd des GP (respectivement [Figure 13 : ACP des échantillons GP \(vert\) et GPd \(bleu pâle\)](#) sur), à cause des pics générés par la paraffine ; de plus, les échantillons PP sont bien plus dispersés que les PPd, et les GP sont bien plus dispersés que les GPd.

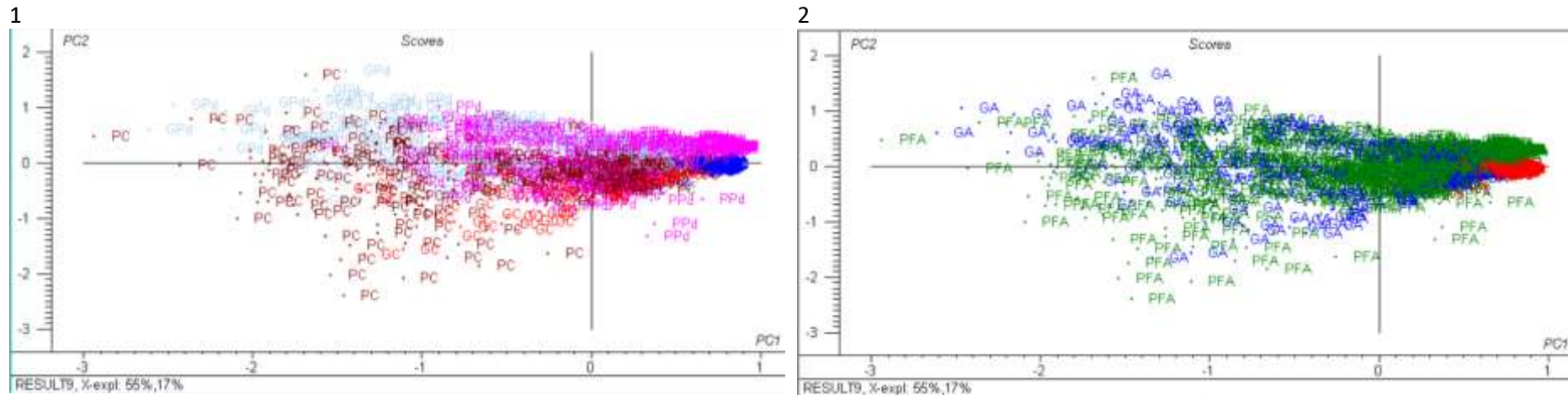
L'ACP réalisée sur la zone des protéines ($1450-1830\text{ cm}^{-1}$) montre qu'en revanche, les échantillons paraffinés et déparaffinés sont plus délicats à séparer puisqu'on a exclu la zone des lipides, que ce soit pour les échantillons fixés par le PFA (**Figure 12** : ACP des échantillons PP (gris) et PPD (rose) sur (1) spectre complet (2) zone des protéines (3) zone des lipides.) ou par le GA (**Figure 13** : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur).

Le déparaffinage semble permettre de diminuer la dispersion engendrée par la paraffine ; si une inclusion en paraffine est nécessaire, il peut être intéressant de déparaffiner l'échantillon avant de procéder à une FTIR.

Qu'est-ce qui est plus semblable à la cryofixation ?

Les résultats suivants montrent les échantillons cryofixés, doublement inclus (GC et PC) et les échantillons inclus en paraffine puis déparaffinés (PPd et GPd) sur spectre complet (**Figure 14**), sur la zone des protéines (**Figure 15**) et sur la zone des lipides (**Figure 16**).

Spectre complet



3

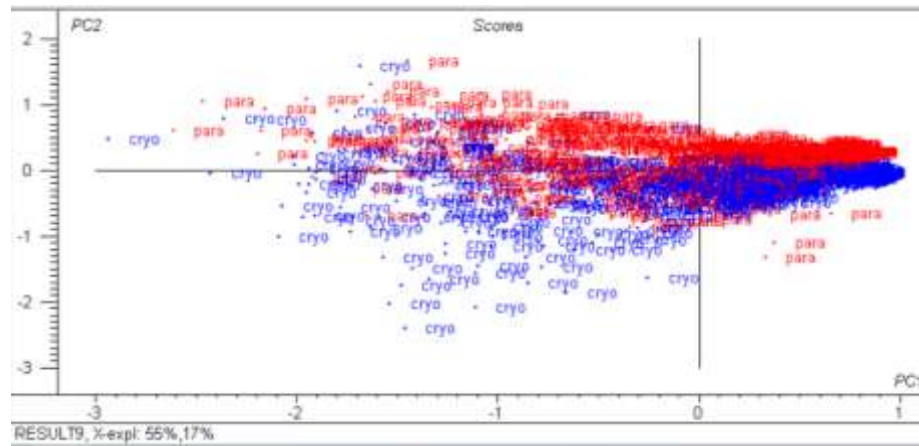
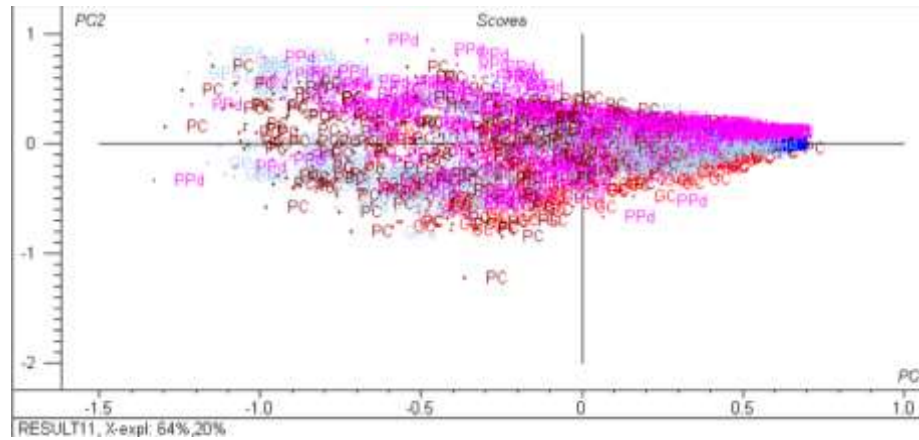


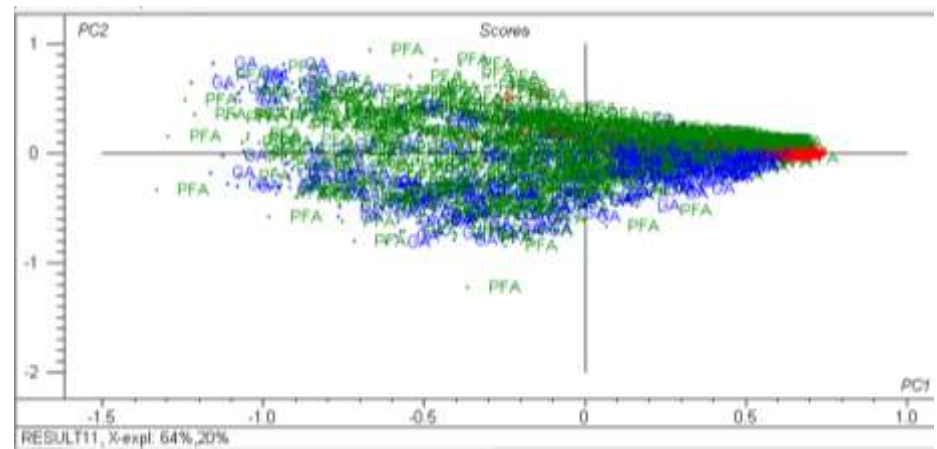
Figure 14 : ACP des échantillons C, PC, PpD, GC, GpD sur tout le spectre (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeaux, PpD en rose, GC en rouge et GpD en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge).

Zone des protéines

1



2



3

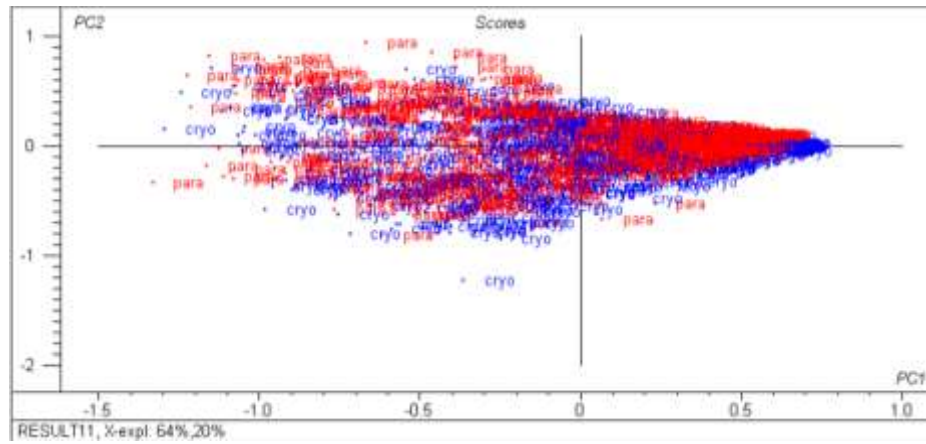
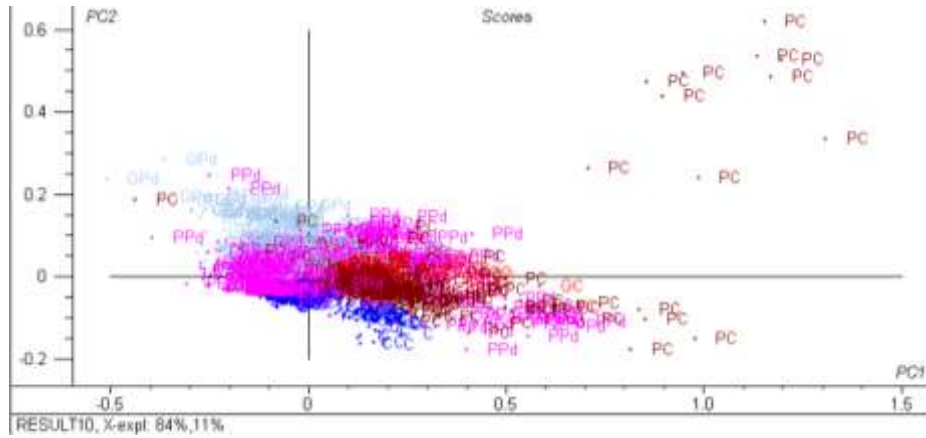


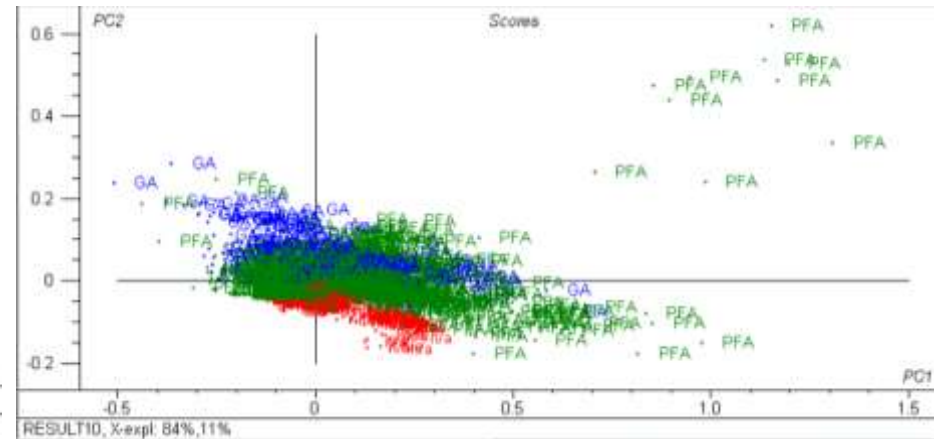
Figure 15 : ACP des échantillons C, PC, PpD, GC, GpD sur la zone des protéines (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeaux, PpD en rose, GC en rouge et GpD en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge).

Zone des lipides

1



2



3

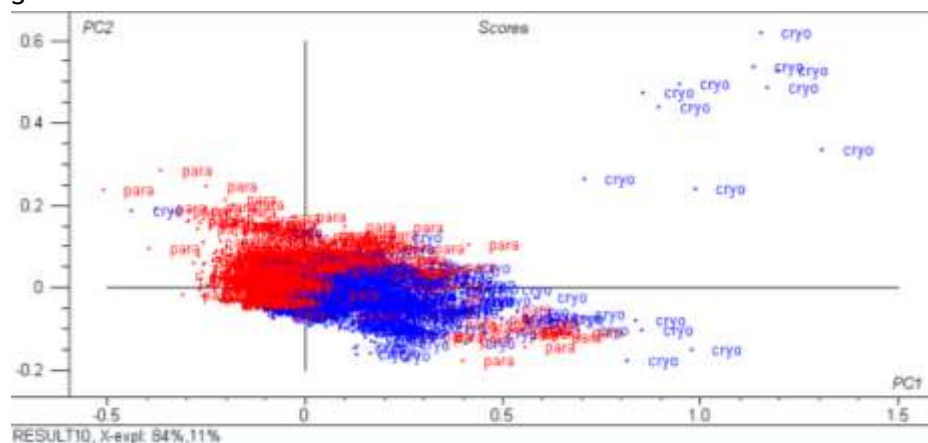


Figure 16 : ACP des échantillons C, PC, PPd, GC, GPd sur la zone des lipides (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeaux, PPd en rose, GC en rouge et GPd en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge).

L'ACP réalisée sur le spectre complet ($675\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) montre clairement une dichotomie entre cryofixés et inclus en paraffine sur la [Figure 14](#) : ACP des échantillons C, PC, PPd, GC, GPd sur tout le spectre (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeaux, PPd en rose, GC en rouge et GPd en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge)., donc *a priori* le plus proche de C serait PC ou GC. Au regard des [Figure 14 : ACP des échantillons](#) C, PC, PPd, GC, GPd sur tout le spectre (1) séparé par traitement (C en bleu, PC en bordeaux, PPd en rose, GC en rouge et GPd en bleu pâle), (2) séparé par fixateur (GA en bleu, PFA en vert, aucun en rouge), (3) séparé en fonction de l'inclusion (cryofixés en bleu, inclus en paraffine en rouge)., le GC semblerait le plus optimal, car il est moins dispersé, et semble plus correspondre au C selon la PC2. Pour rappel, le PFA est un mono-aldéhyde, et le GA un di-aldéhyde ; le GA peut former un réseau réticulé plus solide et plus serré que le PFA¹³, ce qui pourrait expliquer la moins grande disparité des résultats obtenus en fixation par le GA.

Ensuite, l'ACP réalisée sur la zone des protéines ($1450\text{-}1830\text{ cm}^{-1}$) montre clairement une dichotomie entre cryofixés et inclus en paraffine sur la [Figure 15](#) : ACP des , donc *a priori* le plus proche de C serait PC ou GC ; si on se base sur la PC2. En revanche, en se basant sur la [Figure 15](#) : ACP des , le plus proche du C est un échantillon fixé par le PFA (PPd ou PC donc), et enfin, selon la [Figure 15](#) : ACP des , sur le spectre des protéines, l'échantillon le plus proche du C est le PPd. Il a néanmoins l'inconvénient d'être très dispersés, et donc, sur un nombre plus réduit de points, il est possible d'être assez éloigné de C. Le second échantillon le plus proche de C est le GC, qui a l'avantage de ne pas être aussi dispersé que le PPd.

Enfin, l'ACP réalisée sur la zone des lipides ($2800\text{-}3030\text{ cm}^{-1}$) montre une dichotomie entre cryofixés et inclus en paraffine sur la [Figure 16](#) : ACP des , donc *a priori* le plus proche de C serait PC ou GC. Selon les [Figure 16 : ACP des](#) , les deux fixateurs impactent différemment les lipides, et les échantillons inclus dans

le PFA (PPd et PC) sont plus proches de ceux qui ont été seulement cryofixés que ceux inclus dans le GA (GPd et GC). Cependant, on sait que l'inclusion en paraffine comporte des bains d'alcool de degré croissant, et donc, si la molécule d'intérêt est un lipide, il est plus intéressant de ne pas passer par l'inclusion en paraffine, même s'il est possible de déparaffiner par la suite. La condition qui se rapproche le plus de C pour observer des lipides est donc le PC.

Conclusion

L'objectif de ce travail était d'investiguer si l'inclusion en paraffine, agressive pour l'échantillon mais qui préserve bien la structure tissulaire, permet d'acquérir des signaux IR exploitables pour caractériser *in situ* la composition du tissu et la structure macromoléculaire des protéines musculaires, comme on peut le faire sur des coupes à congélation.

Pour les études histologiques, les échantillons qui ont été doublement fixés présentent de larges espaces intercellulaires qui induisent un biais sensible pour les études morphologiques. Les échantillons fixés chimiquement puis inclus en paraffine ne présentent pas ces espaces intercellulaires. Pour faire de l'observation morphologique, une fixation chimique et une inclusion en paraffine sont les équivalentes à une cryofixation.

Pour les analyses en microspectroscopie, bien que la méthode d'inclusion en paraffine extraie les lipides, elle reste utilisable pour analyser les autres composants en FTIR dont les protéines, à condition de déparaffiner. Cependant, une inclusion en paraffine altère l'ultrastructure, et, si une cryofixation classique n'est pas envisageable pour une contrainte technique, une fixation chimique suivie d'une cryofixation dans les heures/jours suivants offre une alternative acceptable. Ainsi, le GA est le fixateur chimique qui fournit les résultats les plus proches de la cryofixation si les molécules d'intérêt sont des protéines, alors que le PFA est le plus adapté pour une caractérisation des lipides.

Références

1. Bunaciu AA, Hoang VD, Aboul-Enein HY. Applications of FT-IR Spectrophotometry in Cancer Diagnostics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 3 avr 2015;45(2):156-65.
2. Bunaciu AA, Fleschin S, Aboul-Enein HY. Biomedical Investigations Using Fourier Transform-Infrared Microspectroscopy. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 3 juill 2014;44(3):270-6.
3. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues: *Applied Spectroscopy Reviews: Vol 43, No 2* [Internet]. [cité 22 juin 2022]. Disponible sur: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704920701829043>
4. Huleihel M, Salman A, Erukhimovitch V, Ramesh J, Hammody Z, Mordechai S. Novel spectral method for the study of viral carcinogenesis in vitro. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 4 janv 2002;50(2):111-21.
5. Romeo M, Mohlenhoff B, Diem M. Infrared micro-spectroscopy of human cells: Causes for the spectral variance of oral mucosa (buccal) cells. *Vibrational Spectroscopy*. 18 oct 2006;42(1):9-14.
6. Ellis DI, Goodacre R. Metabolic fingerprinting in disease diagnosis: biomedical applications of infrared and Raman spectroscopy. *Analyst*. 24 juill 2006;131(8):875-85.
7. Zohdi V, Whelan DR, Wood BR, Pearson JT, Bambery KR, Black MJ. Importance of Tissue Preparation Methods in FTIR Micro-Spectroscopical Analysis of Biological Tissues: 'Traps for New Users'. *PLOS ONE*. 24 févr 2015;10(2):e0116491.
8. Yao J, Li Q, Zhou B, Wang D, Wu R. Advantages of infrared transfection micro spectroscopy and paraffin-embedded sample preparation for biological studies. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 15 avr 2018;195:25-30.
9. Faoláin EÓ, Hunter MB, Byrne JM, Kelehan P, Lambkin HA, Byrne HJ, et al. Raman Spectroscopic Evaluation of Efficacy of Current Paraffin Wax Section Dewaxing Agents. *J Histochem Cytochem*. 1 janv 2005;53(1):121-9.
10. Verdonck M, Wald N, Janssis J, Yan P, Meyer C, Legat A, et al. Breast cancer and melanoma cell line identification by FTIR imaging after formalin-fixation and paraffin-embedding. *Analyst*. 17 juin 2013;138(14):4083-91.
11. Verdonck M, Denayer A, Delvaux B, Garaud S, Wind RD, Desmedt C, et al. Characterization of human breast cancer tissues by infrared imaging. *Analyst*. 4 janv 2016;141(2):606-19.
12. Pearse AGE. *Histochemistry, theoretical and applied*. Volume 1, Preparative and optical technology. 4th ed. Churchill Livingstone; 1980.
13. Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microscopy Today*. 2000;1:8-12.
14. Gustavson KH. The Chemistry of Tanning Processes. *Science*. 1956;124:36-42.
15. Helander KG. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem*. mai 1994;69(3):177-9.
16. Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol*. avr 1963;17:19-58.
17. A.Kohler et al. Optimizing Savitzky-Golay parameters for improving spectral resolution and quantification in infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc*. 2005;707:59.
18. Jedani SA, Smith C, Gunning P, Ellis BG, Gardner P, Barrett SD et al. A de-waxing methodology for scanning probe microscopy. *Anal. Methods*. 2020;3397:7.
19. Lozano M, Rodriguez-Ulibarri P, Echeverria JC, Beriain MJ. Mid-Infrared Spectroscopy (MIR) for Simultaneous Determination of Fat and Protein Content in Meat of Several Animal Species. *Food Analytical Methods*. 2017;3462:10.
20. Heinsen H, Arzberger T, Schmitz C. Celloidin mounting (embedding without infiltration) - a new, simple and reliable method for producing serial sections of high thickness through complete human brains and its application to stereological and immunohistochemical investigations. *J Chem Neuroanat*. oct 2000;20(1):49-59.
21. Pinto AJW, de Amorim IFG, Pinheiro LJ, Madeira IMVM, Souza CC, Chiarini-Garcia H, et al. Glycol methacrylate embedding for the histochemical study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Eur J Histochem*. 26 oct 2015;59(4):2546.

Annexes

Histologie

Inclusion en paraffine

Tableau 4 : Programme utilisé par l'automate pour l'inclusion en paraffine

Ethanol 70°	1h
Ethanol 95°	1h
Ethanol 100°	1h30
Ethanol 100°	0h45
Ethanol 100°	0h45
Ethanol 100°	1h
Ottix plus (substitut au xylène)	1h30
Ottix plus	2h
Ottix plus	2h30
Paraffine	1h30
Paraffine	2h

Déparaffinage

Tableau 5 : Bains à effectuer pour déparaffiner les échantillons

Ottix plus	5 min
Ottix plus	5 min
Ethanol 100°	5 min
Ethanol 95°	3 min
Ethanol 70°	3 min
Eau courante	3 min

Coloration

HES

Tableau 6 : Bains à effectuer pour colorer les échantillons avec la coloration HES

Hématoxyline de Harris	6 min	colore les noyaux des cellules en violet
Eau courante	4 min	
Eosine	6 min	colore le cytoplasme des cellules en rose
Passage rapide dans bain d'eau courante		
Ethanol 95°	2 min	
Ethanol 100°	2 min	
Safran alcoolique	7 min	colore le collagène en jaune

Rouge Sirius

Tableau 7 : Bains à effectuer pour colorer les échantillons avec la coloration Rouge Sirius

Acétone	60 min	
Solution picroformalin	10 min	Aldéhyde formique 5%, éthanol 90%, acide picrique saturé
Ethanol 90°	1 min	
H ₂ O	10 min	
Rouge Sirius	60 min	Rouge Sirius 0,1%, éthanol 90%, acide picrique saturé

HCl 0,01 M	5 min	
H ₂ O	1 min	
Ethanol 95°	1 passage	
Ethanol 100°	2 passages	
Méthylcyclohexane	2 passages	

Déshydratation

Tableau 8 : Bains à effectuer pour déshydrater les échantillons

Ethanol 100°	1 min
Ethanol 100°	1 min
Ottix plus	2 min
Ottix plus	2 min

ACP complètes, avec certaines composantes principales et variance expliquées

Note : toutes les légendes se lisent de gauche à droite et de bas en haut.

Impact du fixateur

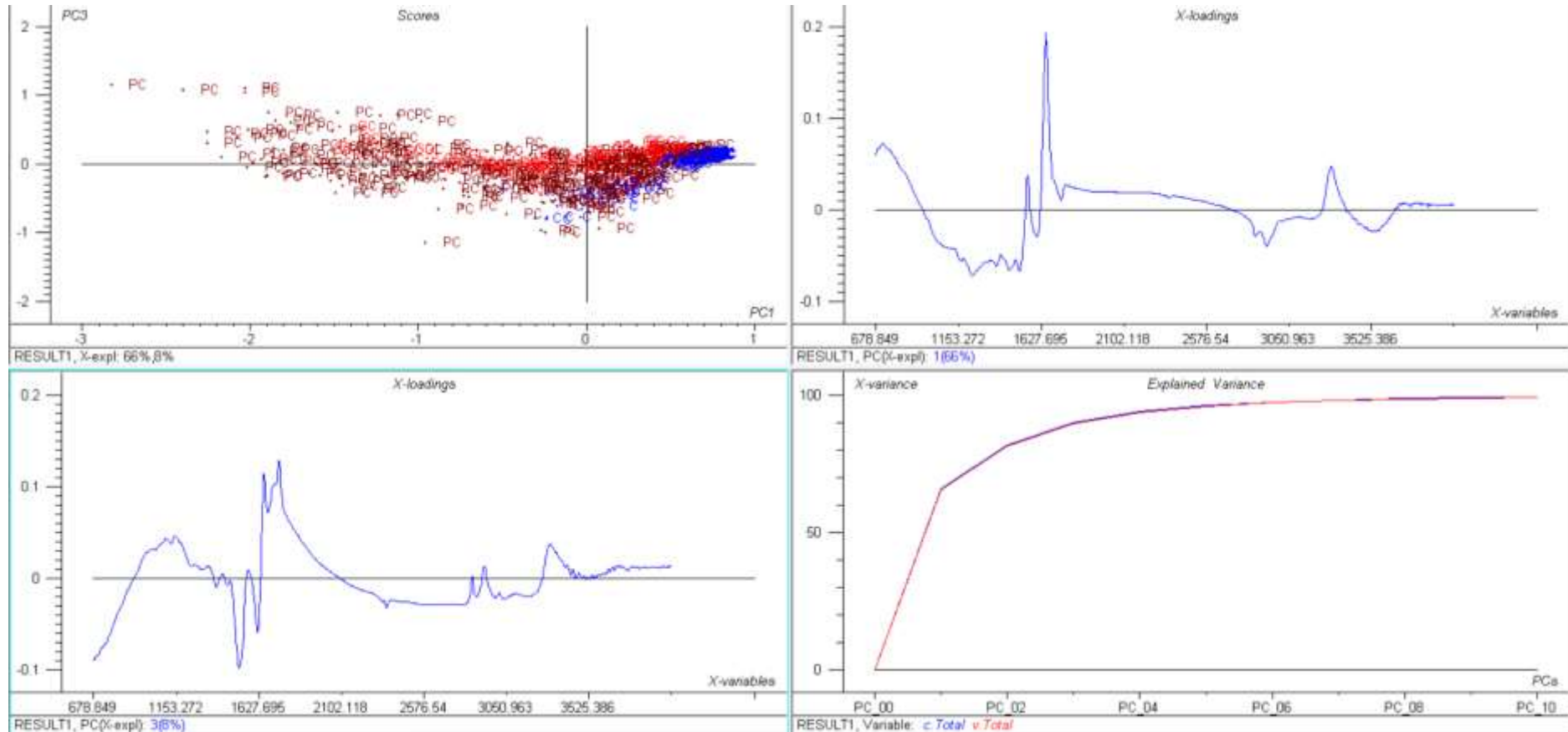


Figure 17 : ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 3 et variance expliquée

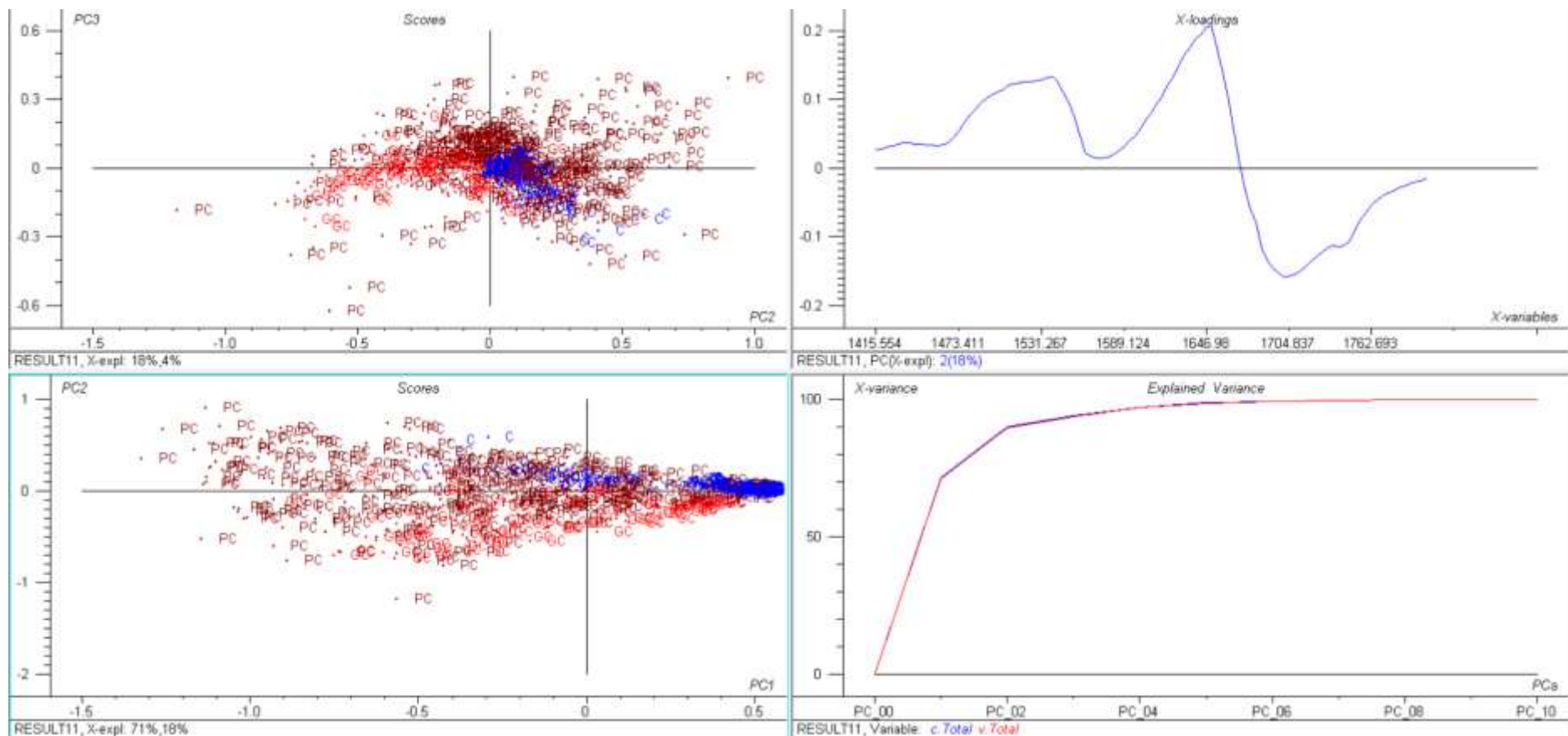


Figure 18 : ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre des protéines, composante principale 2, ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre des protéines et variance expliquée

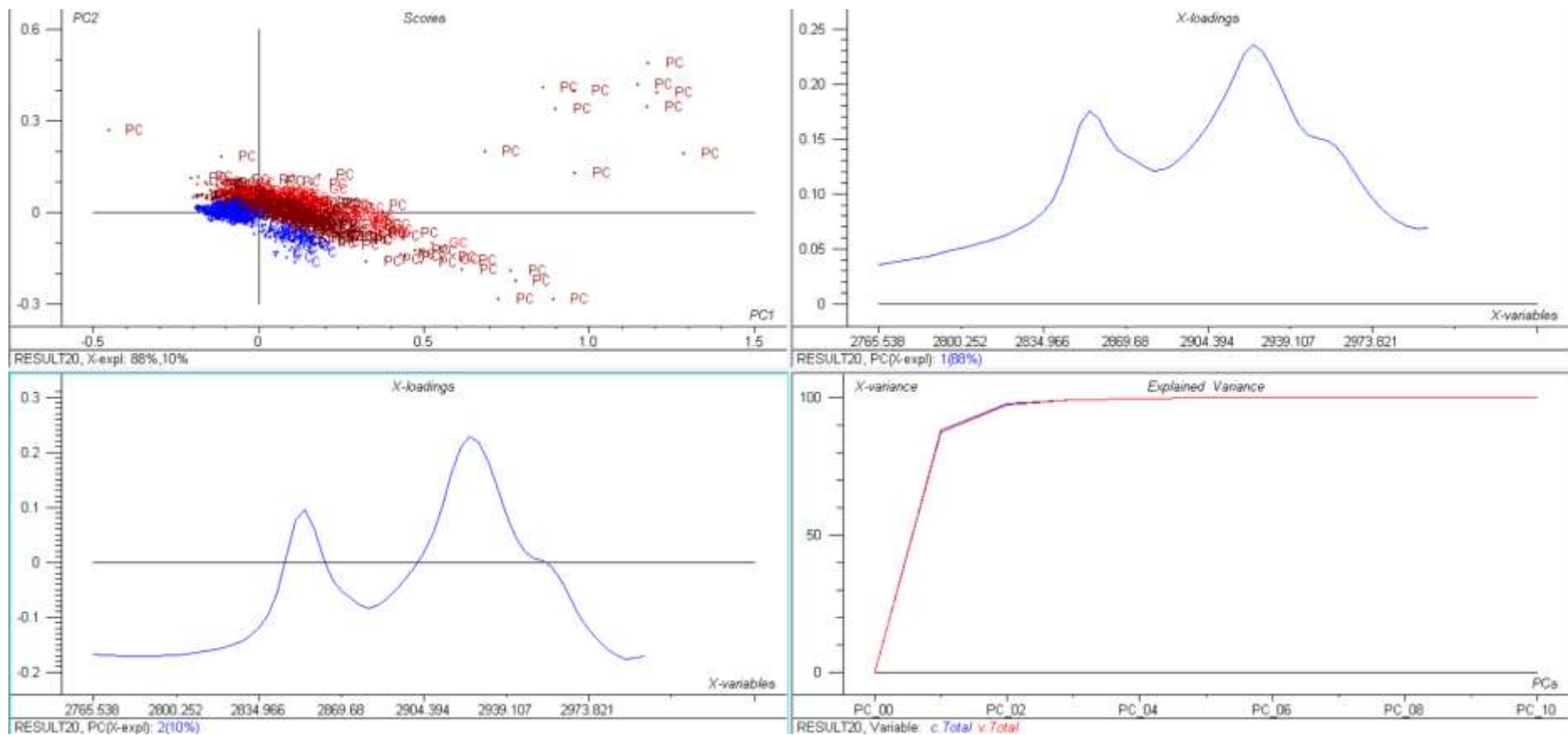


Figure 19 : ACP des échantillons C (bleu), PC (bordeaux) et GC (rouge) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée

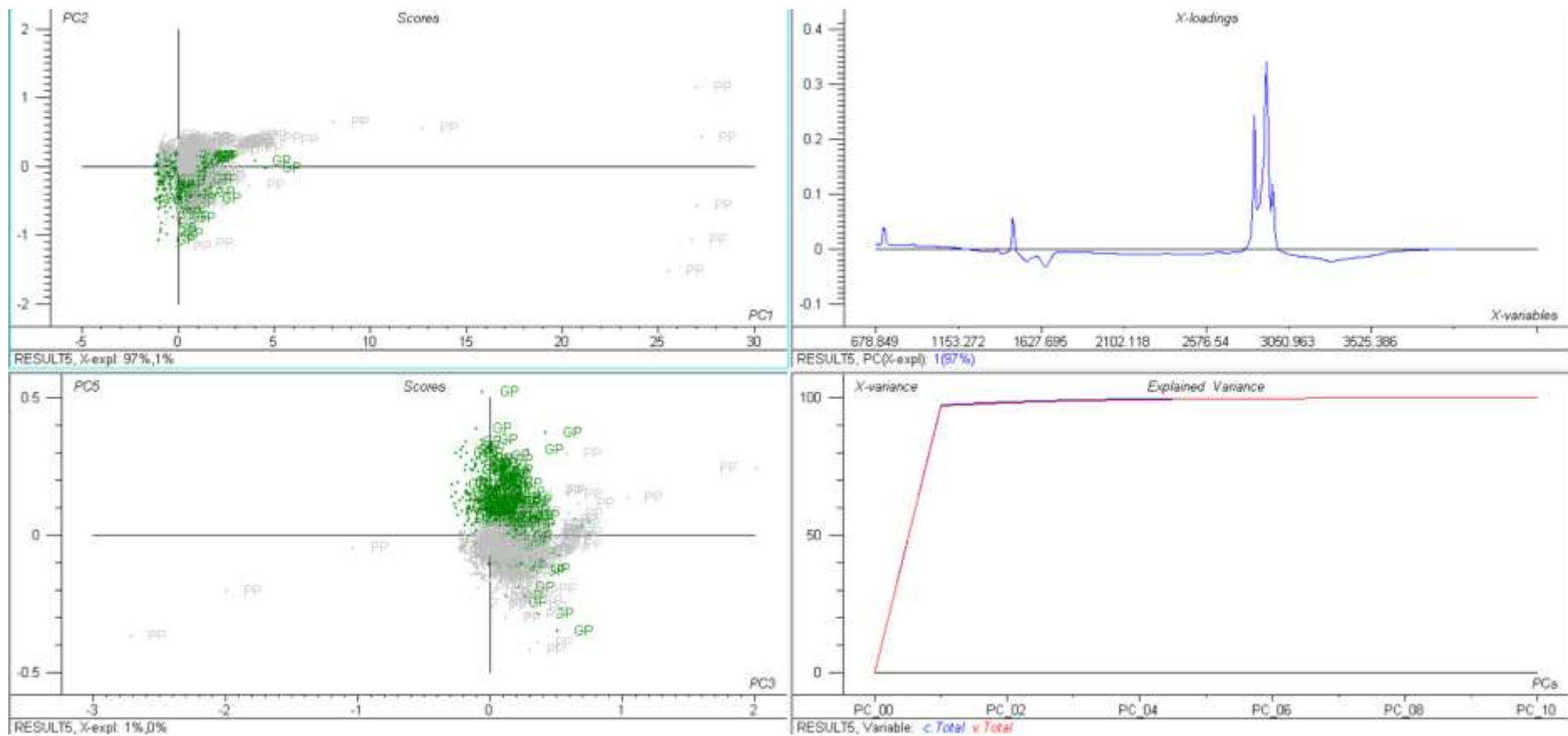


Figure 20 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre complet et variance expliquée

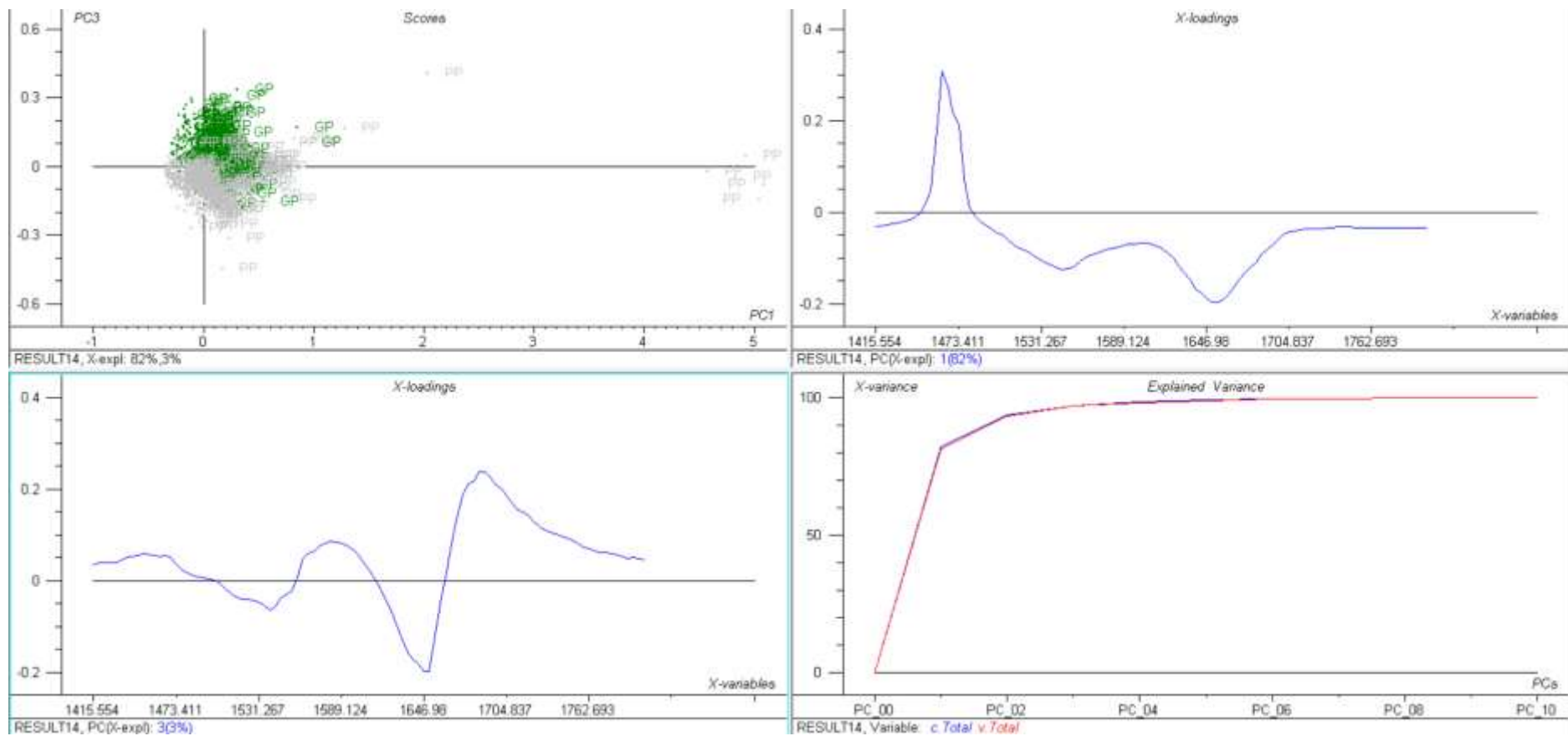


Figure 21 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre des protéines, composante principale 1, composante principale 3 et variance expliquée

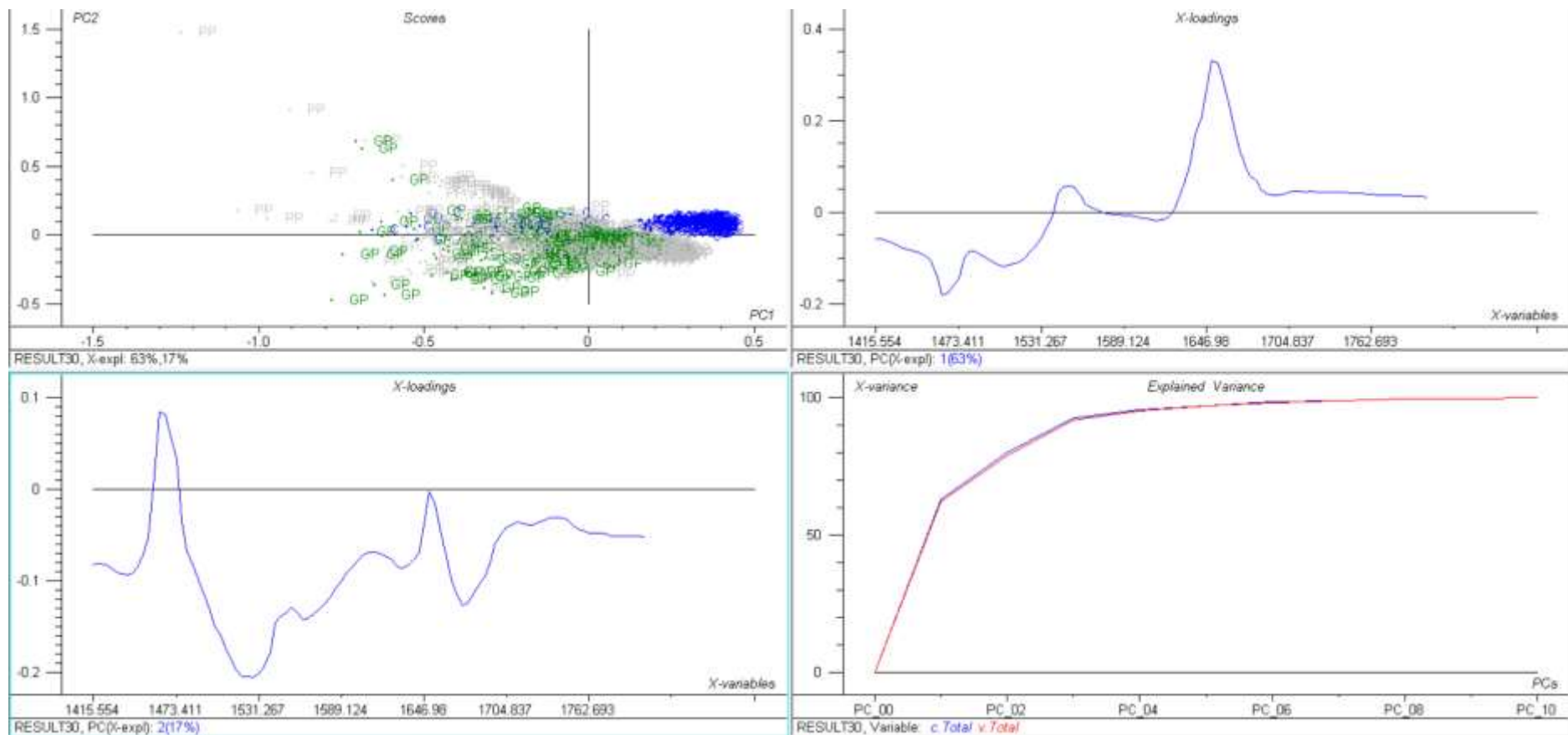


Figure 22 : ACP des échantillons PP (gris), C (bleu) et GP (vert) sur spectre des protéines, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée

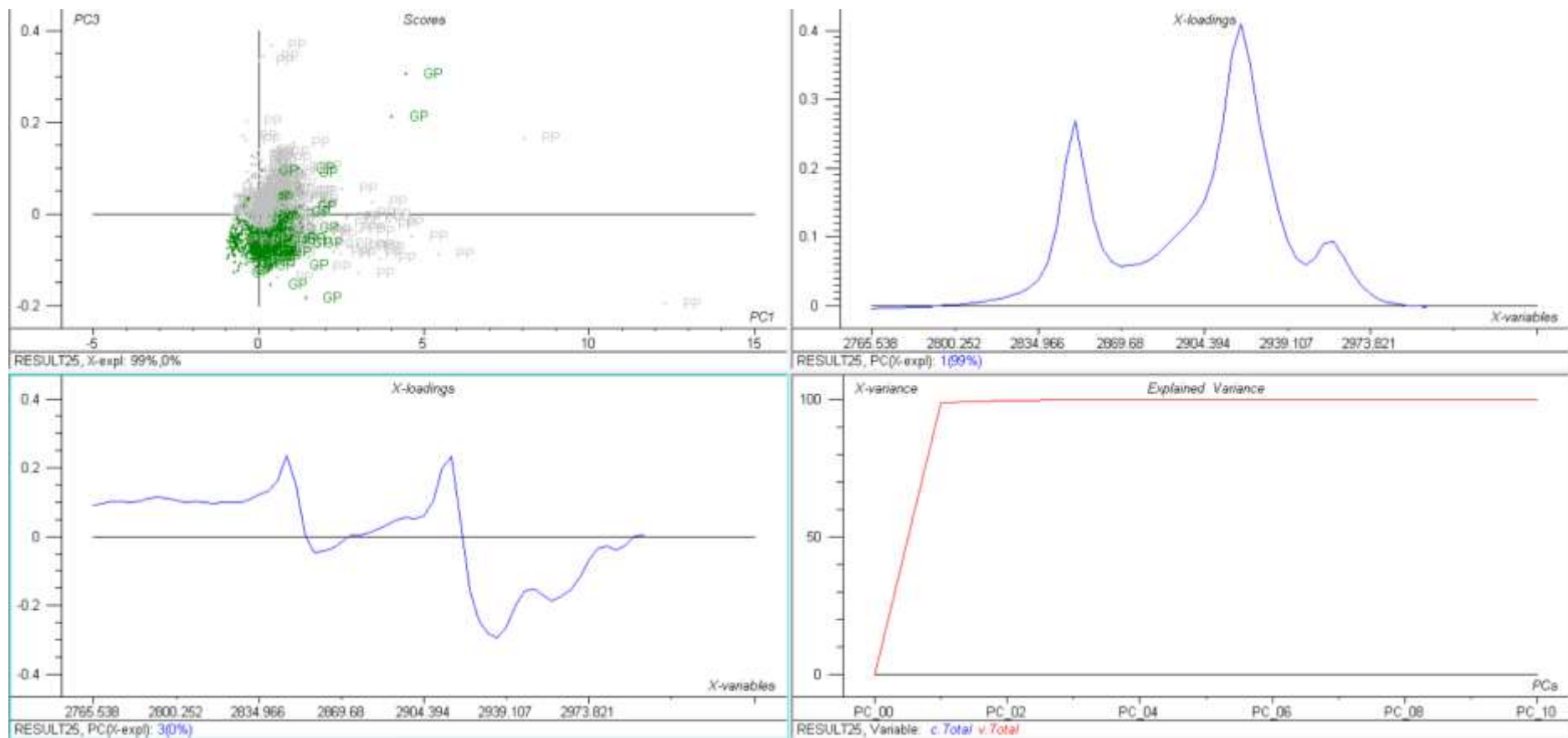


Figure 23 : ACP des échantillons PP (gris) et GP (vert) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 3 et variance expliquée

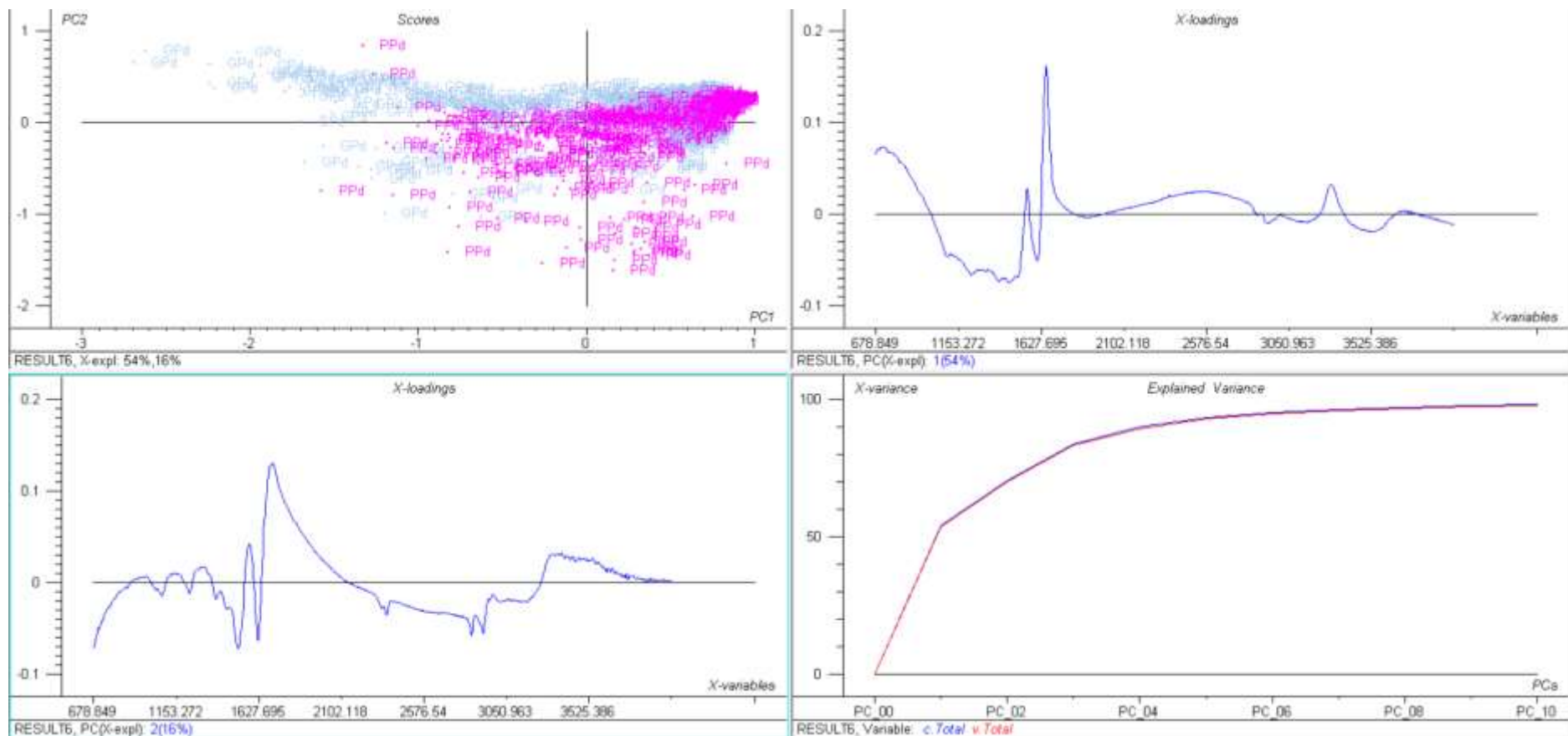


Figure 24 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée

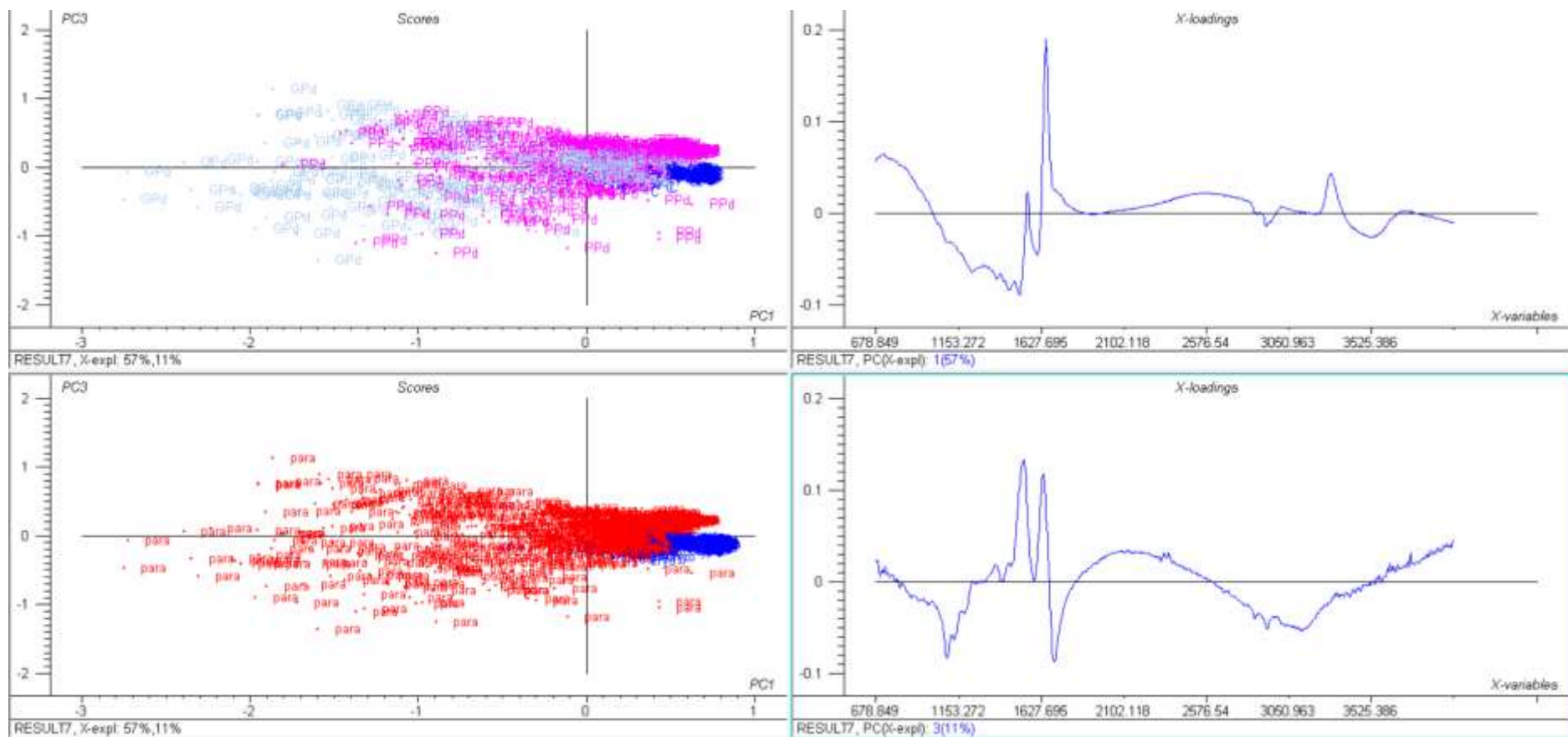


Figure 25 : ACP des échantillons Ppd (rose), C (bleu) et GPd (gris) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre complet et composante principale 3

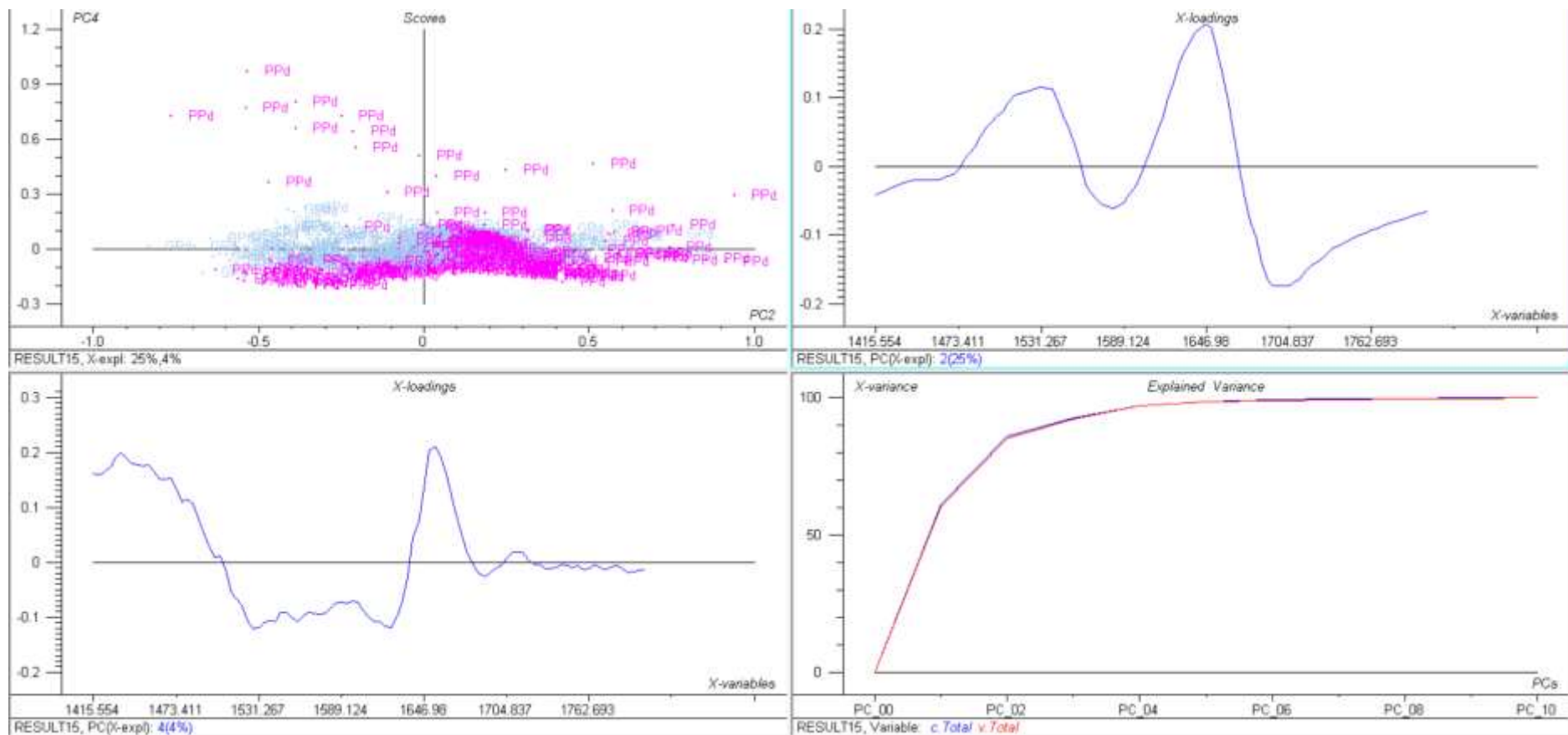


Figure 26 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) sur spectre des protéines, composante principale 2, composante principale 4 et variance expliquée

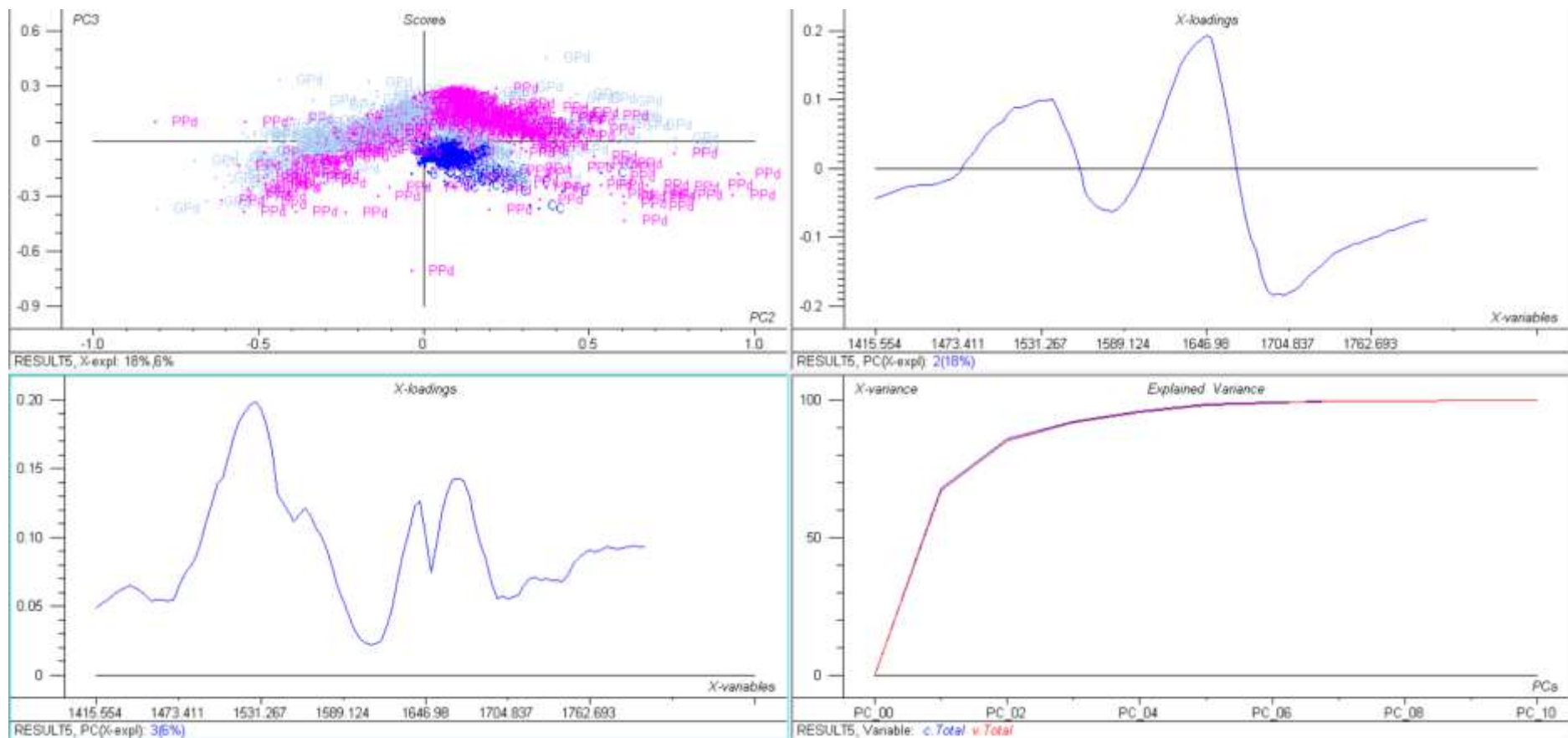


Figure 27 : ACP des échantillons PPd (rose), C (bleu) et GPd (gris) sur spectre des protéines, composante principale 2, composante principale 3 et variance expliquée

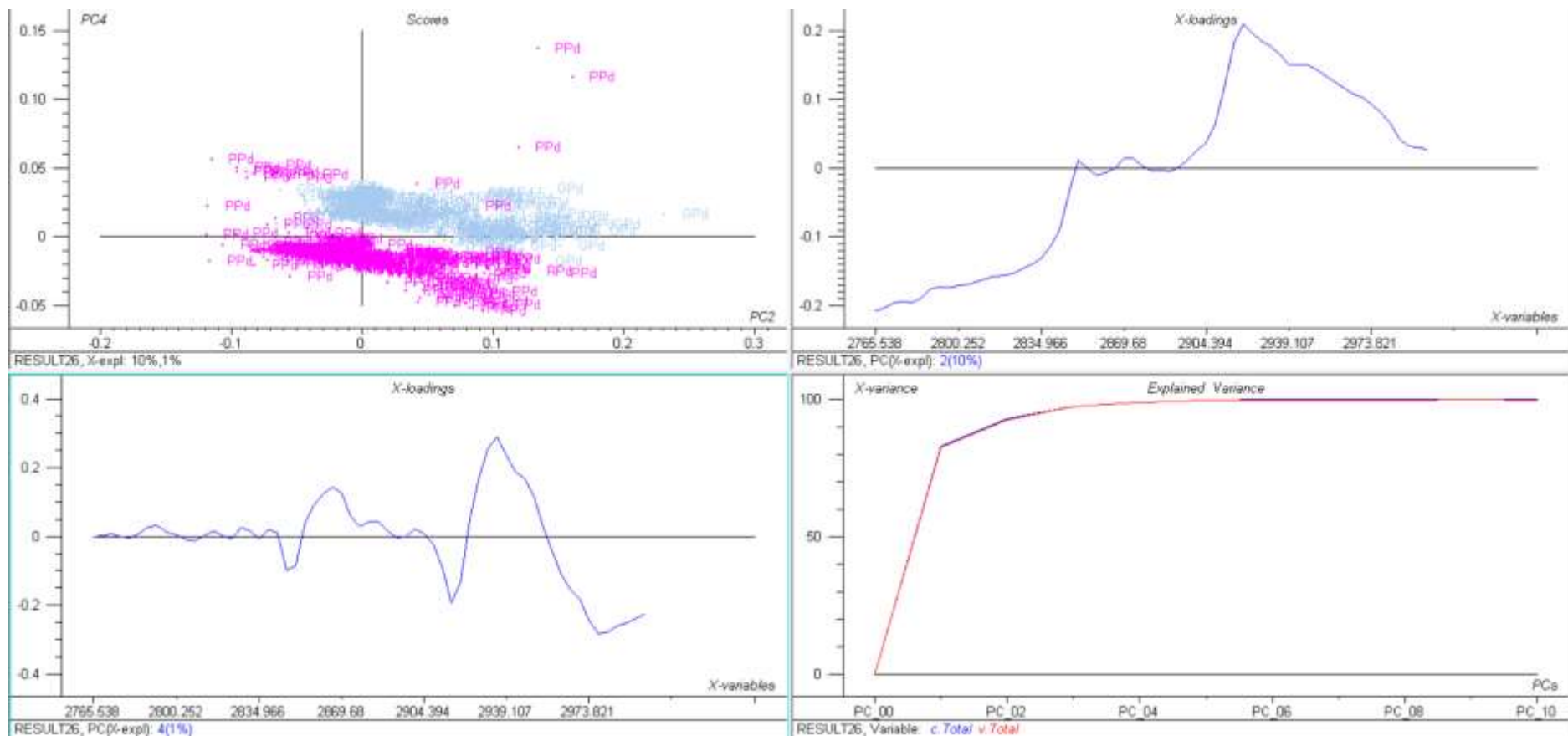


Figure 28 : ACP des échantillons PPd (rose) et GPd (gris) sur spectre des lipides, composante principale 2, composante principale 4 et variance expliquée

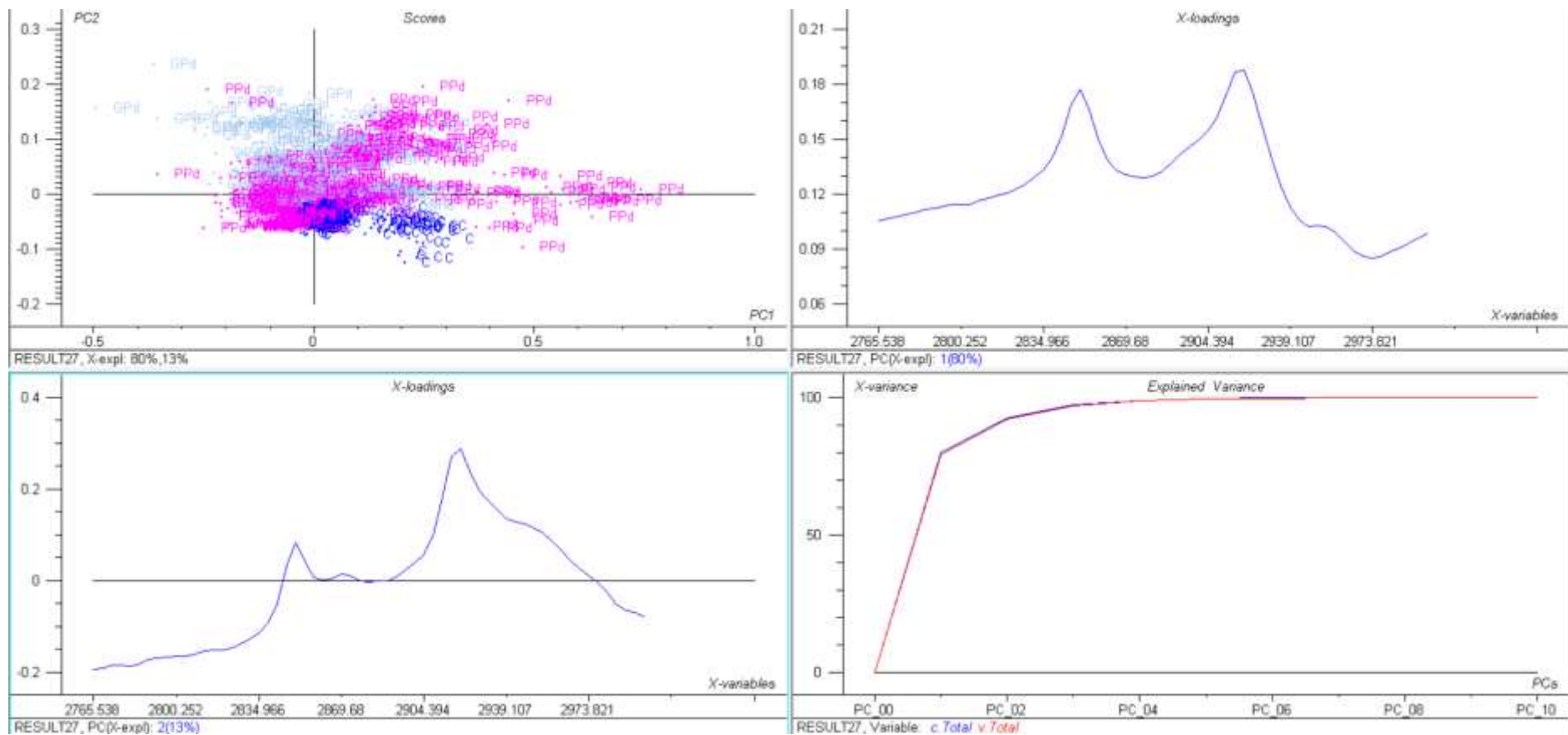


Figure 29 : ACP des échantillons PPd (rose), C (bleu) et GPd (gris) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2 et variance expliquée

Impact de la paraffine

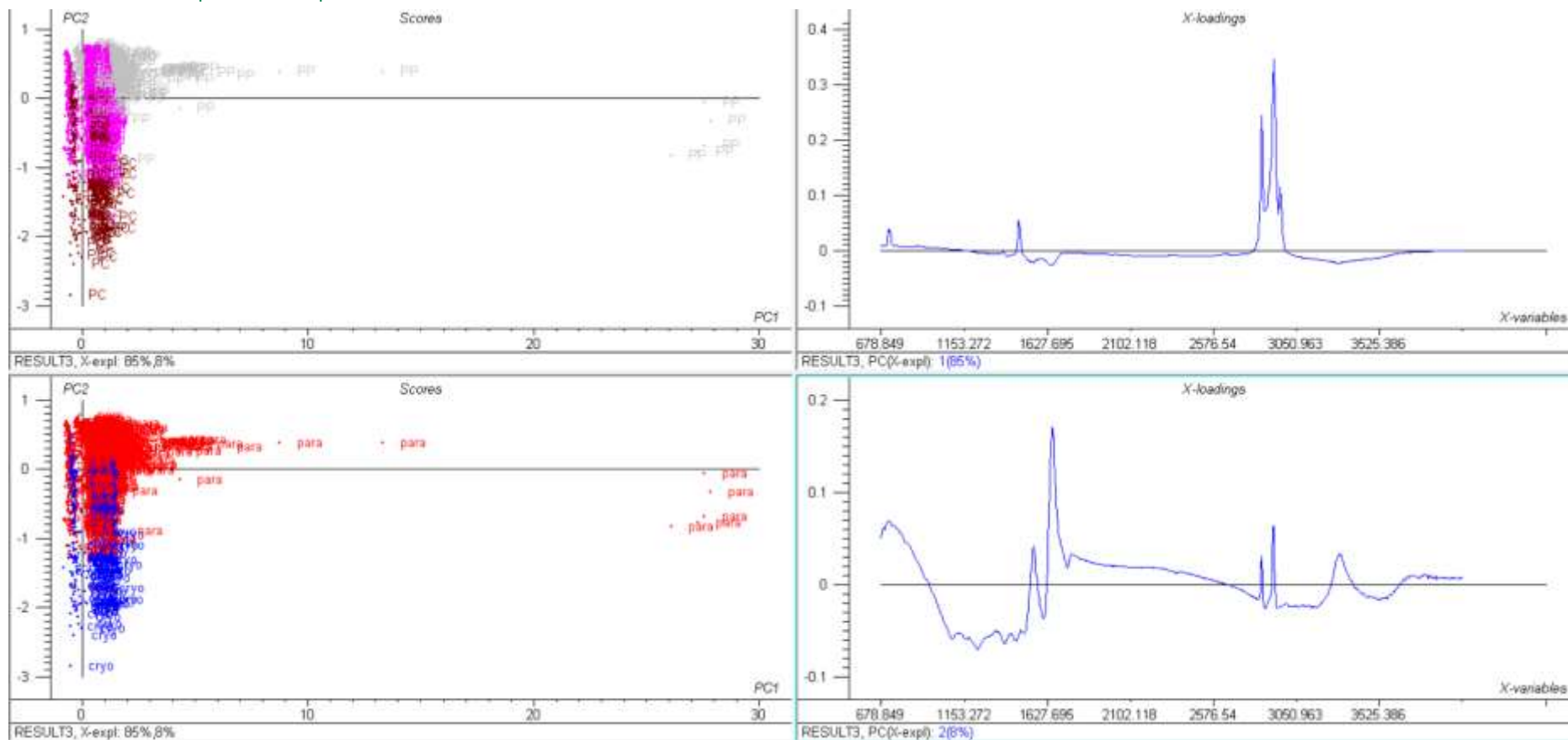


Figure 30 : ACP des échantillons PC (bordeaux), PP (gris) et PPD (rose) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre complet, composante principale 2

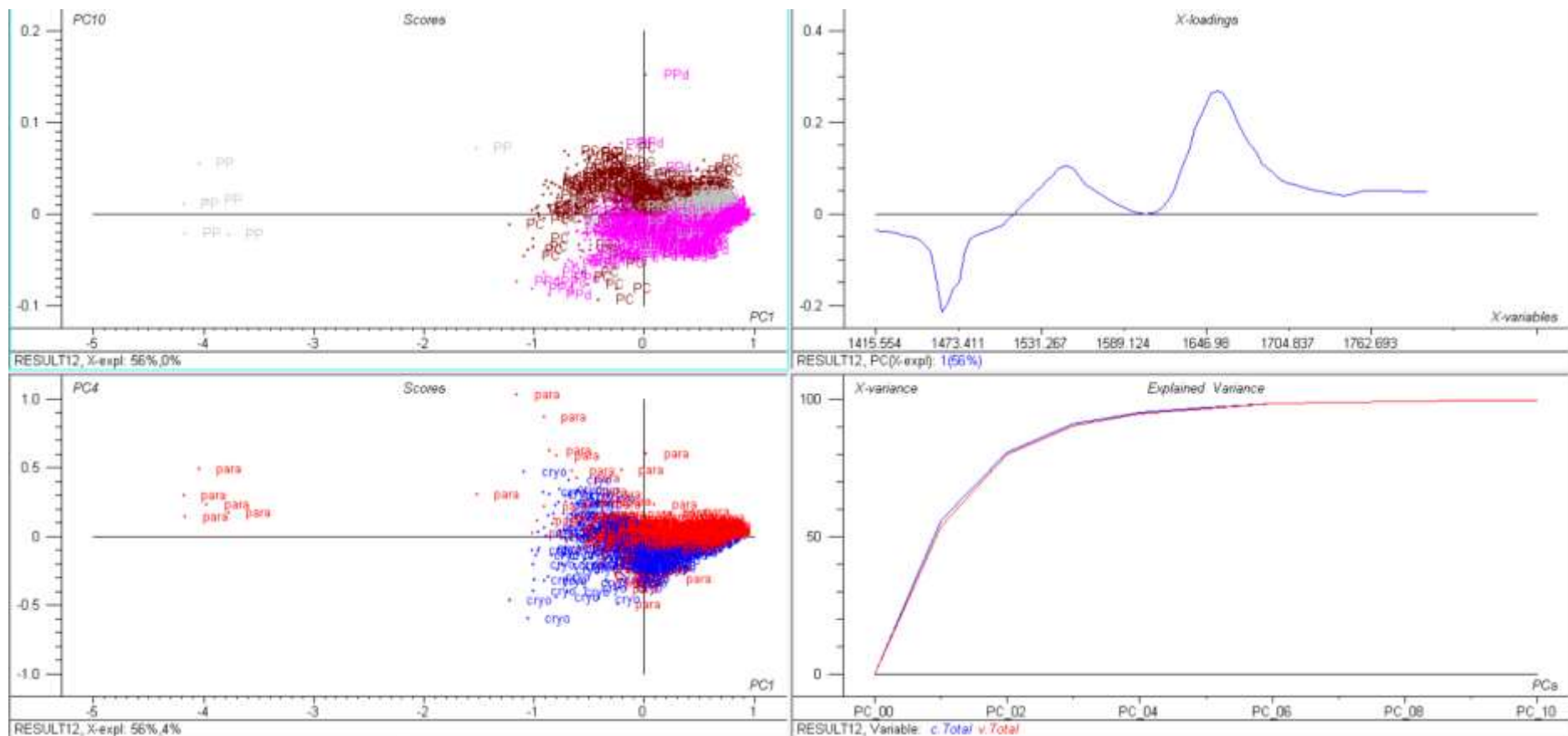


Figure 31 : ACP des échantillons PC (bordeaux), PP (gris) et PPd (rose) sur spectre des protéines, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre des protéines, variance expliquée

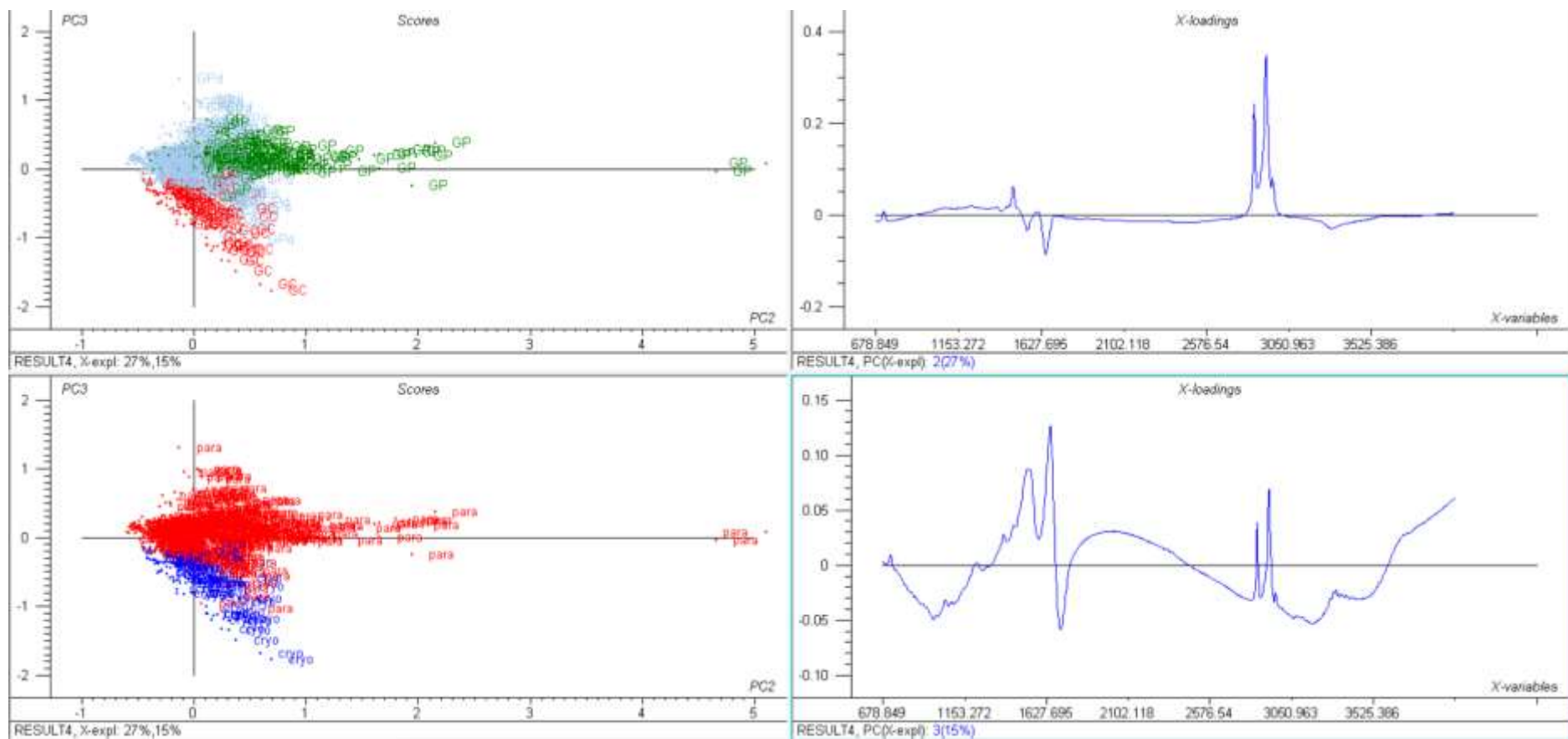


Figure 32 : ACP des échantillons GC (rouge), GP (vert) et GPD (gris) sur spectre complet, composante principale 2, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre complet, composante principale 3

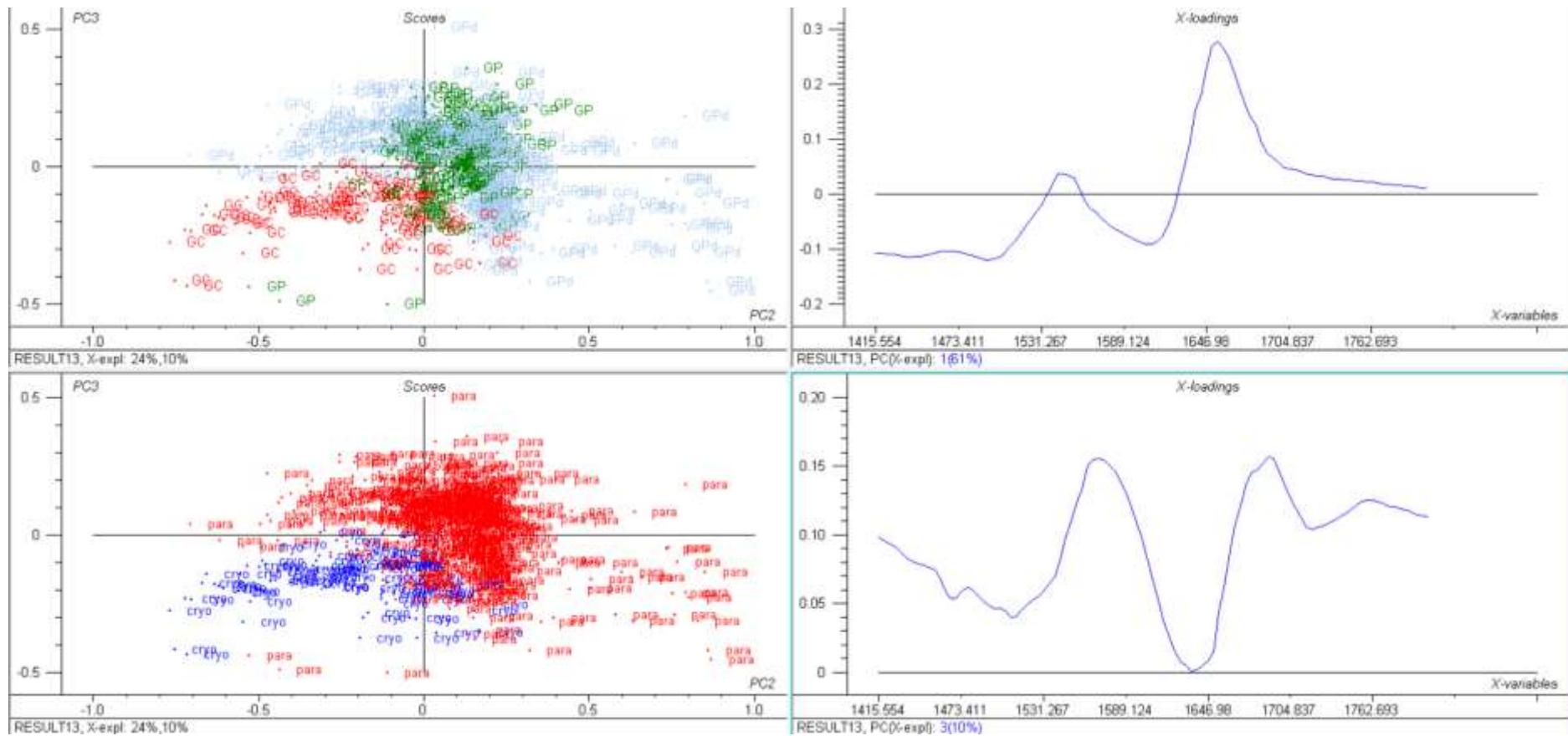


Figure 33 : ACP des échantillons GC (rouge), GP (vert) et GPD (gris) sur spectre des protéines, composante principale 2, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre des protéines, composante principale 3

Impact du déparaffinage

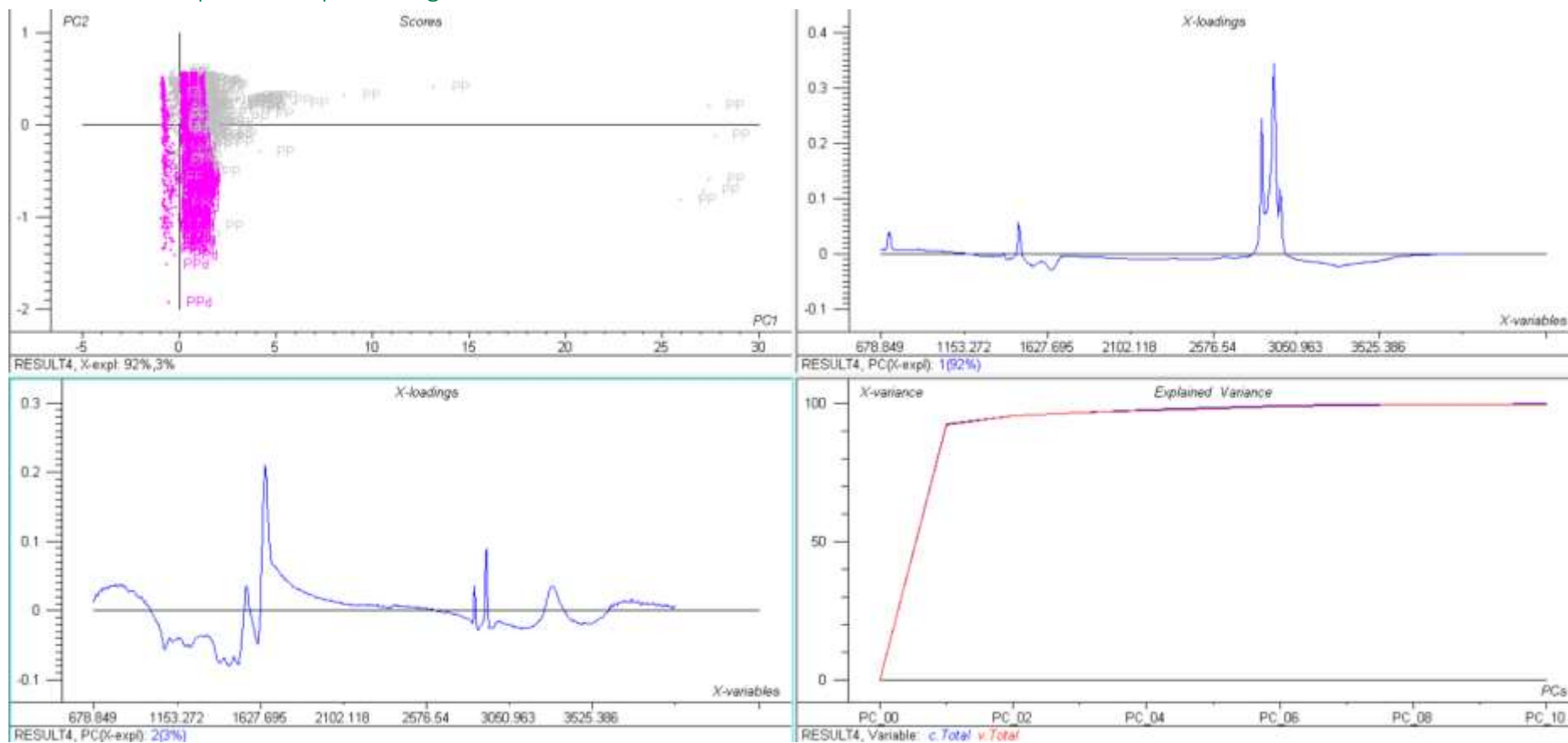


Figure 34 : ACP des échantillons PP (gris) et PPd (rose) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée

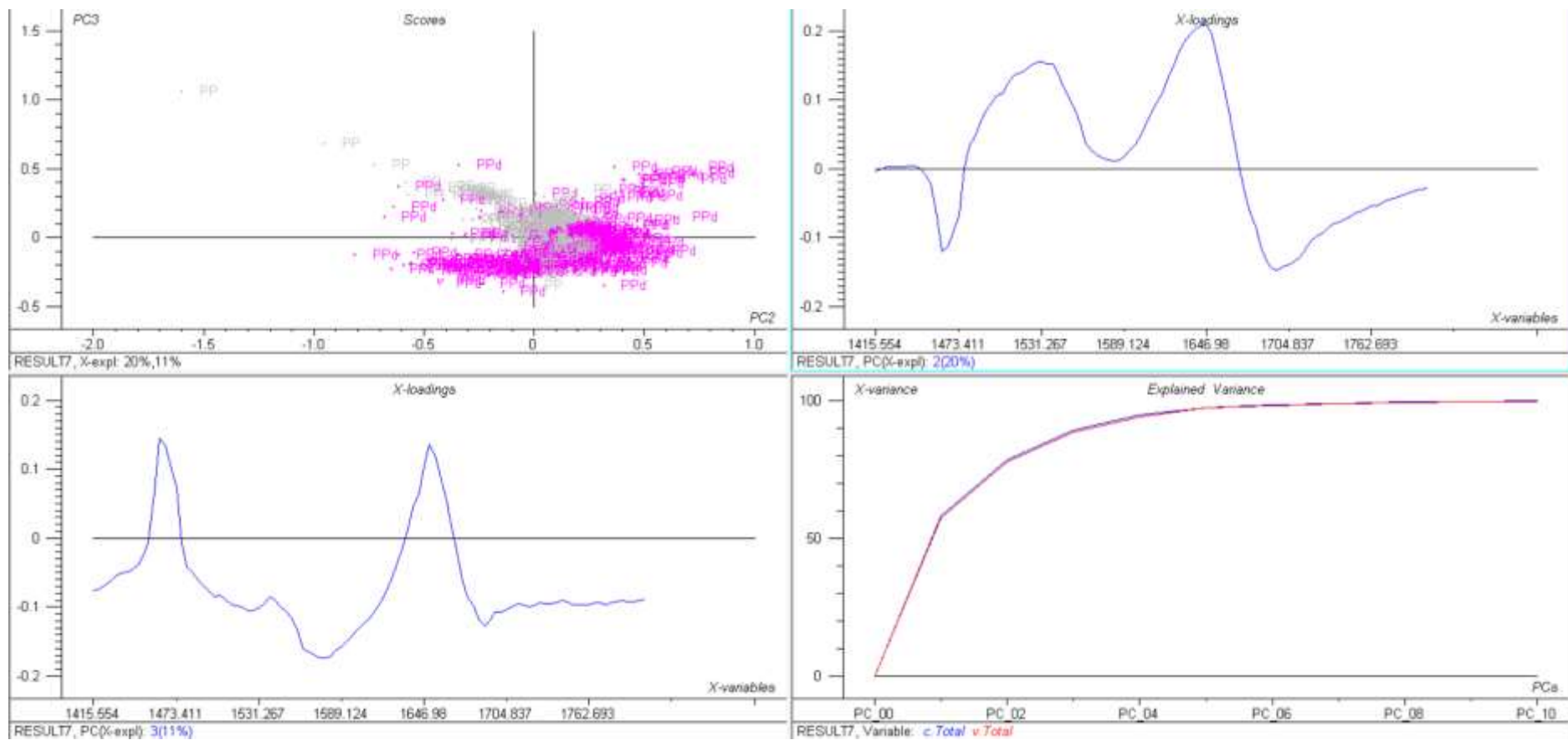


Figure 35 : ACP des échantillons PP (gris) et PPd (rose) sur spectre des protéines, composante principale 2, composante principale 3, variance expliquée

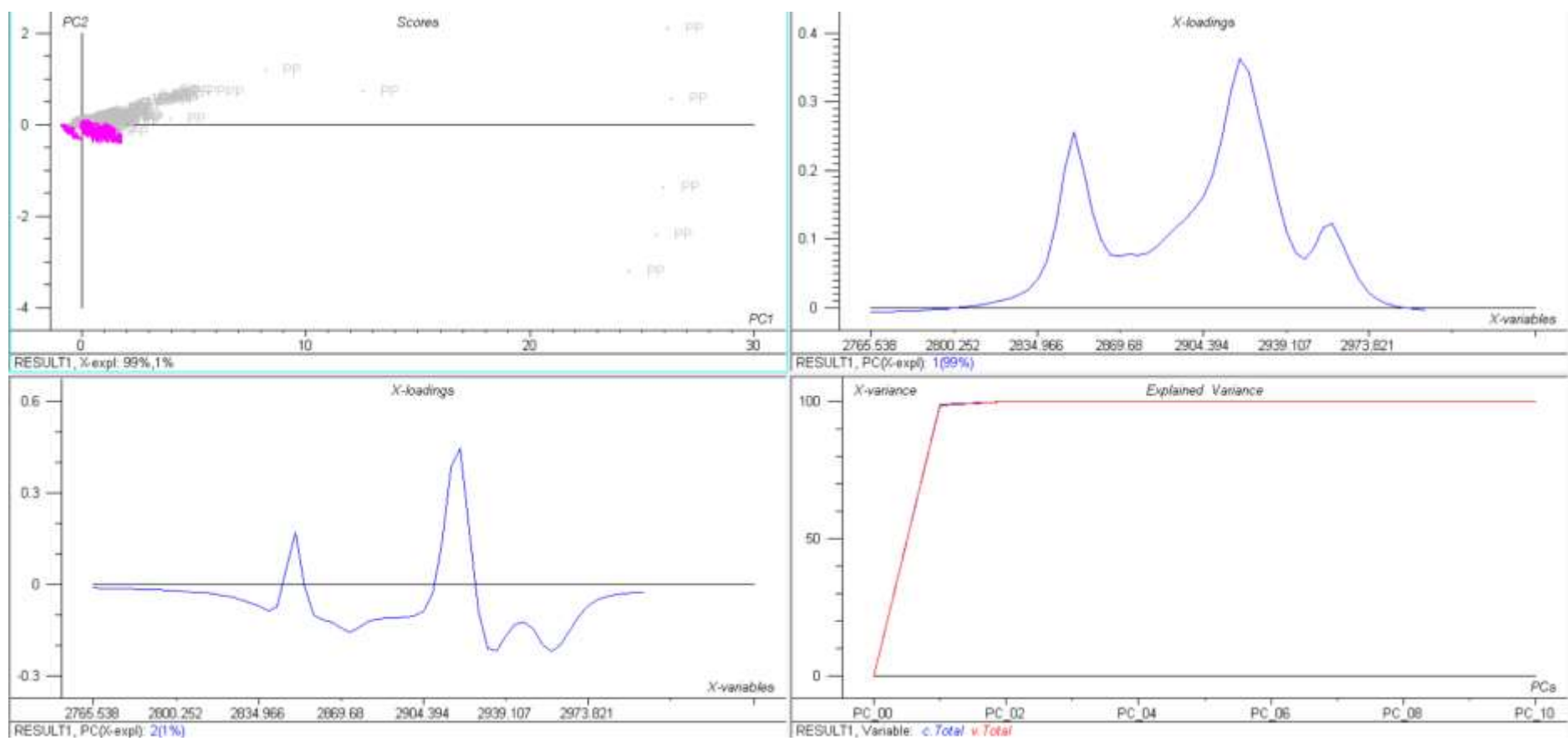


Figure 36 : ACP des échantillons PP (gris) et PPD (rose) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée

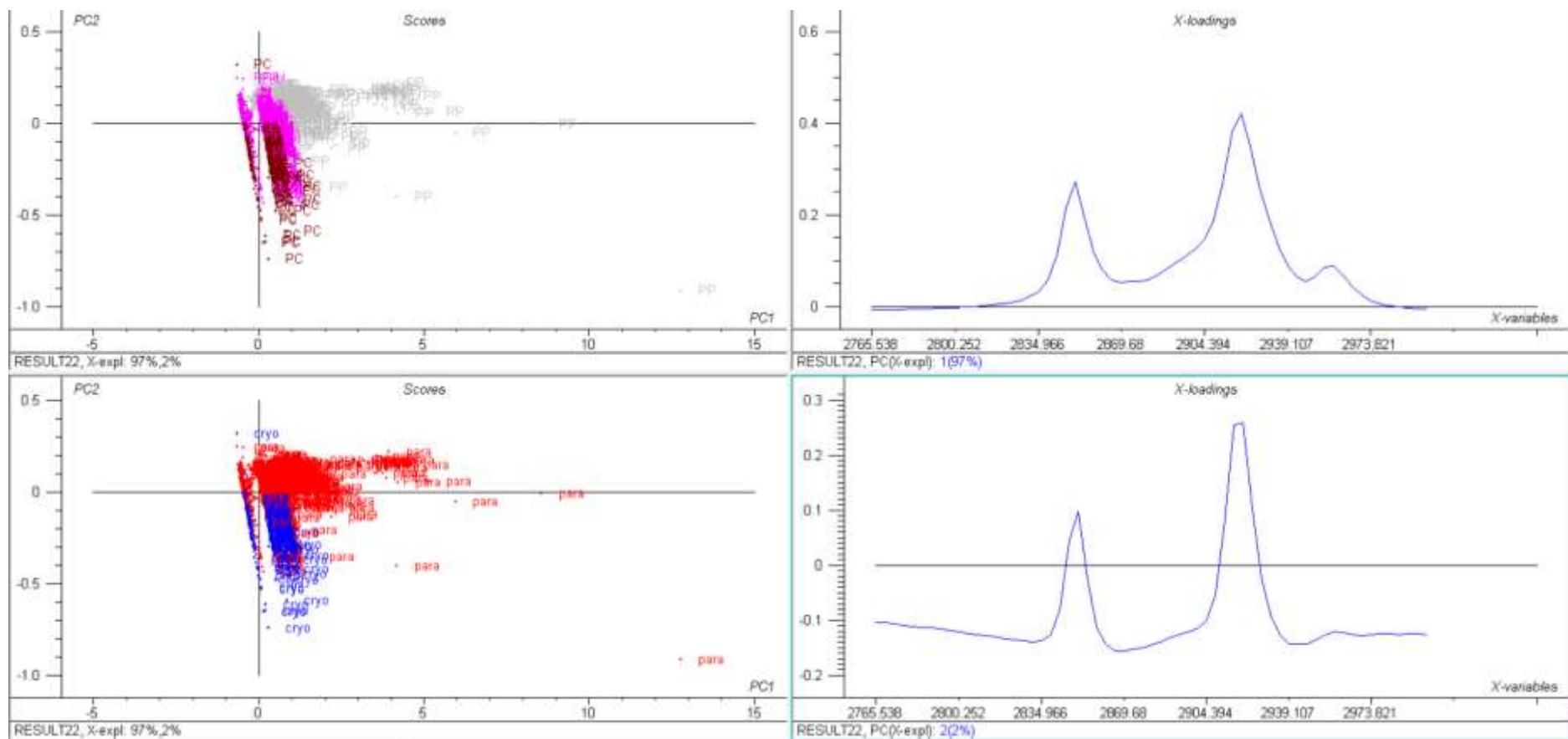


Figure 37 : ACP des échantillons PC (bordeaux), PP (gris) et PPD (rose) sur spectre des lipides, composante principale 1, ACP des échantillons paraffinés (rouge) et cryofixés (bleu) sur spectre des lipides, composante principale 2

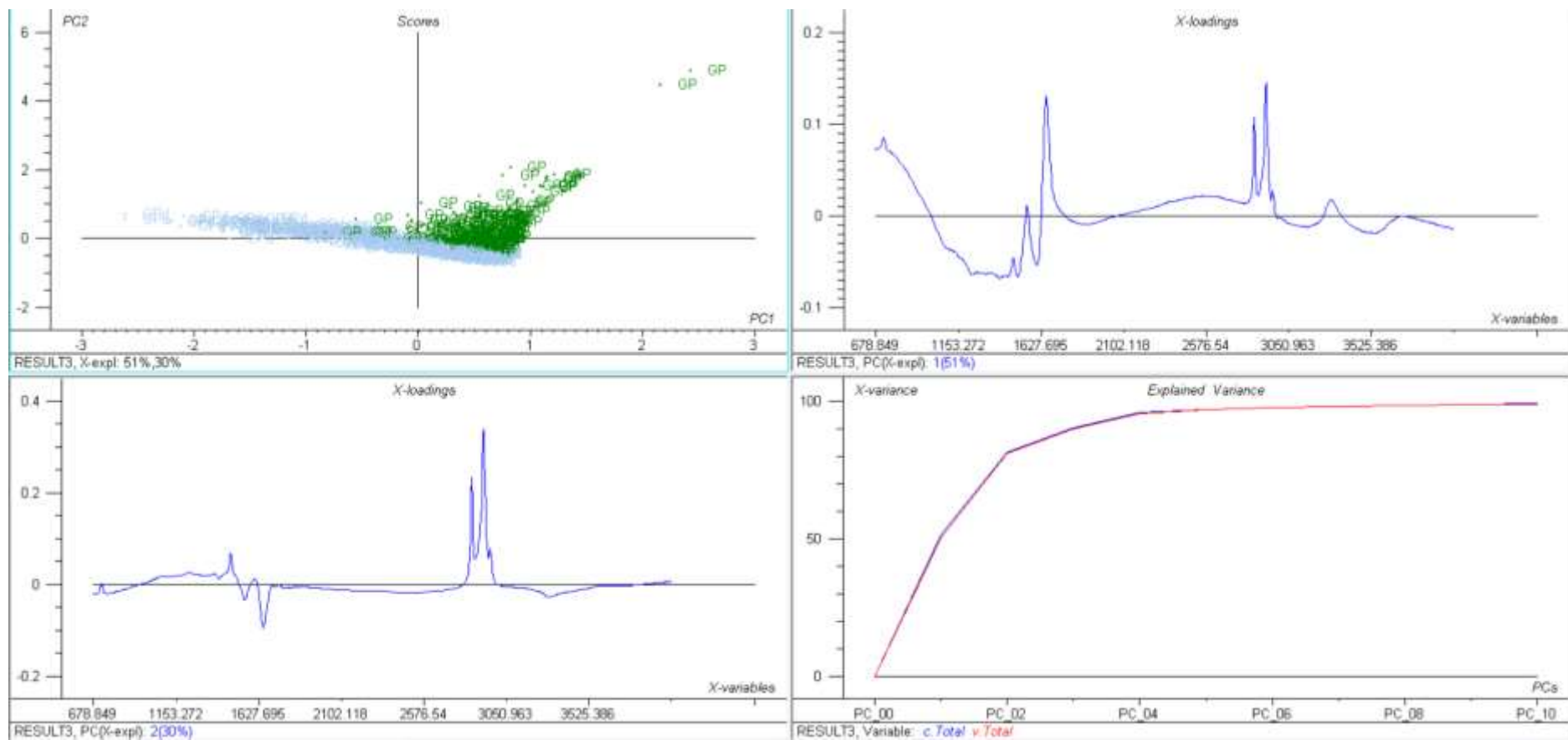


Figure 38 : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (gris) sur spectre complet, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée

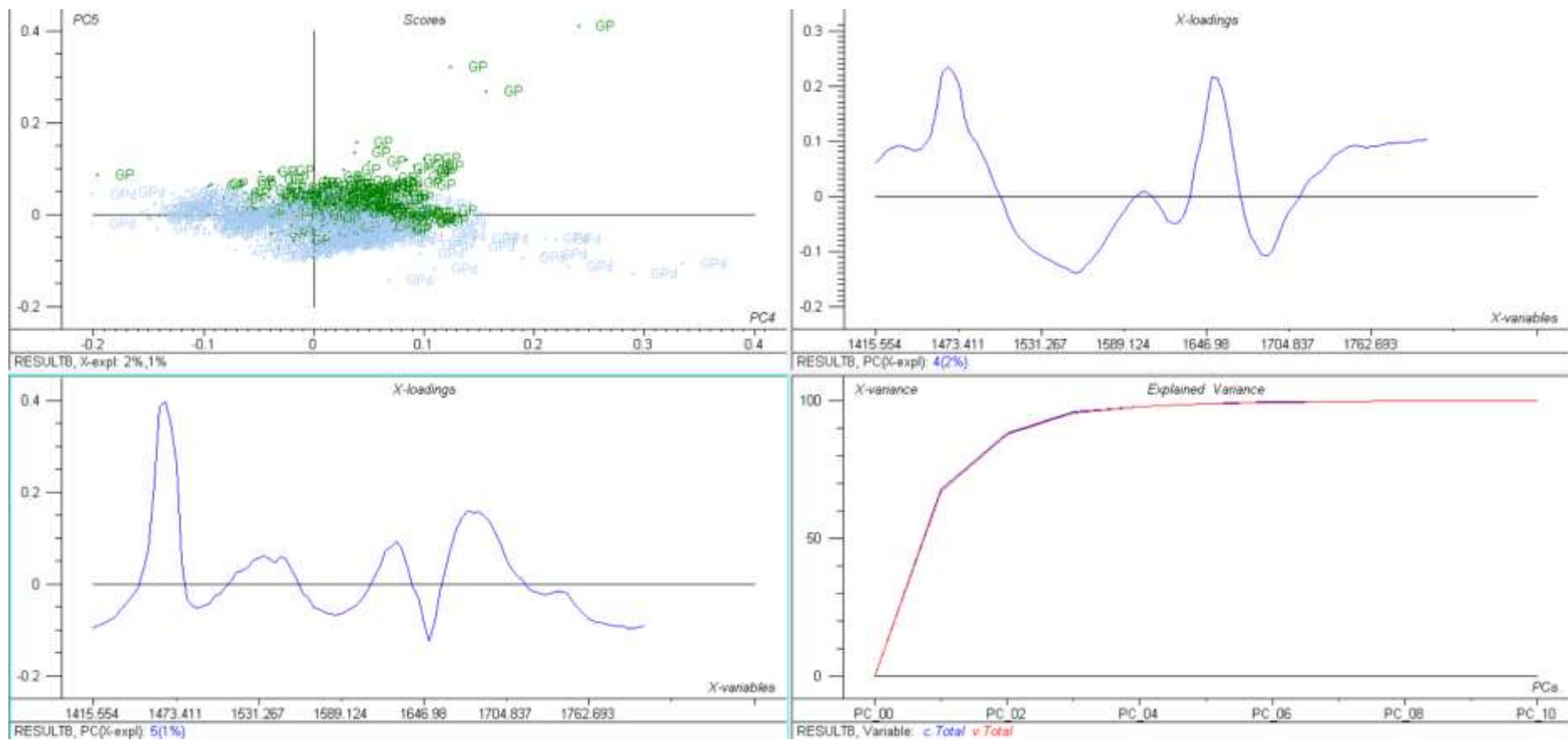


Figure 39 : ACP des échantillons GP (vert) et GPd (gris) sur spectre des protéines, composante principale 4, composante principale 5, variance expliquée

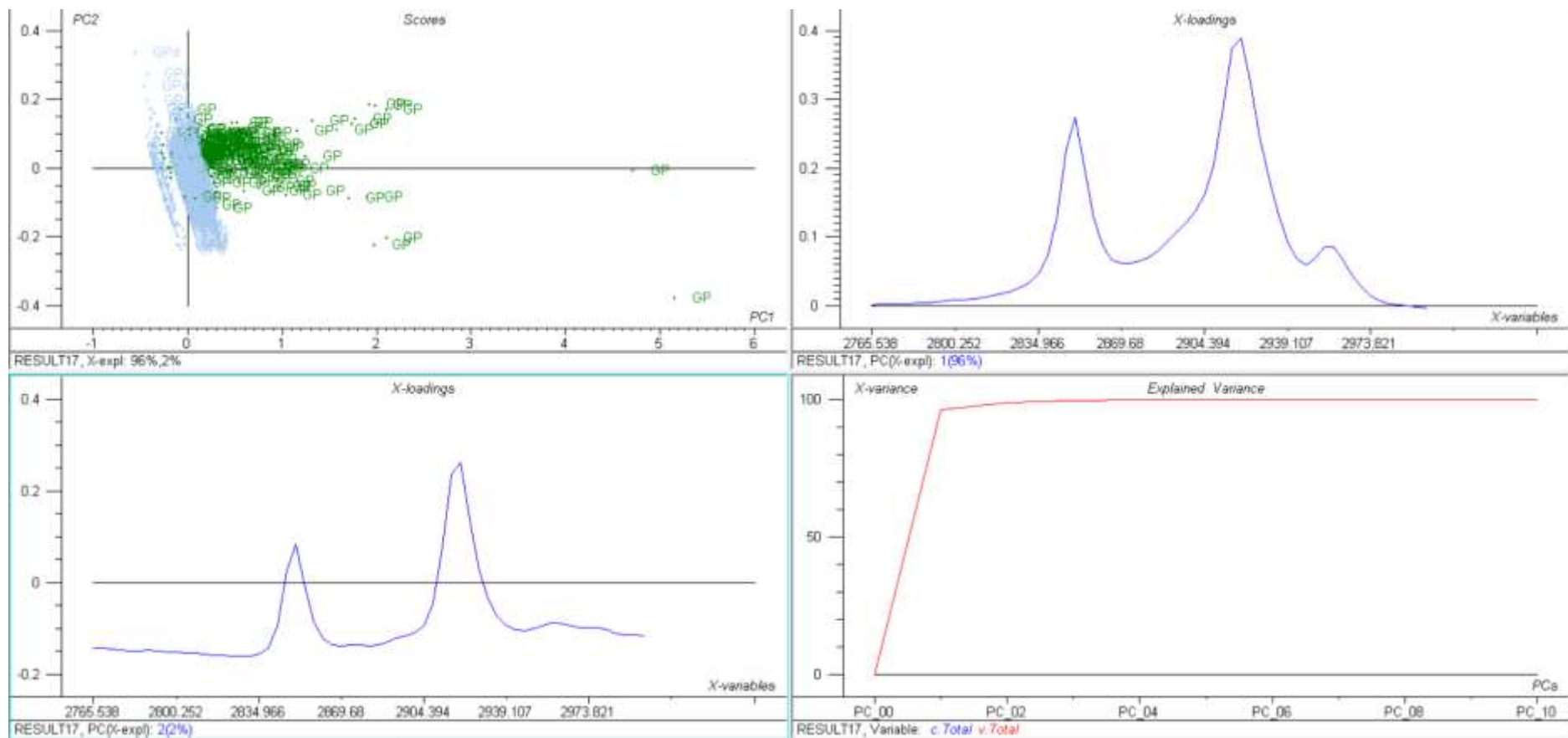


Figure 40 : ACP des échantillons GP (vert) et GpD (gris) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée

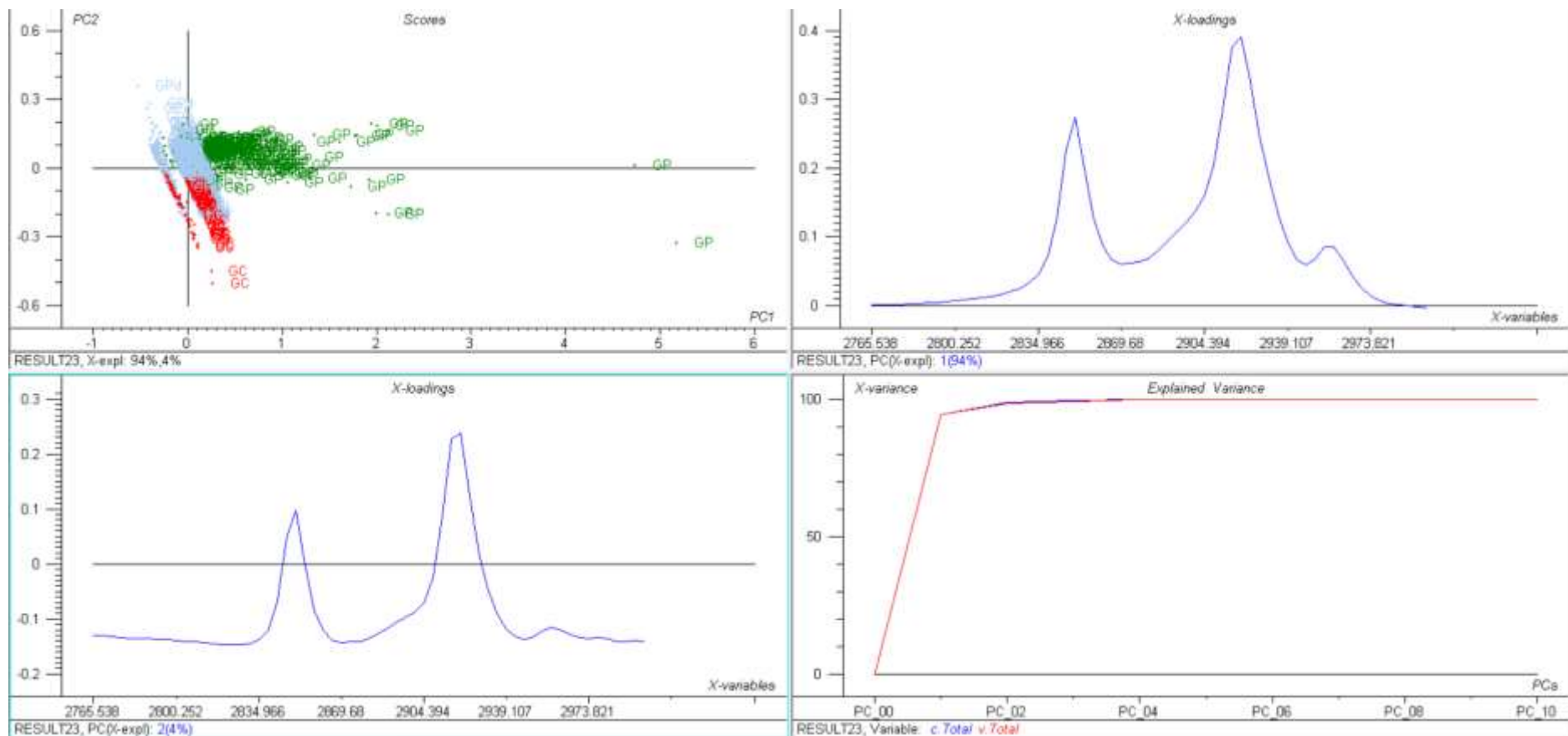


Figure 41 : ACP des échantillons GC (rouge), GP (vert) et GpD (gris) sur spectre des lipides, composante principale 1, composante principale 2, variance expliquée

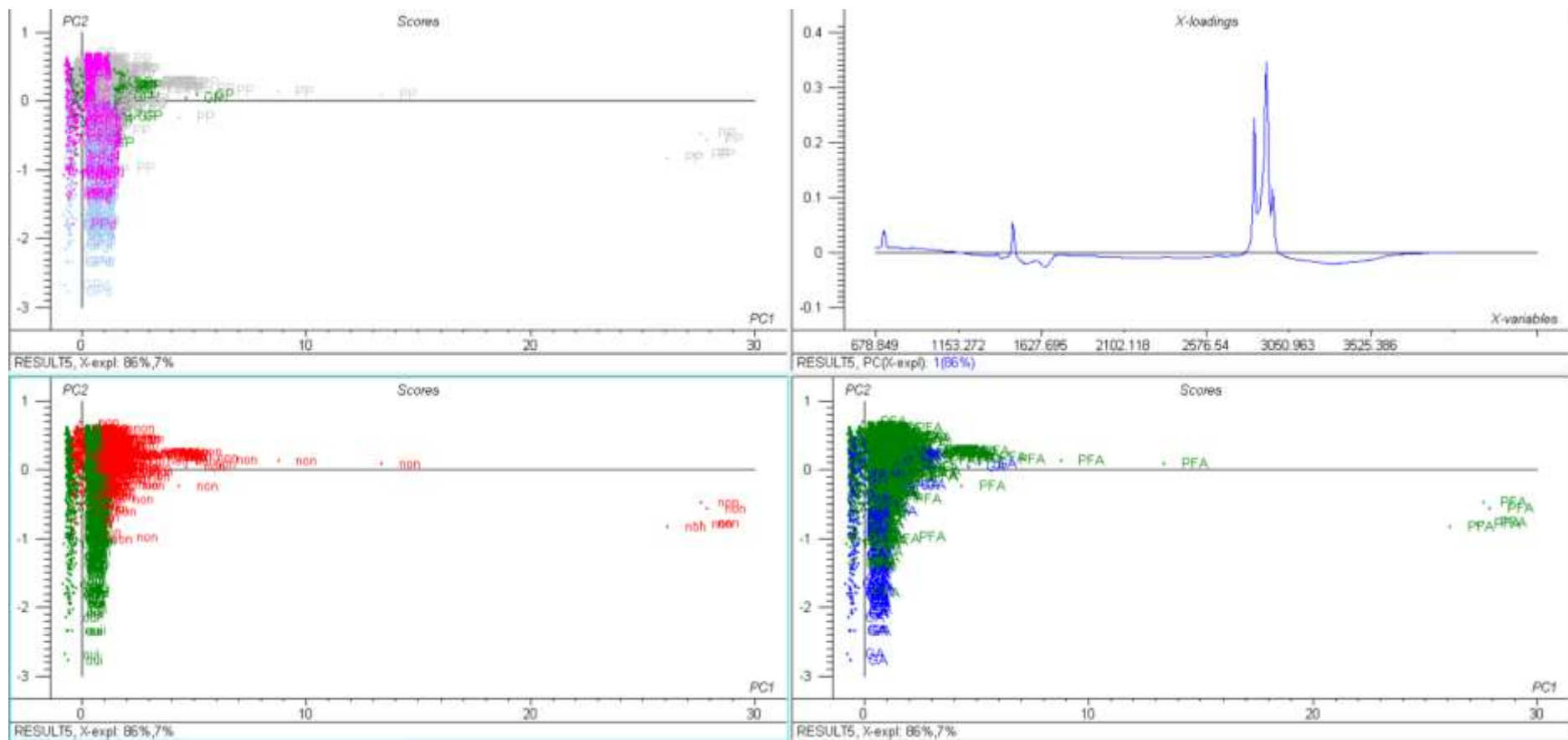


Figure 42 : ACP des échantillons PP (gris), PPD (rose), GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur spectre complet, composante principale 1, ACP des échantillons déparaffinés (vert) et déparaffinés (rouge) sur spectre complet, ACP des échantillons PFA (vert) et GA (bleu) sur spectre complet

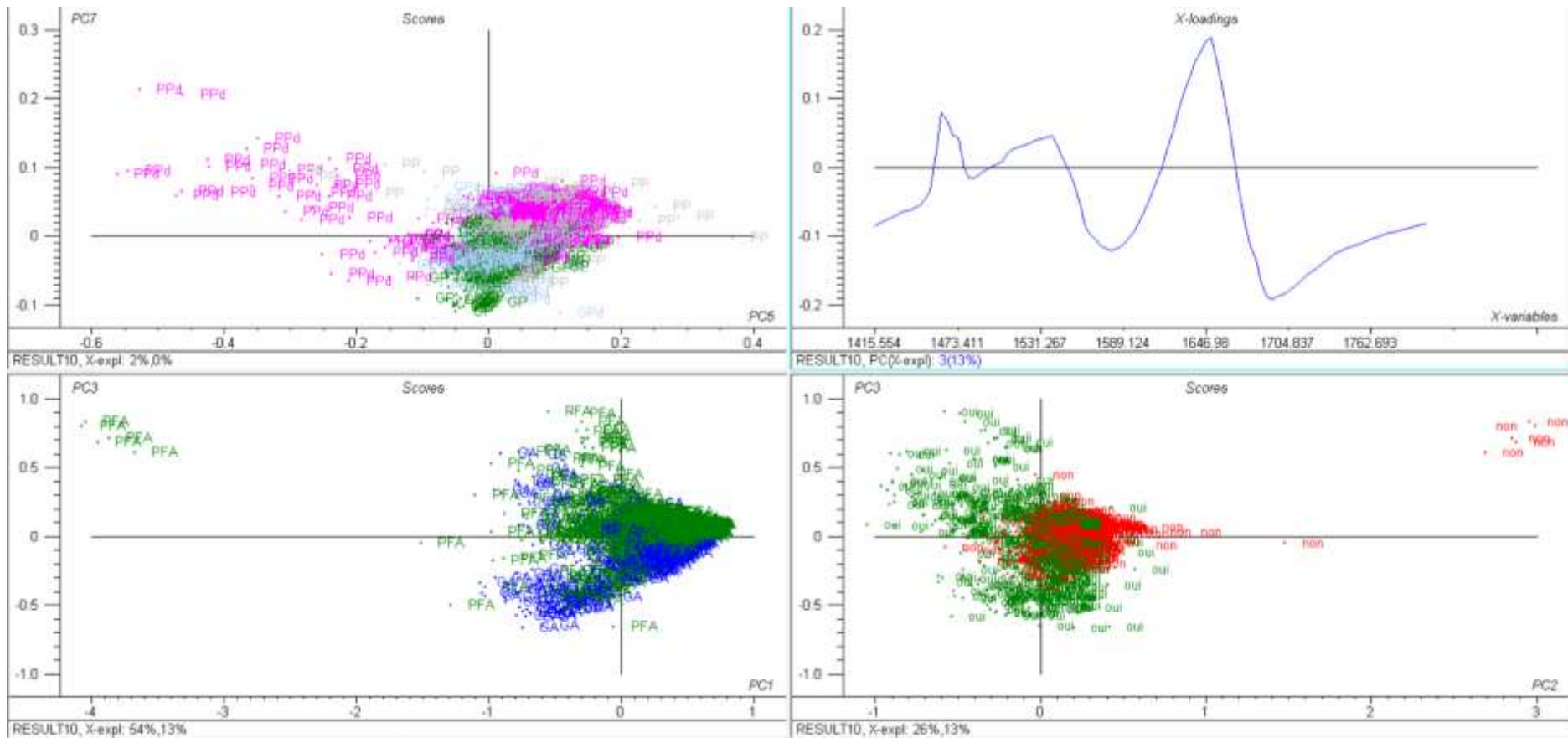


Figure 43 : ACP des échantillons PP (gris), PPd (rose), GP (vert) et GPd (bleu pâle) sur spectre des protéines, composante principale 3, ACP des échantillons déparaffinés (vert) et déparaffinés (rouge) sur spectre des protéines, ACP des échantillons PFA (vert) et GA (bleu) sur spectre des protéines

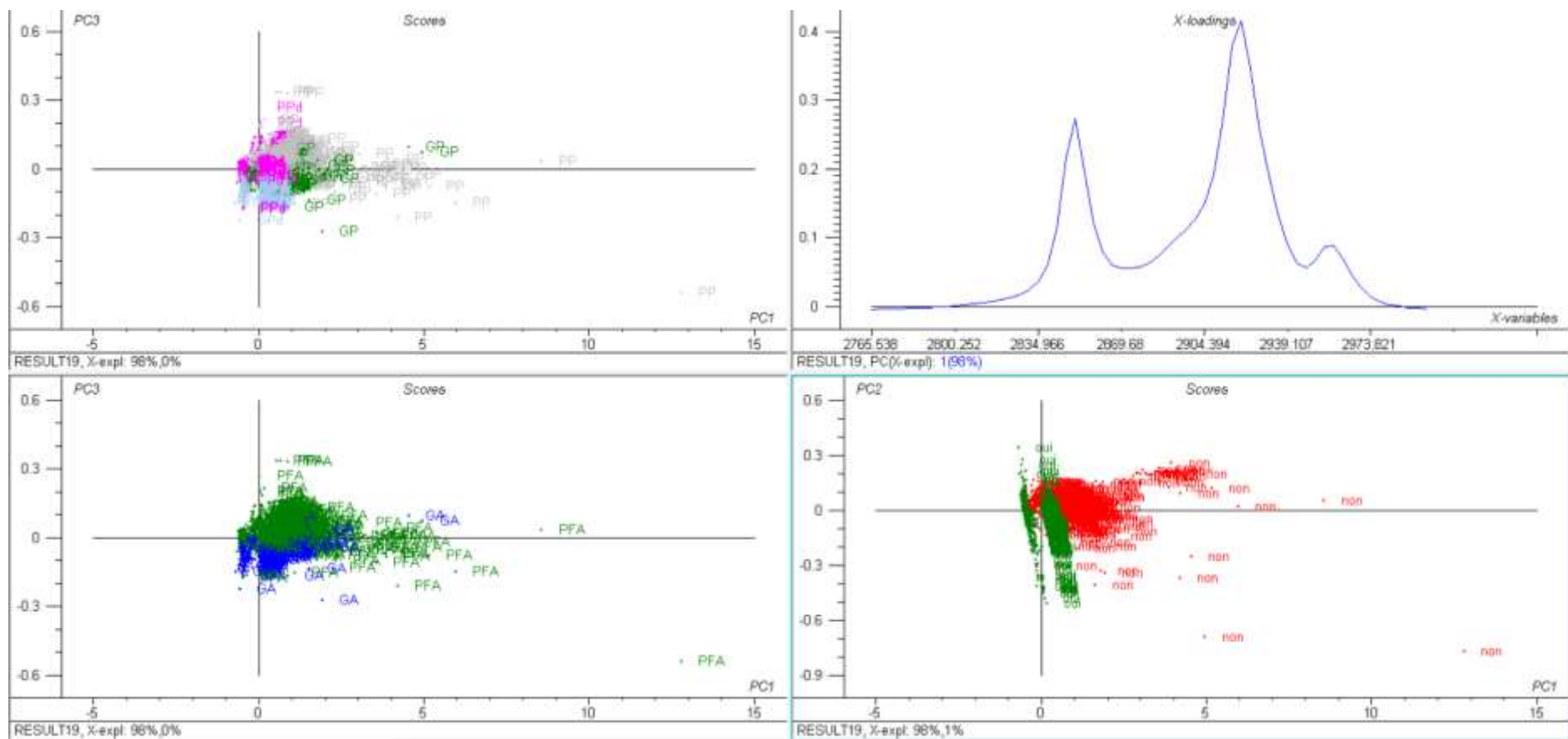


Figure 44 : ACP des échantillons PP (gris), PpD (rose), GP (vert) et GpD (bleu pâle) sur spectre des lipides, composante principale 1, ACP des échantillons déparaffinés (vert) et déparaffinés (rouge) sur spectre des lipides, ACP des échantillons PFA (vert) et GA (bleu) sur spectre des lipides