

2023-2024

IUT Montpellier

BUT-3

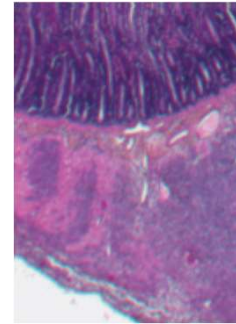
Analyse tissulaire

Histologie et Anatomie pathologique

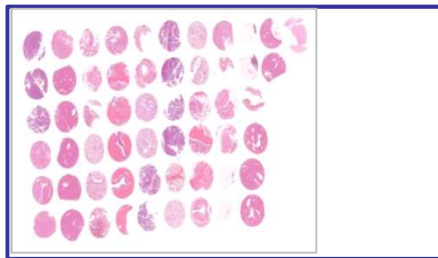
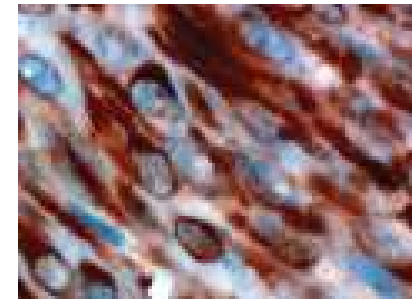
Expertise à l'ENVA et à l'UM : enseignant-chercheur en histologie et en anatomie pathologique animale



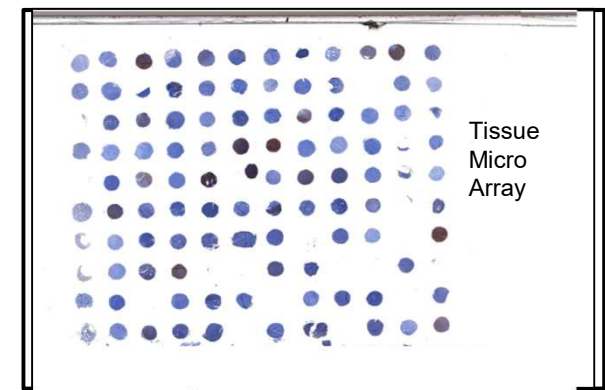
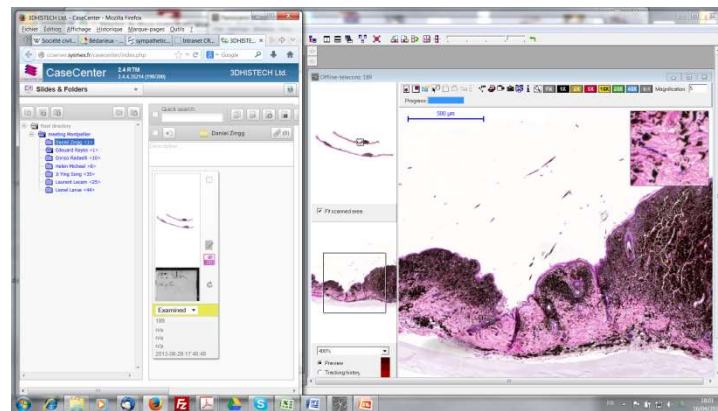
Thèse en Biologie du développement,
INRA Paris VI



EC en Histologie,
anatomie pathologique animale
et en Biologie du développement, ENVA



Pathologiste & Responsable
scientifique du RHEM



Tissue
Micro
Array

EC en Histologie, anatomie pathologique animale
et en embryologie, UM

Mon but aujourd'hui

- ❑ 1- Vous attirer vers les techniques histologiques et l'anatomie pathologique
- ❑ 2- Vous inciter à vous orienter vers l'Histologie et l'Anatomie Pathologique
 - ❑ - pour un stage
 - ❑ - pour un travail
 - ❑ Secteur Très DEMANDEUR
 - ❑ Nombreuses possibilités de travail
 - ❑ Travail très intéressant
- ❑ 3- Vous présenter les différents domaines, mon domaine
- ❑ 4- Vous présenter les BUTS de l'Anatomie Pathologique
- ❑ 5- Vous présenter quand et pour quoi nous nous retrouverons

Possibilités de travail, de stage

Laboratoires d'anatomie pathologique (AP) publics

- - de **diagnostic**
 - . hôpitaux : service d'anatomie pathologique du CHRU de Montpellier, de Nîmes, de Val d'Aurelle...
 - . des écoles vétérinaires
 - . des services départementaux, régionaux, etc...

- - de **recherche**
 - .pour l'INSERM, CNRS, INRAE, UM....
 - à Mpl
 - - RHEM, Réseau d'Histologie expérimentale de Mpl
 - - PHIV, Plate-forme d'Histocytologie et d'Imagerie Cellulaire végétale
 - - les labos avec un peu d'histologie et imagerie

- - à l'**interface**
 - URT, unité de recherche translationnelle
 - CRB, centres de recherche biologiques

Possibilités de travail, de stage

Laboratoires d'anatomie pathologique (AP) privés

- - de **diagnostic**

- . Laboratoires privés de diagnostic AP médicale
- . Laboratoires privés de diagnostic AP vétérinaire

- - de **diagnostic et développement**

- à Montpellier Cerba,

- - de **pharmaco-toxicologie, recherche et développement**

- à Montpellier Sanofi,

Les buts de l'enseignement

Qu'est-ce que l'histologie? Quelles sont les principales techniques ?
Comment apprécier la qualité d'un travail technique en histologie ?

Qu'est-ce que l'anatomie pathologique? A quoi ca sert?
Comment bien observer et décrire des lésions macroscopiques? Comment bien faire un prélèvement?
Quels sont les intérêts de lames virtuelles?
Comment lire une lame histologique microscopique ?

Janvier & Février 2024, par étudiant :

09/01 2h, Cours : introduction, généralités

10/01 2h, TD : Lésions macroscopiques, applications aux lésions tumorales

24/01 2h, TD : Immunomarquages IHC/IF: Les marqueurs. Indicateurs tumoraux, de prolifération et de mort cellulaires. Préparation d'un immunomarquage IHC/IF. Appréciation de la qualité d'un IHC.

16-17/01 3h, TP : Analyse des artéfacts histologiques : sur blocs & sur lames virtuelles.
Appréciation de la qualité des blocs. Appréciation de la qualité des lames virtuelles.
Utilisation d'un logiciel d'analyse de lames & observation de lames virtuelles.

29&31/01 3h, TP : Analyse de lames virtuelles: reconnaître des cellules épithéliales, les différencier de cellules mésenchymateuses

08/02 Examen

Qu'est-ce que l'histologie?

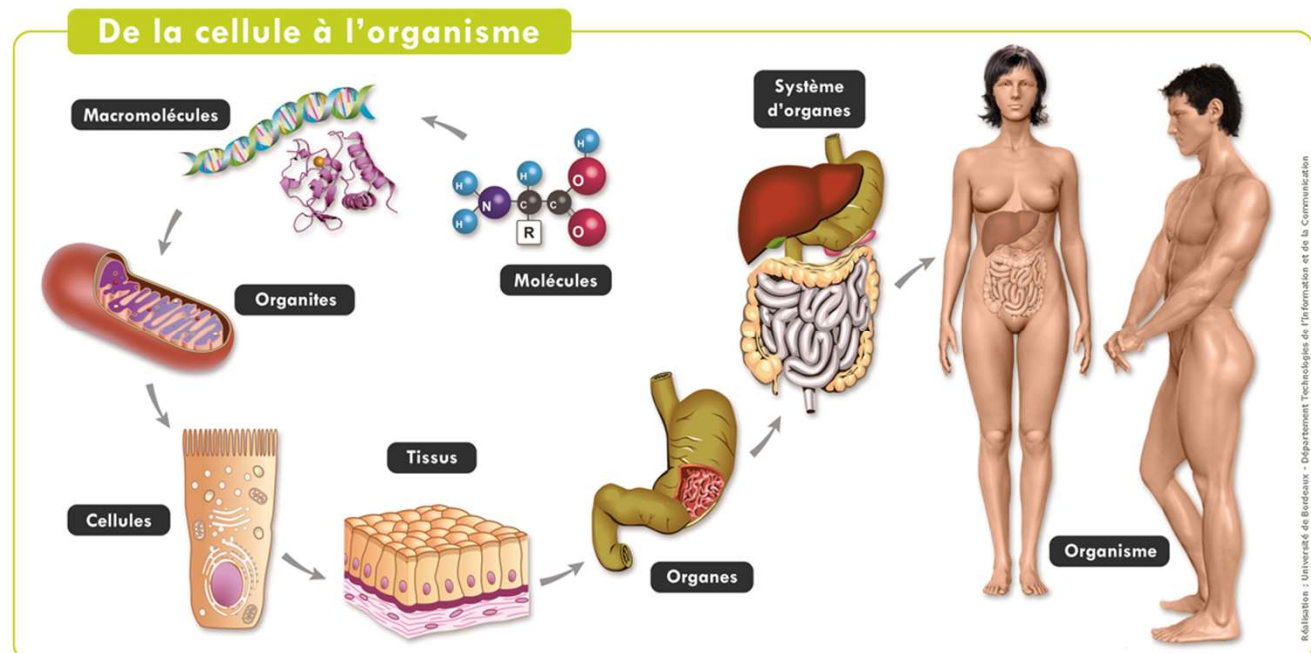
L'histologie (du grec ancien ιστός pour histos, « tissu », et λόγος, pour logos « étude »), autrefois appelée anatomie microscopique, **est la branche de la biologie et de la médecine qui étudie les tissus biologiques.**

Elle se situe au carrefour de la biologie cellulaire, de l'anatomie, de la biochimie et de la physiologie.

L'histologie est un domaine de la biologie et de la médecine consacré à **déterminer la structure, la fonction et les états pathologiques de tissus.**

Histologie, Cytologie Anatomie Pathologique, Hémato- cyto- pathologie

De la cellule à l'organisme



Tissu : « la Structure récapitule la Fonction »

Étude macroscopique puis microscopique

Tissu sain ⇔ Histologie

Tissu lésé ⇔ Pathologie

Les lésions d'un tissu expliquent le dysfonctionnement

Qu'est-ce que l'anatomie pathologique?

C'est l'étude des différences morphologiques apparues dans un organisme suite à une cause (par ex un produit inhalé, ingéré, injecté; une infection bactérienne ou virale, un processus tumoral; ..).

=> Macroscopique & Microscopique

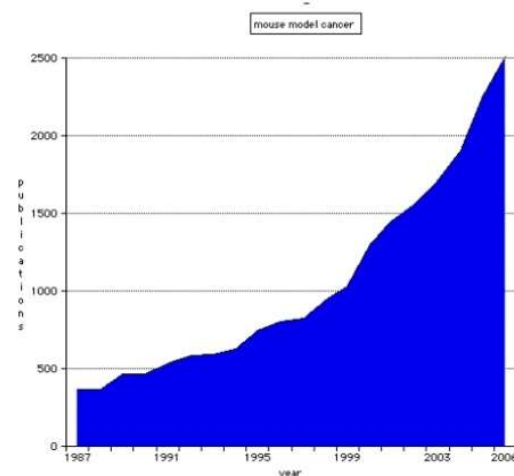
Le pathologiste doit

- observer les différences morphologiques par rapport à l'état normal
=> connaissance de l'anatomie, de l'histologie et de l'histophysiologie normales *Macroscopique*
- Déterminer la nature de ces différences morphologiques
 - Déterminer les réponses cellulaires et tissulaires à une cause
 - ⇒ Connaissance de l'anatomie pathologique générale: par ex., dégénérescence, nécrose, congestion, œdème, hémorragie, inflammation *Microscopique*
 - Apprécier la signification et l'importance de ces différences morphologiques selon l'organe examiné => connaissance de l'anatomie pathologique spéciale, appliquée à un organe . Par ex inflammation, tumeur du système digestif

Anatomie Pathologique en recherche

Pathologie Expérimentale

➤ Constante augmentation des modèles murins de maladies humaines



Nat Rev Cancer 2008 June; 8(6): 459–465.

➤ Plus de 20 000 souris génétiquement modifiées (GEM) générées par an dans le monde

➤ Plus de 400 GEM à Montpellier

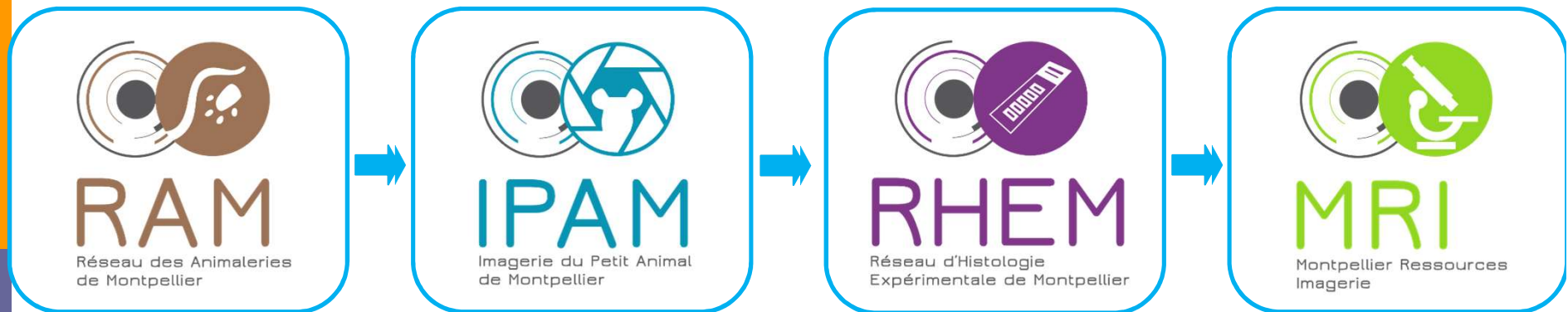
➤ Structuration de la recherche à Mpl



➤ Anatomie Pathologique = Démarche basée sur la Comparaison de la Morphologie

RHEM pour Réseau d'Histologie Expérimentale de Montpellier

- Création fin 2008 pour mutualiser et rationaliser les moyens humains et matériels
- Appartient à l'UMS  comprenant 17 plateformes technologiques
- Géré par le CNRS
- Ouvert à toute la communauté scientifique académique et privée



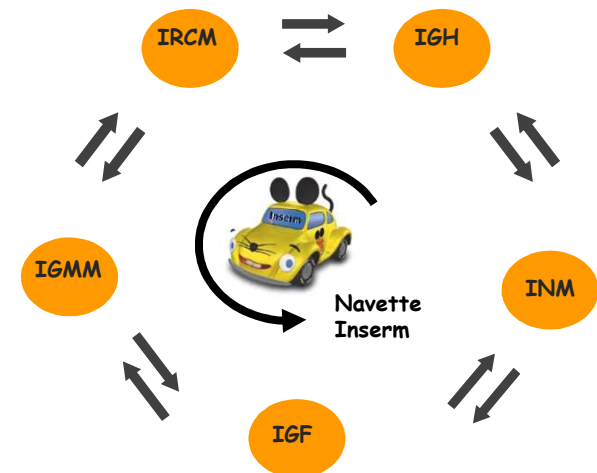
Outils au service des chercheurs :

De l'Animal à l'image

Le RHEM = laboratoire d'analyse microscopique ... comme en médecine humaine



-
- Regroupement des laboratoires / Réseau



Le RHEM = laboratoire d'analyse microscopique ... comme en médecine humaine ?



□ Patient



- 1990: 1 nodule
- 2000: 1 nodule et des métastases
- 2016: plusieurs nodules et 1 métastase
- **SUIVI dans le temps**

Le RHEM = laboratoire d'analyse microscopique ... Pour la Recherche

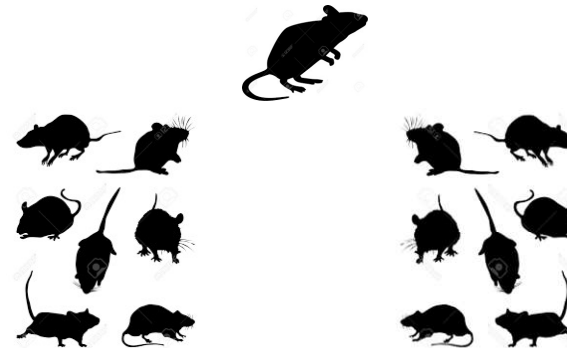


□ Patient



- 1990: 1 nodule
- 2000: 1 nodule et des métastases
- 2016: plusieurs nodules et 1 métastase

□ Suivi dans le temps



Projet :
répondre à la question posée
du chercheur

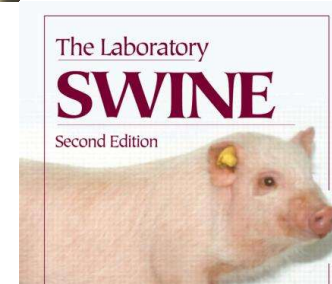
Etudes comparative et statistique des lots

Le RHEM = laboratoire d'analyse microscopique

... Pour la Recherche



... via l'étude de modèles animaux de maladies humaines



Le RHEM = laboratoire d'analyse microscopique

... connu et reconnu



□ 2014 & 2019, Labellisation plateforme IBiSA

- L'ouverture aux équipes extérieures
- les moyens humains,
- le système de gestion,
- l'innovation technologique
- la formation



□ 2022, Certification du Système de Management de la Qualité

- Norme qualité ISO NF ISO 9001
- ou
- Norme qualité plateforme NFX-50-900



Différents plateaux composant le RHEM



Exp. anatomopathologique

Microtomie

Mise à disposition

TMA



Institut de
Recherche en
Cancérologie
I R C Montpellier

Cryotomie L1

Cryotomie L2

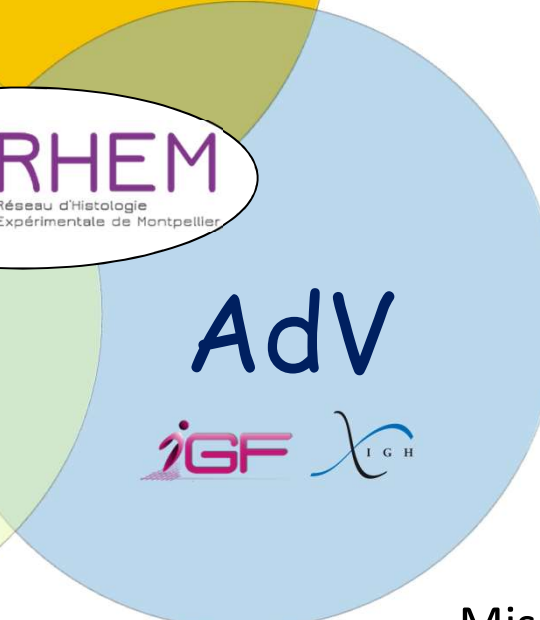


NFS & biochimie

Transparisation



igmm
INSTITUT DE GÉNÉTIQUE
MOLÉCULAIRE DE MONTPELLIER



Adv

iGF IGH

Mise à disposition

Mise à disposition

RNAscope

Introduction

1- L'autopsie

2- Du prélèvement au bloc puis à la lame histologique

3- Sur la lame histologique...

4- L'anatomie pathologique

5- Résumé / Take Home messages



1- L'autopsie



1- L'autopsie

L'euthanasie

La préparation et la réalisation de l'autopsie

L'étude macroscopique des lésions

La réalisation des prélèvements

Le rapport d'autopsie

Projet scientifique

- **OBSERVATION DE L'ANIMAL**
 - SYMPTÔMES? LESIONS?
- **CHOIX DE L'EUTHANASIE pour l'AUTOPSIE**
- **CHOIX DES PRELEVEMENTS A EFFECTUER**
 - TISSUS LESES + TISSUS CIBLES CONCEPTUELLEMENT
 - FONCTION DES TECHNIQUES
- **FIXATION**
- **RECOUPE**
- **TRAITEMENT HISTOLOGIQUE (LABO SPECIALISE)**
- **ANALYSES (CHERCHEUR OU COLLABORATION)**

Euthanasie de l'animal de laboratoire

Obéit à certaines règles:

- Éthiques
 - le moins de souffrance à l'animal
 - Réduction du nombre d'animaux (statistiques)
- Scientifiques
 - Le moins de lésions induites possibles
- Bonnes Pratiques de Laboratoire
 - Identification de l'animal euthanasié
 - Appliquer des procédures qualités

Euthanasie de l'animal de laboratoire

- Examination of the live animal
- Euthanasia
- **Exsanguination**
- Opening of the abdominal cavity
- Opening of the thoracic cavity
- Opening of the skull
- Examination of muscles and skeleton.

♦ Interêt de l'exsanguination:

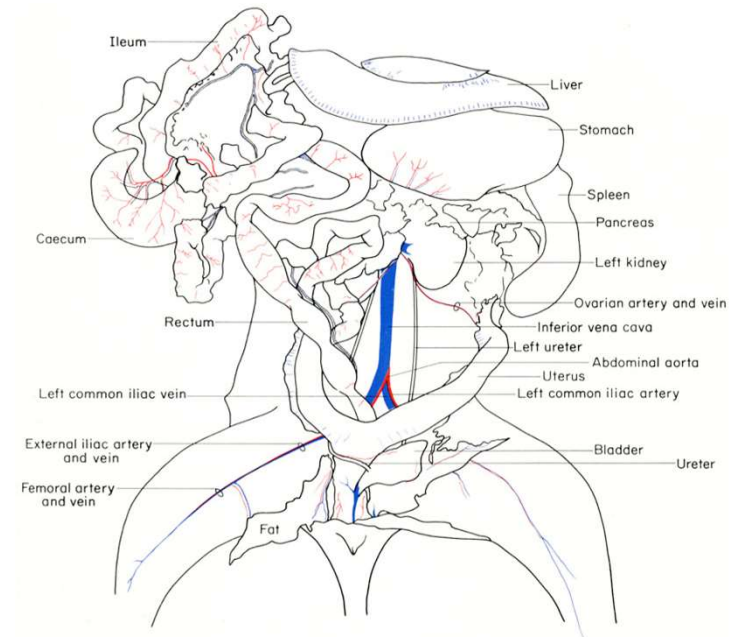
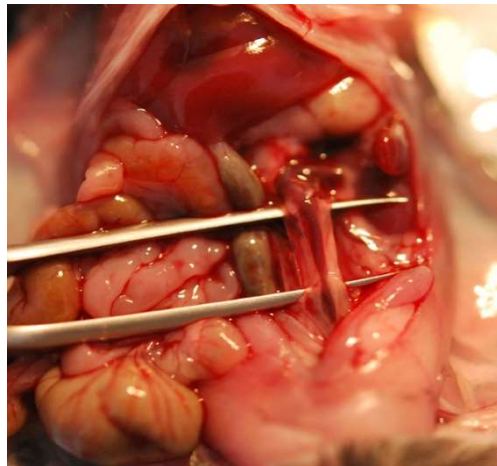
- Pesée des organes fiable et comparable entre expérimentations (Kanerva R.L., Toxicol. Pathol., 1982, Vol10).
- Améliore l'analyse microscopique des tissus (immunomarquage)

- ♦ Exsanguination par section de l'aorte abdominale & veine cave.

List of organs for weighing

Rat	Mice
Liver	Liver
Kidney	Kidney
Heart	Heart
Adrenal glands	Adrenal glands
Brain	Brain
Testes	Testes
Prostate	Spleen
Epididymes	Thymus
Spleen	Thyroid/parathyroid
Thymus	Pituitary gland
Thyroid/parathyroid	
Pituitary gland	

Sellers, R., et al., in *Toxicologic Pathology* 35, 751-755 (2007)



<http://www.informatics.jax.org/cookbook/figures>

La place de l'autopsie

Ante mortem

examen de l'animal vivant
comportement, aspect externe, ...

Euthanasie

Post mortem

Autopsie
Étape cruciale
(éphémère et unique)

Technique et
analyse histopathologique,...

OBSERVATION

MACROSCOPIQUE
sur le vivant

MICROSCOPIQUE
(biopsie)

MACROSCOPIQUE
sur le mort

1^{ère} étape de
l'évaluation morpho.

MICROSCOPIQUE

2^{ème} étape de
l'évaluation morpho.

► même chronologie dans rapport anatomie pathologique



De l'autopsie à l'analyse lésionnelle imagée

Etapes	Moyens / méthodes	Intervenants
Autopsie	Examen macroscopique, pesées d'organes, prélèvements, fixation Rapport d'autopsie	Techniciens, pathologistes
Histotechnique	Recoupe, inclusion, coupe, coloration	Techniciens, pathologistes
Microscopie	Examen microscopique et rapport	Pathologistes
Autres techniques	Définition du problème, mise au point, génération des données Interprétation	Techniciens, pathologistes Pathologistes

L'ana-path requiert de nombreuses phases manuelles relativement peu automatisables

Ethique et réglementation de la phase d'autopsie

- Elle est obligatoirement sous la responsabilité de personnes disposant d'une habilitation
- Aspects éthiques régis par des textes de loi,
 - **Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales**
 - Demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques (autorisation-projet@recherche.gouv.fr) → ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (MRES)
 - L'Arrêté fixe les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles
 - **La Directive 2010/63/UE du Parlement Européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques**
- La décision d'euthanasie et d'autopsie
 - Strictement codifiée dans une procédure listant les différents cas (rongeur, non rongeur)
 - Critères spécifiques de décision ("points limites")
 - Intervention du "Vétérinaire Désigné"
 - Procédures d'euthanasie (séquence anesthésie – exsanguination – prélèvements)
 - Anesthésie décrite dans le protocoles de l'étude, et conforme à la consigne CEPAL listant toutes les techniques d'anesthésie et d'euthanasie

Autopsie

Méthode

1- Aussi précocement que possible après la mort pour éviter l'autolyse cadavérique

(*Altérations cadavériques* Différent de lésions survenues du vivant de l'animal)

2- Sur animal testé **et** contrôle

(important pour l'analyse microscopique)

3- Systématique, rigoureuse, détaillée, presque maniaque !

4- Documentée : toute lésion enregistrée avec

- sa description, toute mesure....
- Schéma de localisation +/- Photographie

5- Prélèvements pour étude microscopique

6- attention à l'amélioration de l'expérimentateur

Durant l'étude, l'oeil et la dextérité manuelle s'améliorent

7- L'autopsie est la base: la qualité des prélèvements induira la qualité des résultats

Technique de dissection

Examen et recherches de lésions

- de l'aspect extérieur du cadavre
 - » peau, pelage, phanères,
 - » muqueuses, ...
- De toutes les surfaces
 - » thorax, abdomen :
 - » plèvre et péritoine,
 - » Articulations : en ouvrir 7 !
- Des organes
- Des muscles, nerfs, tissu adipeux...
- Cerveau et moelle épinière

L'autopsie

- point de départ des examens ultérieurs
 - 1^{ère} étape de l'évaluation **morphologique**
- **Lien** entre observations cliniques « symptômes »
et macroscopiques « lésions »

► L'autopsie se prépare et ne s'improvise pas

Préparation du matériel

- plateaux à autopsie, instruments,
- bocal de fixateur, cassettes (N° étude, animal,...)
- feuille d'autopsie (matériel pour écrire, même si saisie « on line »)
- poste de pesée (étalonnage balances)
- Appareil photo avec règle



Préparation des animaux:

Mise à jeun souris: 3 heures maxi avant (diète hydrique):

- Eau associée à glycogène, lipides, protéines...
- **Obligatoire** si pesées corps & organes

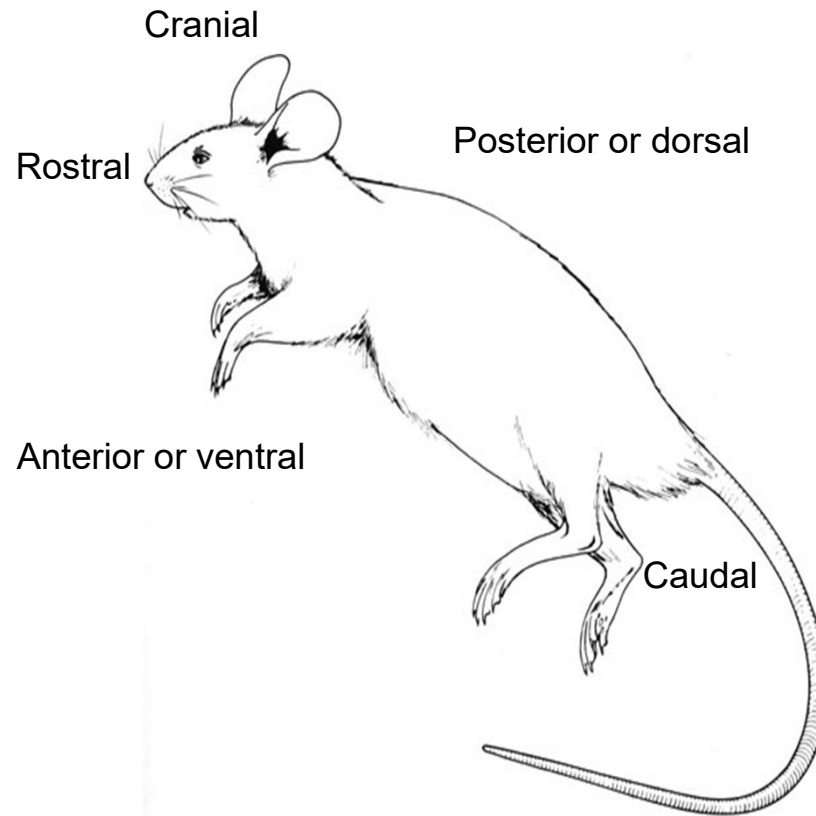
Pesée du corps & des organes :

- Toujours de la même façon
- Attention:
 - A la Dessiccation
 - Recouvrir petits organes par gaze humide
 - Thyroïde de souris: perte de 25% du poids frais si laissée 15 min non recouverte (Hascheck W.M. et al., handbook of tox pathol, 2nd ed., 2002)
 - Petits organes (thyroïde, surrénales souris: pesée post fixation)

Noter: N° d'identification, poids, sexe de l'animal (fiche autopsie)

Examen externe de l'animal

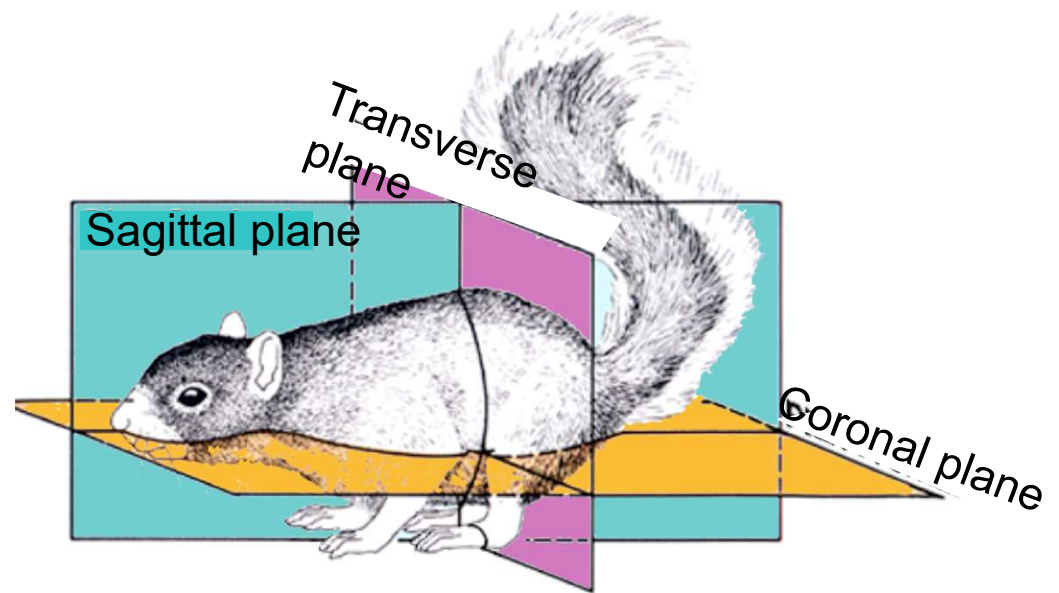
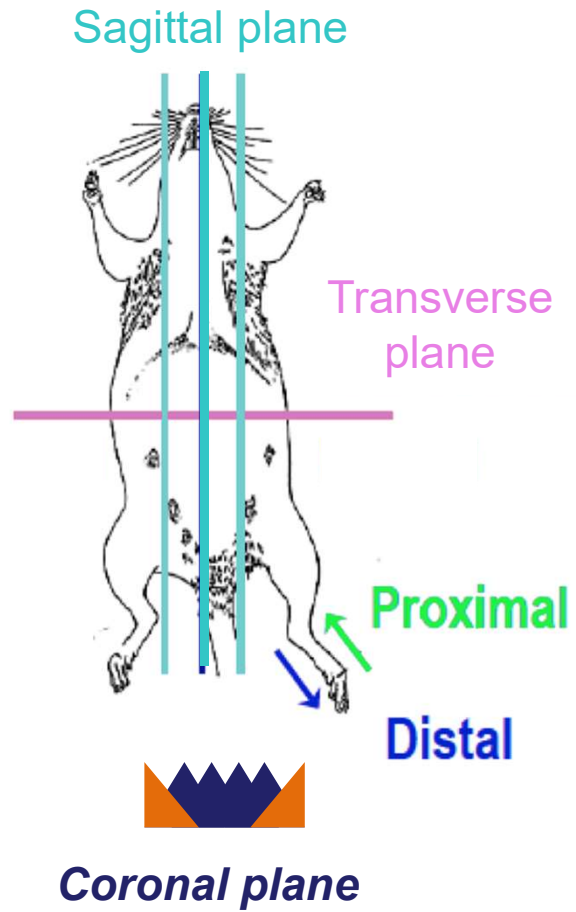
Termes anatomiques

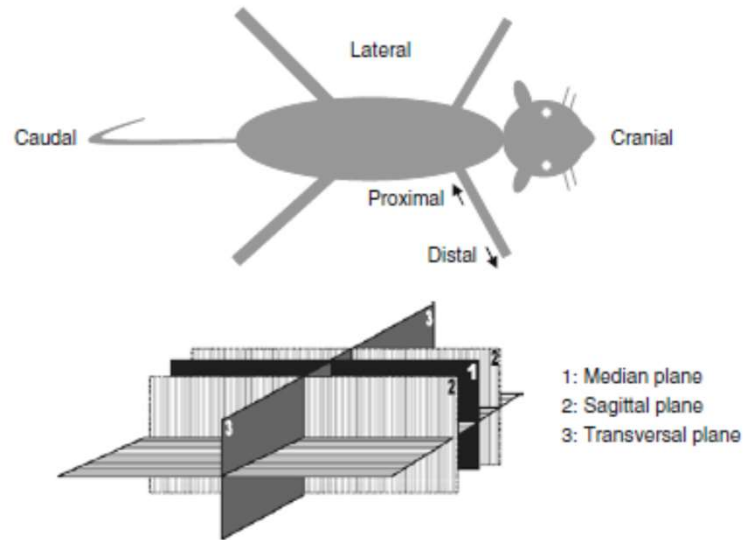


<http://www.informatics.jax.org/cookbook/imageindex.shtml>

Inclusion & Orientation

Plans anatomiques chez la souris



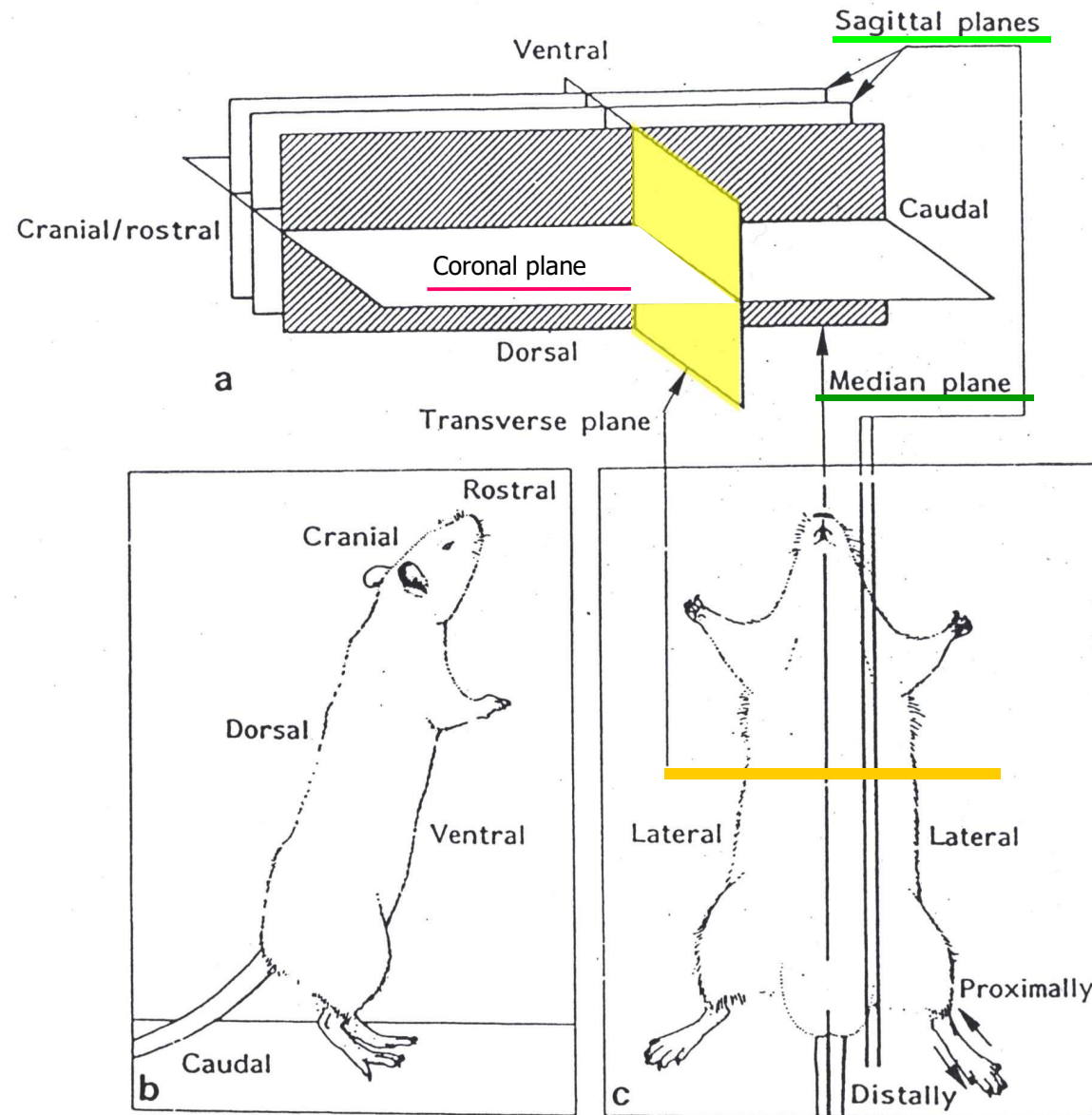


Anatomical orientation descriptors usually used at necropsy.

The major planes of sections are defined as follows:

1. **Median plane**, passing longitudinally through the middle of the body from front to back, dividing it into left and halves right.
2. **Frontal (coronal) planes**, passing transversally through the body from side to side, perpendicular to the median plane, dividing the body into front and back parts.
3. **Sagittal planes** are vertical planes passing through the body parallel to the median plane dividing the body into left and right portions.
4. **Transverse plane** (dorsoventral), passing vertically through the body, perpendicular to the sagittal planes, and dividing the body into front and back portions.
5. **Horizontal plane**, passing through the body, perpendicular to both the frontal and median planes, dividing the body into upper and lower parts.
6. **Vertical plane**, perpendicular to a horizontal plane, dividing the body into left and right or front and back portions.

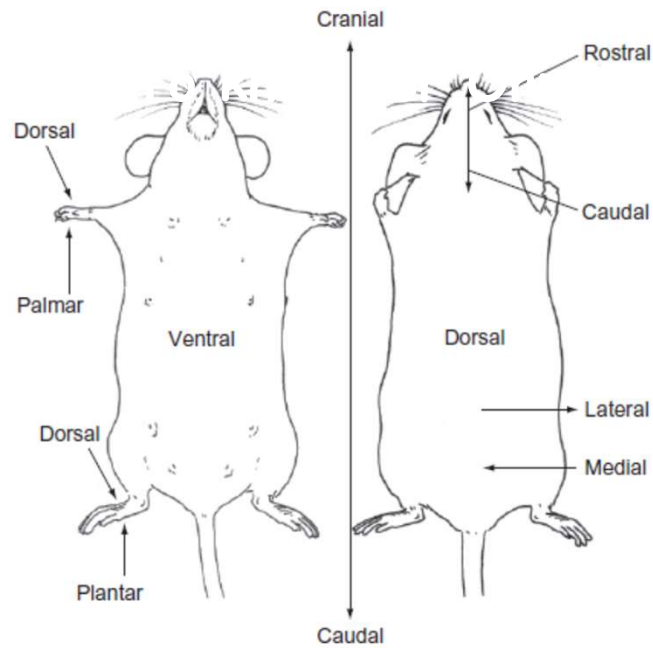
Les plans de coupe



Schematic summarising the spatial definitions.

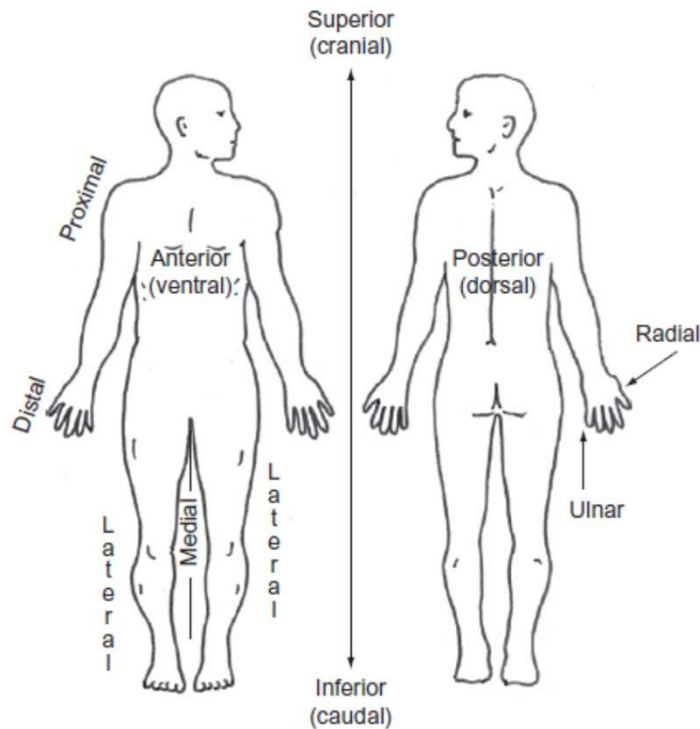
In « Van Dongen JJ et al., Manual of Microsurgery on the Laboratory Rat.

Part I. General information and Experimental techniques, 1990, p.54. (Elsevier Science, The Netherlands)



● Need-to-know

- Ventral and dorsal used instead of anterior and posterior.
- Cranial and caudal used instead of superior or inferior.
- Proximal and distal used on appendicular skeleton.
- Medial and lateral used to refer to relative positions to the center of the body in both species.

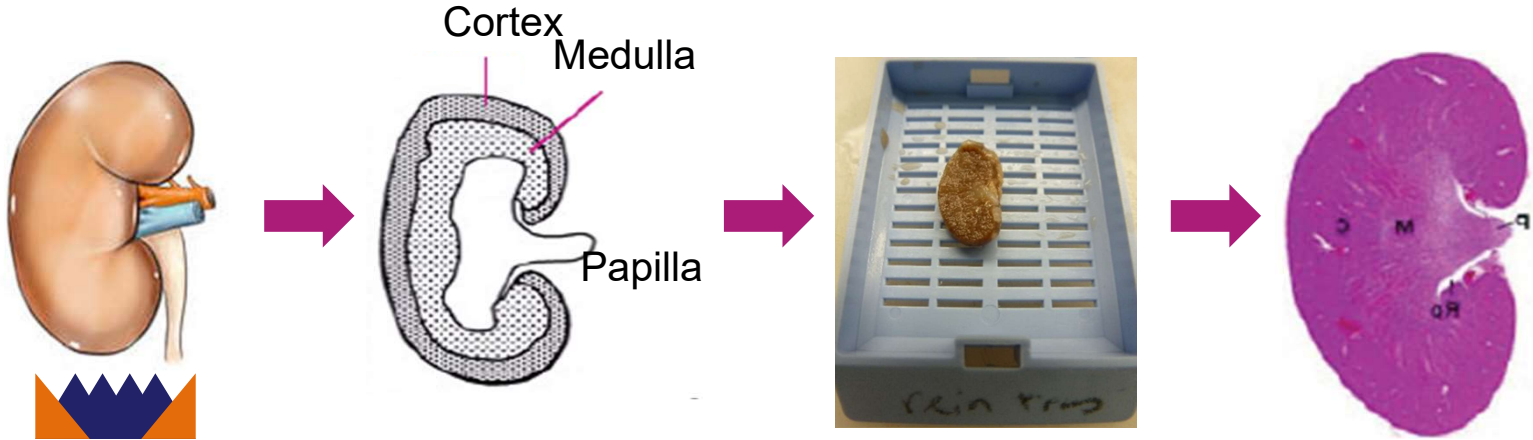


● Need-to-know

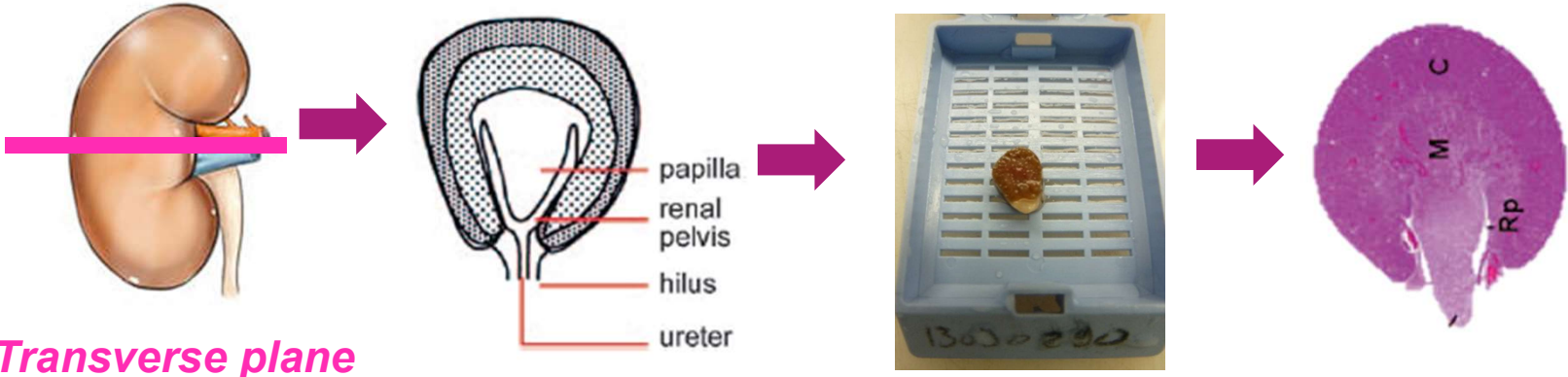
- Ventral and dorsal used but less often than anterior/posterior.
- Cranial and caudal used mostly in reference to axial skeleton.
- Proximal and distal used on appendicular skeleton.
- Dorsal/palmar and dorsal/plantar also used for human hands and feet.

Inclusion & Orientation

Exemple du rein



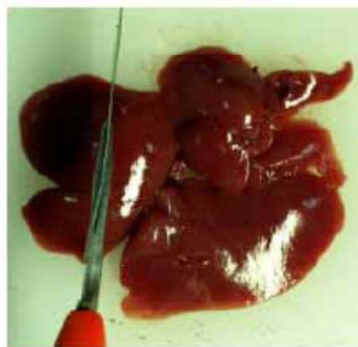
Coronal plane



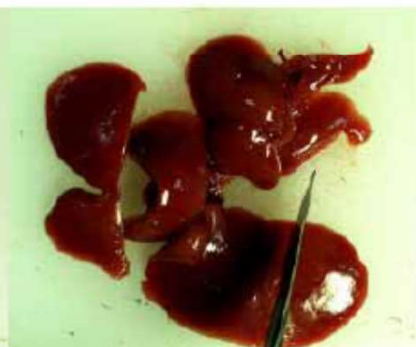
Transverse plane

Coupes et Recoupes d'un organe extrêmement codifiées selon le RITA, *Registry of Industrial Toxicology Animal data*

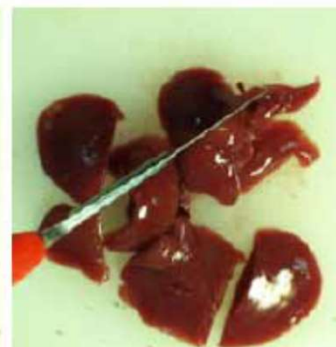
- **Tous les tissus prévus au protocole sont prélevés sur les animaux et coupés selon des procédures standardisées** (Modes Opératoires Normalisés ou Standard Operating Procedures) **qui s'appuient elles-mêmes sur des standards internationaux et réglementaires (ex: RITA: Registry of Industrial Toxicology Animal data).**
- **Les SOP définissent:**
 - Le nombre de sections à faire par organe et la localisation exacte du prélèvement
 - La direction de la coupe et du parage
 - Éventuellement, la quantité de tissu à prélever



lobe médial,



lobe gauche



lobe droit.



Recoupe sur les trois principaux lobes du foie

Registry of Industrial Toxicology Animal-data



Exp Toxic Pathol, **Part 1**: 2003; **55**: 91-106: peau glande mammaire et tube digestif
Part 2: 2004; **55**, 413-431 : app. respiratoire, app. Génital M+F, gl. endocrines
Part 3: 2004; **55**, 433-449 : app. Urinaire, SNC, SNP, oeil, muscle, os, articulation
aorte, syst lymphohématopoïétique

Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice

Part 1, Part 2 & Part 3

A joint publication of the **RITA***) and **NACAD****) groups

CHRISTINE RUEHL-FEHLERT¹, BIRGIT KITTEL², GERD MORAWIETZ³, PAUL DESLEX⁴, CHARLOTTE KEENAN⁵, CHARLES R. MAHRT⁶, THOMAS NOLTE⁷, MERVYN ROBINSON⁸, BARRY P. STUART⁹, and ULRICH DESCHL⁷

***RITA**: Registry of Industrial Toxicology Animal-data

****NACAD**: North American Control Animal Database

La réalisation du prélèvement : exemples

Que prélever?

- du tissu lésé
- toujours du tissu sain à coté du tissu lésé, sur le même prélèvement,
- les mêmes zones chez l'animal témoin
- les zones correspondantes chez les autres prochains animaux du groupe

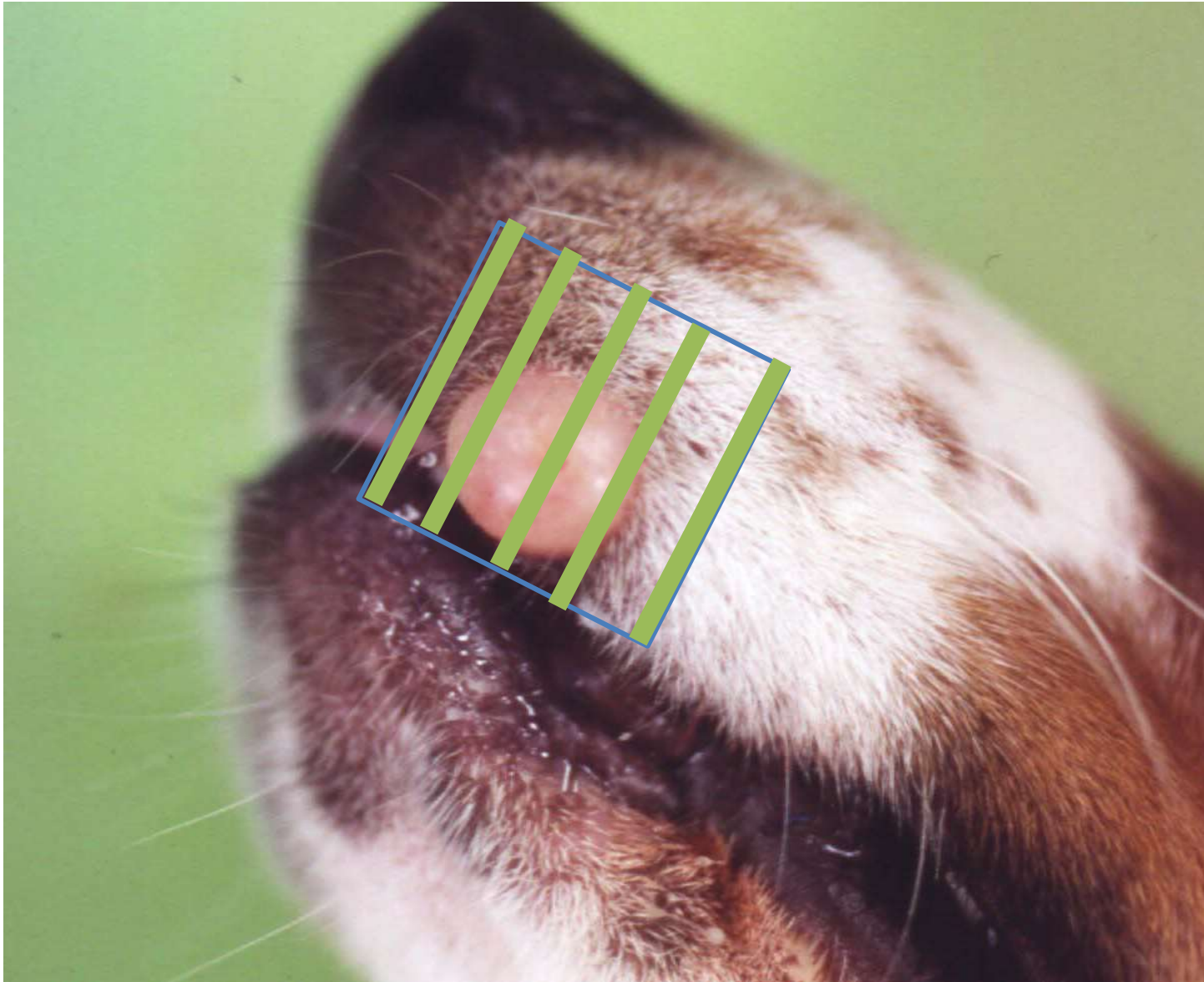
Puis: prélèvement dans une cassette d'histologie mise dans un pot de fixateur (formol), 10x le volume, au moins 48h



Bleu : la zone à prélever

Vert : les recoupes pour analyse

L'analyse portera sur le nodule et sur les tissus périphériques



Cow, liver,

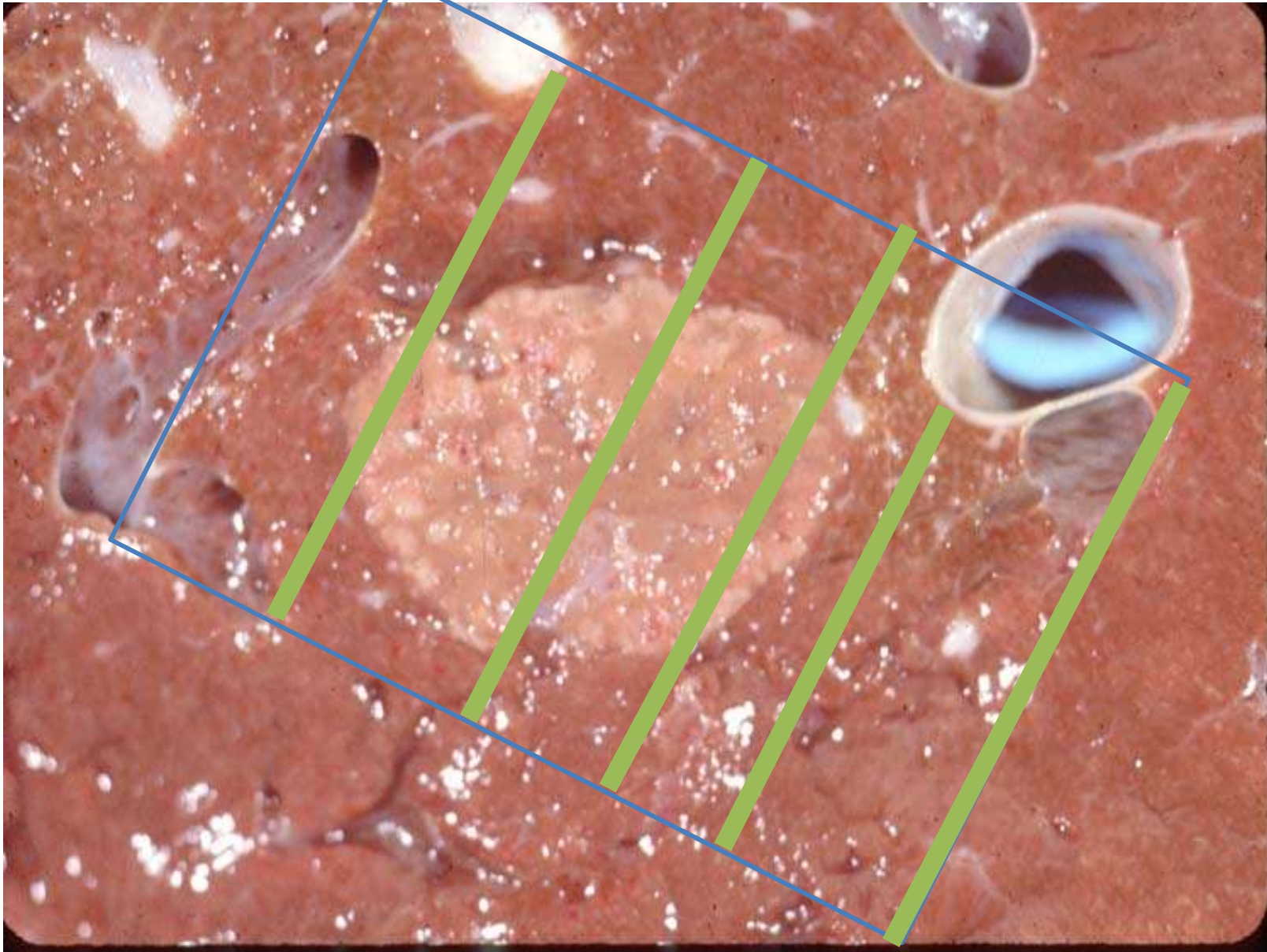


Cow, liver ,

Bleu : la zone à prélever

Vert : les recoupes pour analyse

L'analyse portera sur le nodule et sur les tissus périphériques



Cat, skin,



Cat, skin,

Bleu : la zone à prélever

Vert : les recoupes pour analyse

L'analyse portera sur le nodule et sur les tissus périphériques



En conclusion

Un BON prélèvement est

un prélèvement
nécessaire et suffisant

qui va permettre de répondre

à la/aux question(s) posée(s)

Le Rapport d'autopsie

- **Traduction de l'observation en termes scientifiques lésionnels** et orientation vers un diagnostic morphologique
- Obtention d'indications sur le pronostic de la maladie
 - Ex : taille d'un nodule tumoral et localisation du nodule
- **Sélection des prélèvements destinés à l'analyse microscopique**
 - Choix des zones pour avoir des échantillons exploitables
 - Systématiquement sur zones lésées, entourées de zones d'aspect macroscopique sain, zones limites d'exérèse
 - Fixation rapide
- **Conservation des prélèvements**
 - Fixateur puis éthanol 70%

Rapport d'autopsie

- **Déterminer**
 - **les organes atteints**
 - la nature des lésions observées et du processus pathologique en cause
- Apprécier
 - l'efficacité et les éventuelles complications des traitements administrés
- **Déterminer la cause de la mort ou du mauvais état général**
 - Liée à la maladie
 - Lié aux complications dues au traitement,
 - Due à une infection autre (exemple : intercurrente)
- Donner des indications sur le pronostic de la maladie
- **Découvrir des lésions insoupçonnées du vivant de l'animal**
- **Faciliter le travail pour l'observation microscopique :**
 - **-> Faire un compte-rendu, un rapport**
- **Exploiter de façon statistique les résultats d'autopsie**

Rapport d'autopsie

ShARM necropsy card						
Please collect lobe / region indicated by * or indicate which region was collected						
Colony ID		DOB		Breeder status	Ex breeder / virgin	
Strain		Source		MGI no.		
Mouse ID no. (institute)		Mouse ID no. (ShARM)		Male/Female		
Sacrifice	Method used	Cerv. Dis./Overdose/Exsang.	Date	Time	AM/PM	
Tissue	Collected (v)	Observations				
Serum						
Brain						
Gut:						
Duodenum *						
Jejunum						
Ileum						
Cecum						
Colon						
Pancreas:						
Spleen						
Liver:						
Left lobe *						
Median lobe						
Right lobe						
Caudate lobe						
Kidney:						
Left *						
Right						
Lung:						
Heart						
Thymus						
Muscle						
Bone						
Femur						
Breast tissue						
Brown adipose						
White adipose						
Welfare issues			Deviations from SOP			

Please send a pathology report if available.

Please sign to confirm that the serum, brain and gut were collected within 3 mins and all other tissues within 10 mins of death.

Signed

Name

Autopsie & Etude macroscopique

Conclusion

- Observation description
 - Analyse
 - Synthèse
- **Compte-rendus / Rapports d'autopsie**
 - avec photos
 - schémas
 - données statistiques
 -
- **Plein de résultats !**



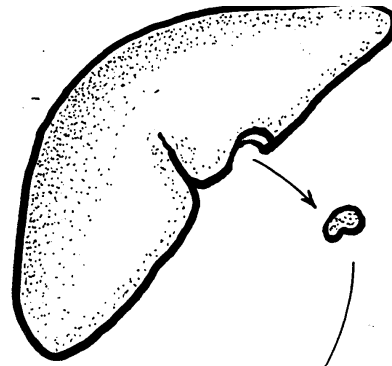
L'autopsie est une phase primordiale en histologie et en anatomie pathologique

Les tissus bien prélevés => de bons échantillons => des études de qualité

Le rapport d'autopsie de chaque animal permettra d'obtenir une étude statistique avec les groupes d'animaux



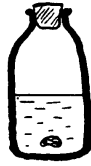
2- Du prélèvement
au bloc puis à
la lame histologique



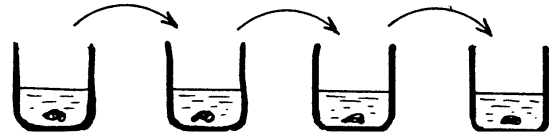
Prélèvement de l'échantillon

Fixation

Formol 10%

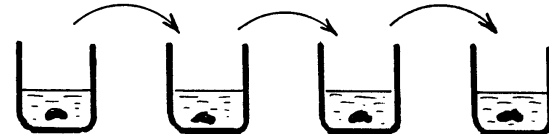


Alcools



Déshydratation

50°-70° 80°-90° Absolu

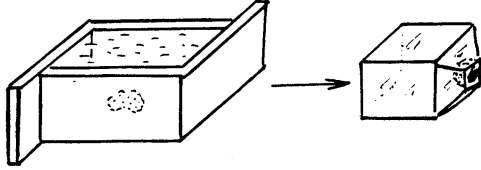


Inclusion

Toluène,
xylène

solvant / paraffine

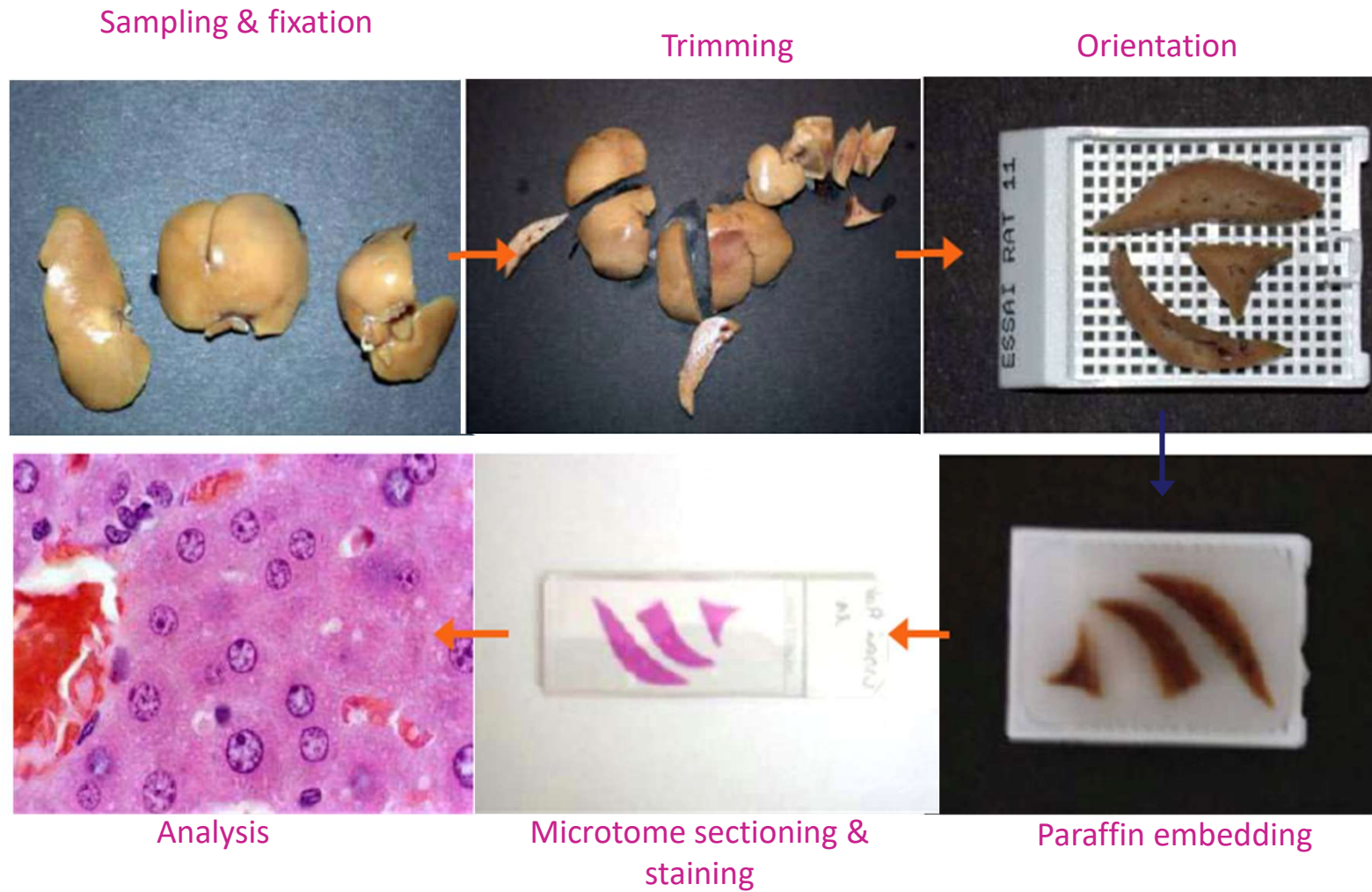
paraffine



Bloc prêt à couper

HISTOLOGY IN RESEARCH

Successive stages for the preparation of the FFPE -formalin fixed paraffin embedded- tissues



Différents plateaux composant le RHEM



BCM

Exp. anatomopathologique

Microtomie

Mise à disposition

TMA



Institut de
Recherche en
Cancérologie
I R C Montpellier

Cryotomie L1

Cryotomie L2

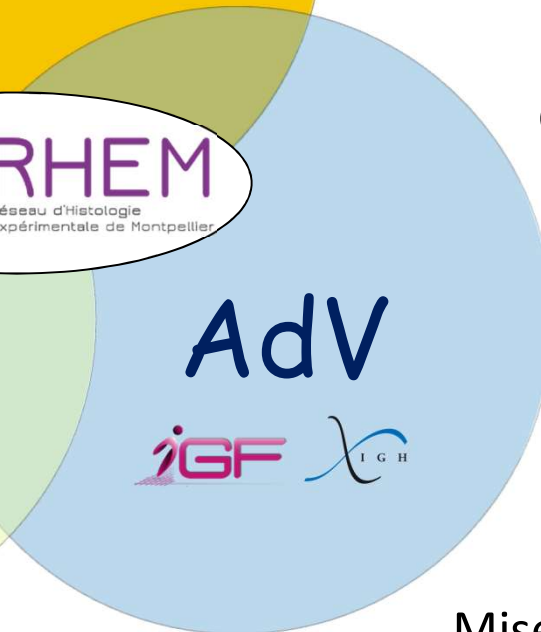


NFS & biochimie

Transparisation



igmm
INSTITUT DE GÉNÉTIQUE
MOLÉCULAIRE DE MONTPELLIER



Adv

iGF IGH

RNAscope

Mise à disposition

Mise à disposition

Equipe du RHEM_IRCM



Resp. scientifique
Resp. technique
Pathologiste
Equipe

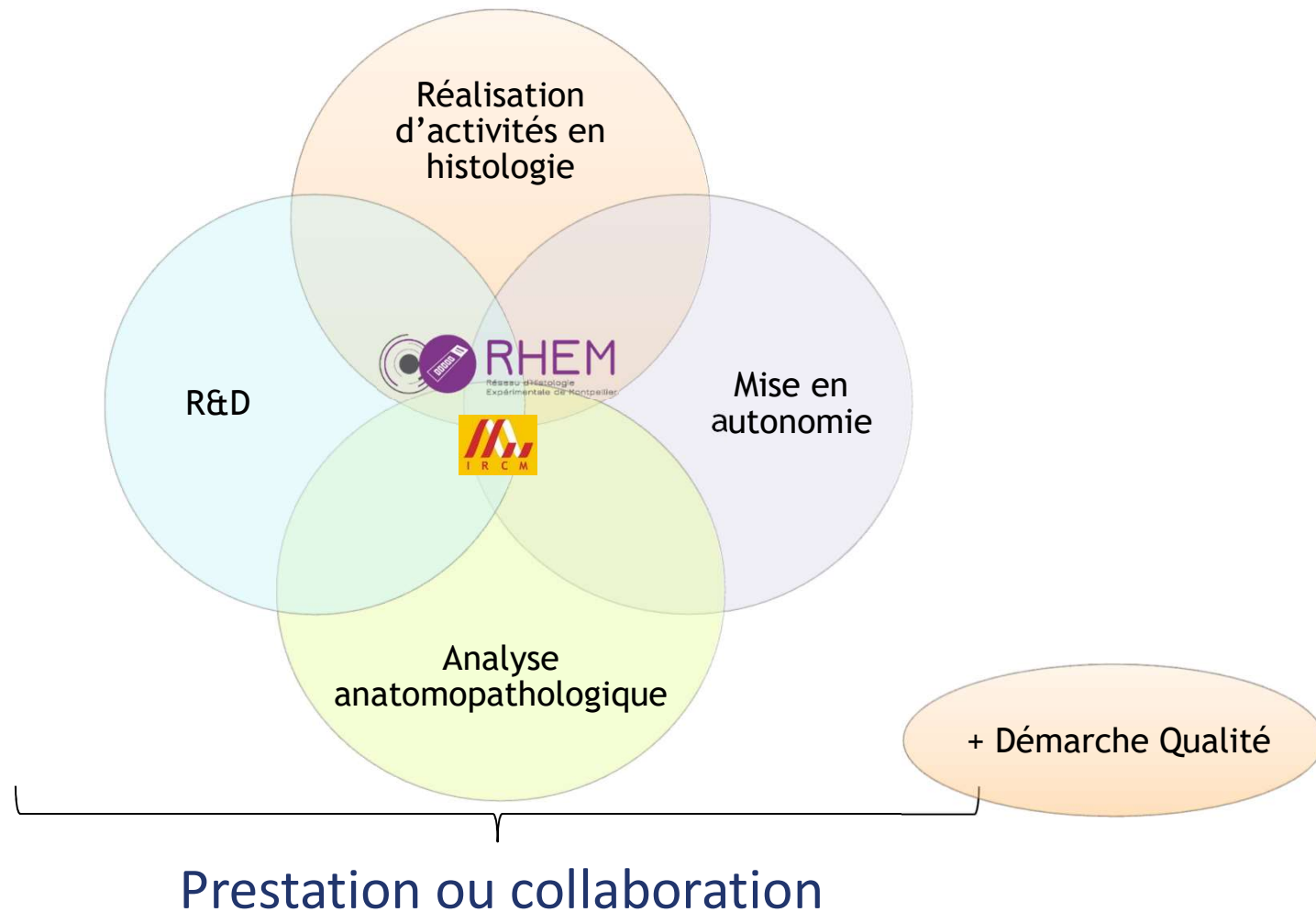
Matthieu Lacroix CR INSERM
Nelly Pirot IR INSERM
Florence Bernex MCU UM
Aurélie Covinhes AI CDI CNRS
Jean-Yohan Noël AI INSERM

Hanane Mansouri IE CNRS
Morgane Broyon AI CNRS
Alicia Seguin AI CNRS

Permanents

CDD

Plateau spécialisé dans le phénotypage histologique des modèles pré-cliniques –
essentiellement sur blocs FFPE



Activités histo : Fixation, impregnation paraffine



BCM

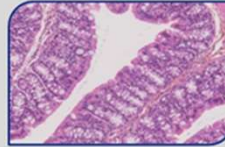
Embedding



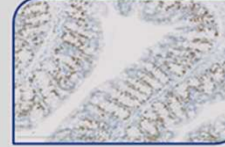
Sectioning



Staining



Immunolabelling



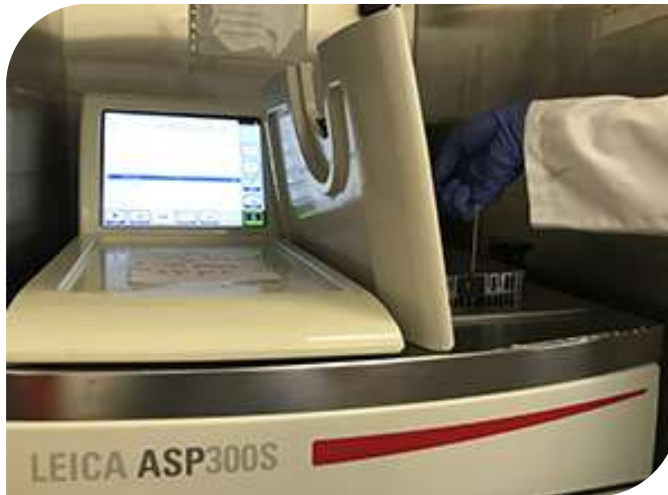
Slide scanning



Analysis



- 1 Automate ASP300 Leica : 210 cassettes/run



- 2 Stations d'inclusion Leica



Activités histo inclusion paraffine => le bloc



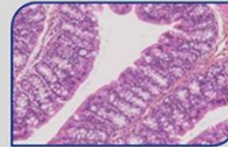
Embedding



Sectioning



Staining



Immunolabelling



Slide scanning

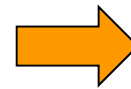
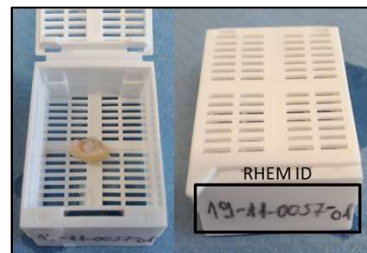


Analysis

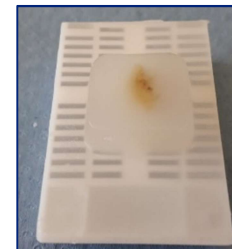


- Production de bloc de paraffine avec orientation des échantillons selon des plans spécifiques

Fixed sample in identified cassette



FFPE Block



Activités histo : inclusion paraffine => le bloc



BCM



Activités histo : la coupe



BCM

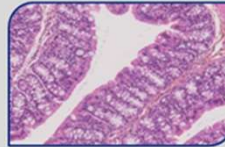
Embedding



Sectioning



Staining



Immunolabelling



Slide scanning



Analysis



➤ 2 microtomes classiques



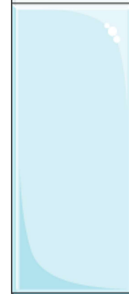
➤ 2 microtomes Niagara dont un réversible



➤ 1 graveur de lames



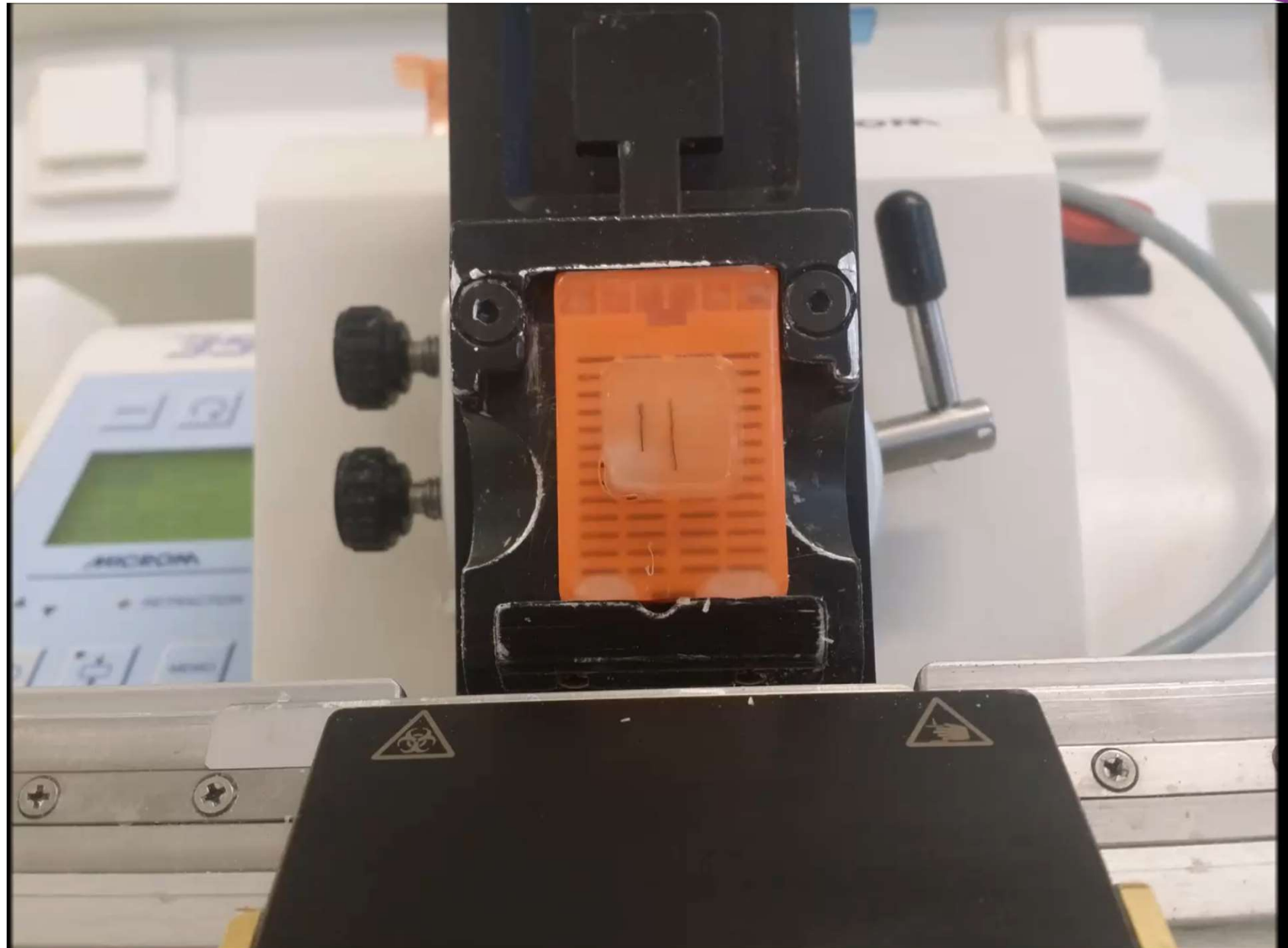
21-3-0234-01-001
HES
NOM Prénom
Cde : 3456
IRCM



Activités histo : la cope du bloc



BCM

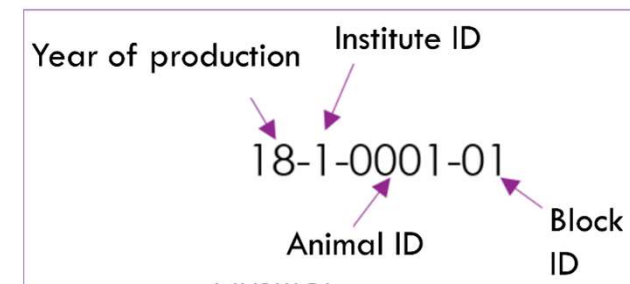
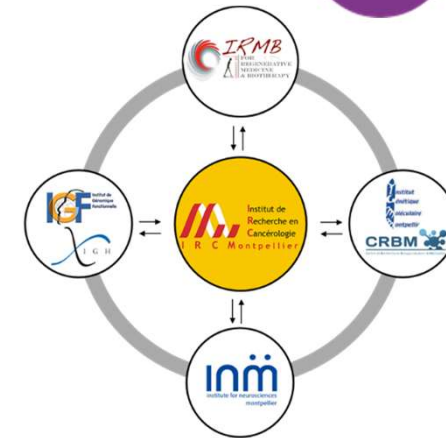


Outils logistiques nécessaires

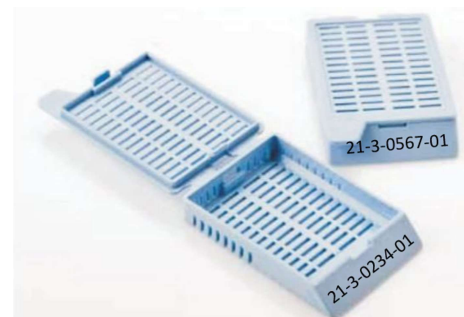


BCM

- Navette Inserm (2 fois/semaine sur 5 campus)
- Logiciel de gestion de laboratoire (100Lims4Histo) pour
 - tracer les commandes d'histologie,
 - définir les actes techniques et
 - tracer les données sur les animaux/échantillons



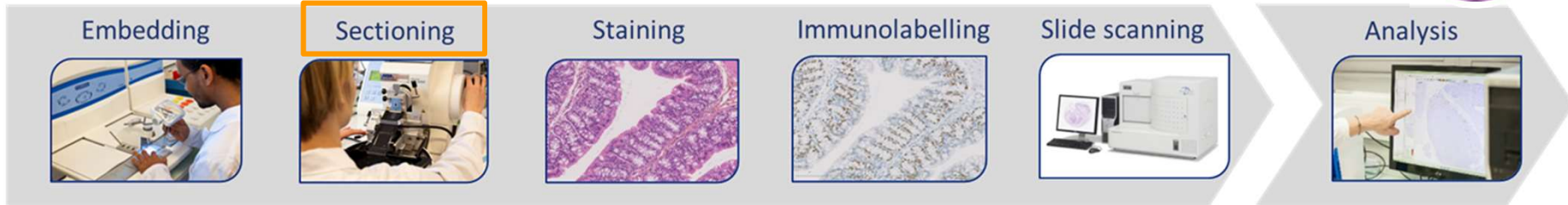
- Graveurs de cassettes sur 3 sites : IRCM, IGMM, IRMB **IBiSA**



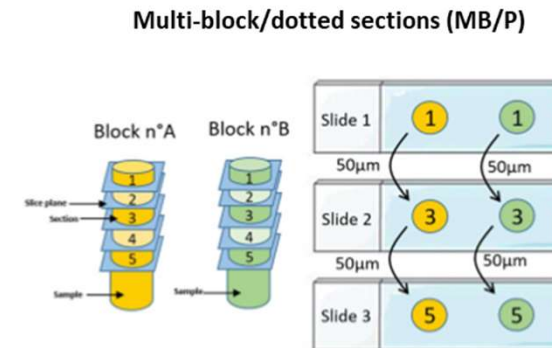
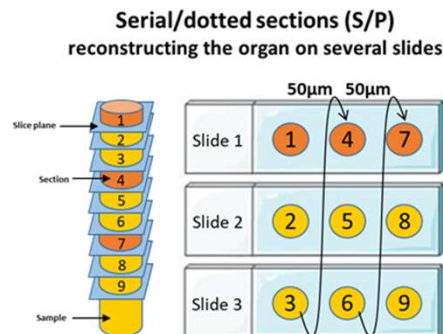
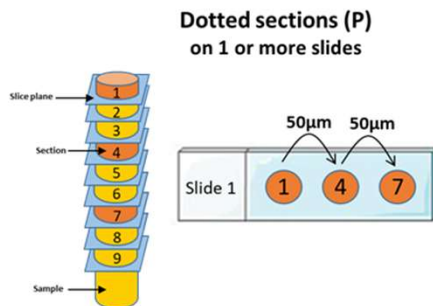
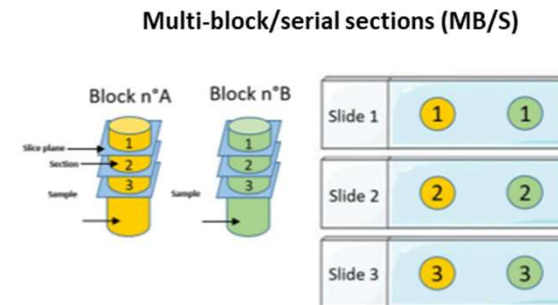
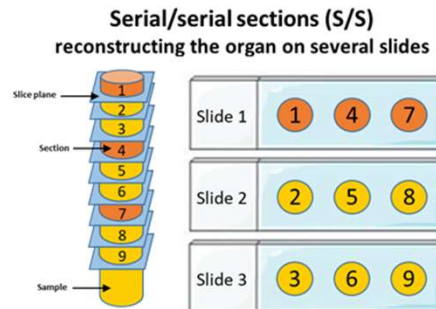
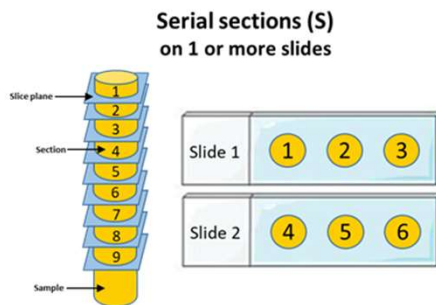


3- Sur la lame histologique.....

Activités histo : la coupe



➤ Diverses méthodes de coupes proposées



Mise en autonomie des utilisateurs



BCM

- 1 graveur de cassettes



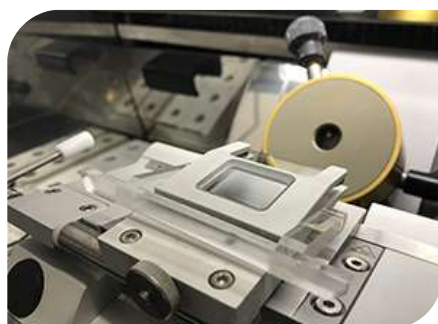
- 1 microtome classique



- 1 microtome Niagara réversible



- 1 cryostat HM550 MM France



- 1 microscope fond clair

=> Tous les équipements sont réservables en ligne

Activités histo : la coloration



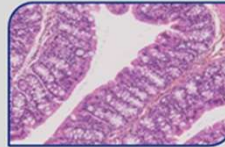
Embedding



Sectioning



Staining



Immunolabelling



Slide scanning



Analysis



➤ 1 Colorateur Leica



➤ 1 Colleuse de lamelles MM France



Activités histo : la coloration



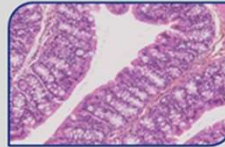
Embedding



Sectioning



Staining



Immunolabelling



Slide scanning



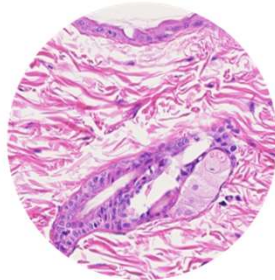
Analysis



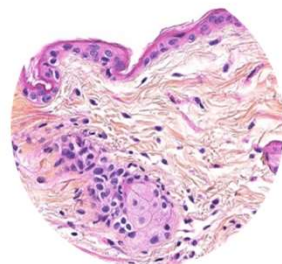
➤ Diverses colorations proposées

Classical staining

Hematoxylin-eosin



Hematoxylin-eosin-saffron



Activités histo : la coloration



BCM

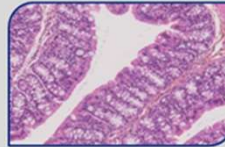
Embedding



Sectioning



Staining



Immunolabelling



Slide scanning



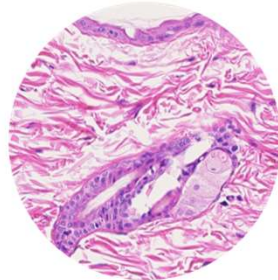
Analysis



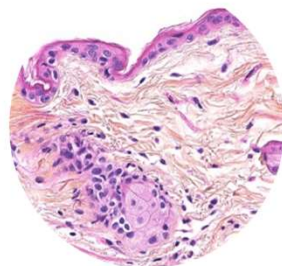
➤ Diverses colorations proposées

Classical staining

Hematoxylin-eosin

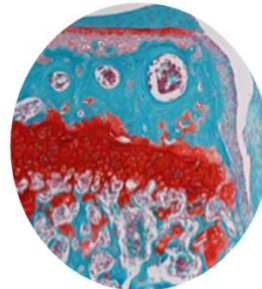


Hematoxylin-eosin-saffron

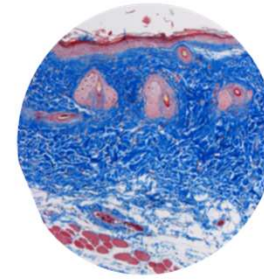


Special staining

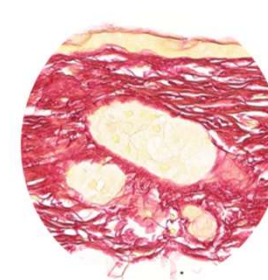
Safranin O - Fast green



Masson's trichrome



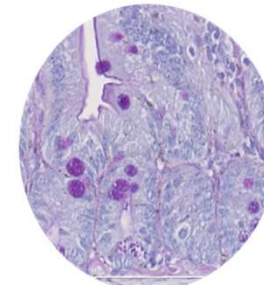
Picrosirius red



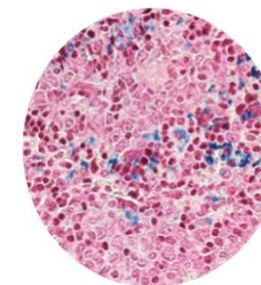
Alcian Blue



Periodic Acid - schiff



Perls



Activités histo : IHC/IF



BCM

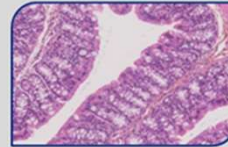
Embedding



Sectioning



Staining



Immunolabelling



Slide scanning



Analysis



- 1 Automate d'immunomarquage Roche Ventana
 - 30 tiroirs indépendants
 - 30 protocoles différents simultanés
 - Répartition homogènes des réactifs
 - Dépôts manuels
 - Pas captif



- 1 PT module MM France



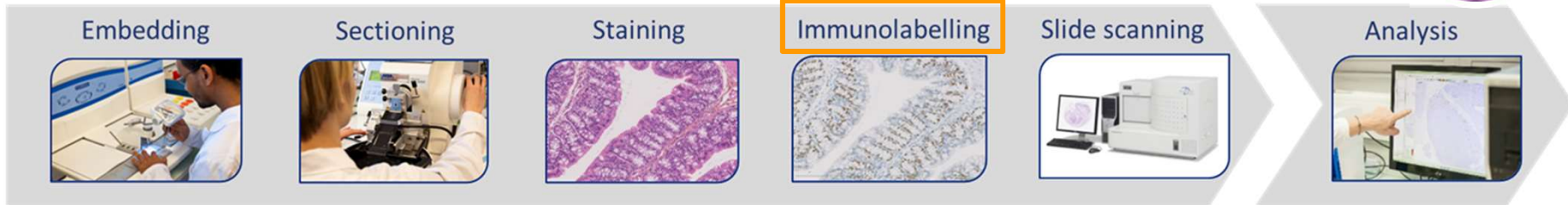
- 1 Colleuse de lamelles MM France



Activités histo : IHC/IF



BCM



➤ Divers marquages 1-plex ou 2/3-plex en IHC et en IF

Human proliferative cells
(Ki67 MIB1 - PDX)

Murine proliferative cells
(Ki67 SP6 - MLN)

Notch pathway
(HES1 - esophagus)

Transcriptional CDKs
(CDK8 - intestine)

Immune cells

Leucocytes (CD45)	LT (CD3e)
Macro (F4/80)	LB (PAX5)

Spleen

Apoptotic cells
(Casp3a - Lymh node)

Tumor suppressor gene
(P53 - E4F1 KO skin)

DNA break
(p-γH2AX - Testis)

Blood vessels
(CD31)

Lymph node

Lymphatic vessels
(Lyve-1)

Tumor cells
(MAB1273 - PDX)

Tumor cells
(Alu - PDX)

GFP
(K14-GFP - skin)

Mesench. Cells
(Vimentine - colon)

Markers for :
Specific cells
Cellular pathways
Processes

1 séance de TD

Activités histo : scan des lames



BCM

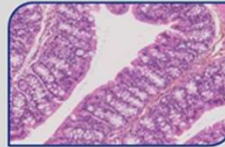
Embedding



Sectioning



Staining



Immunolabelling



Slide scanning



Analysis



- Transmission des lames par la navette du jeudi au plateau MRI_INM
- Numérisation le vendredi par un ingénieur MRI sur le scanner en fond clair Hamamatsu
- 210 lames max/semaine
- Récupération des lames virtuelles le lundi et des lames physiques le mardi



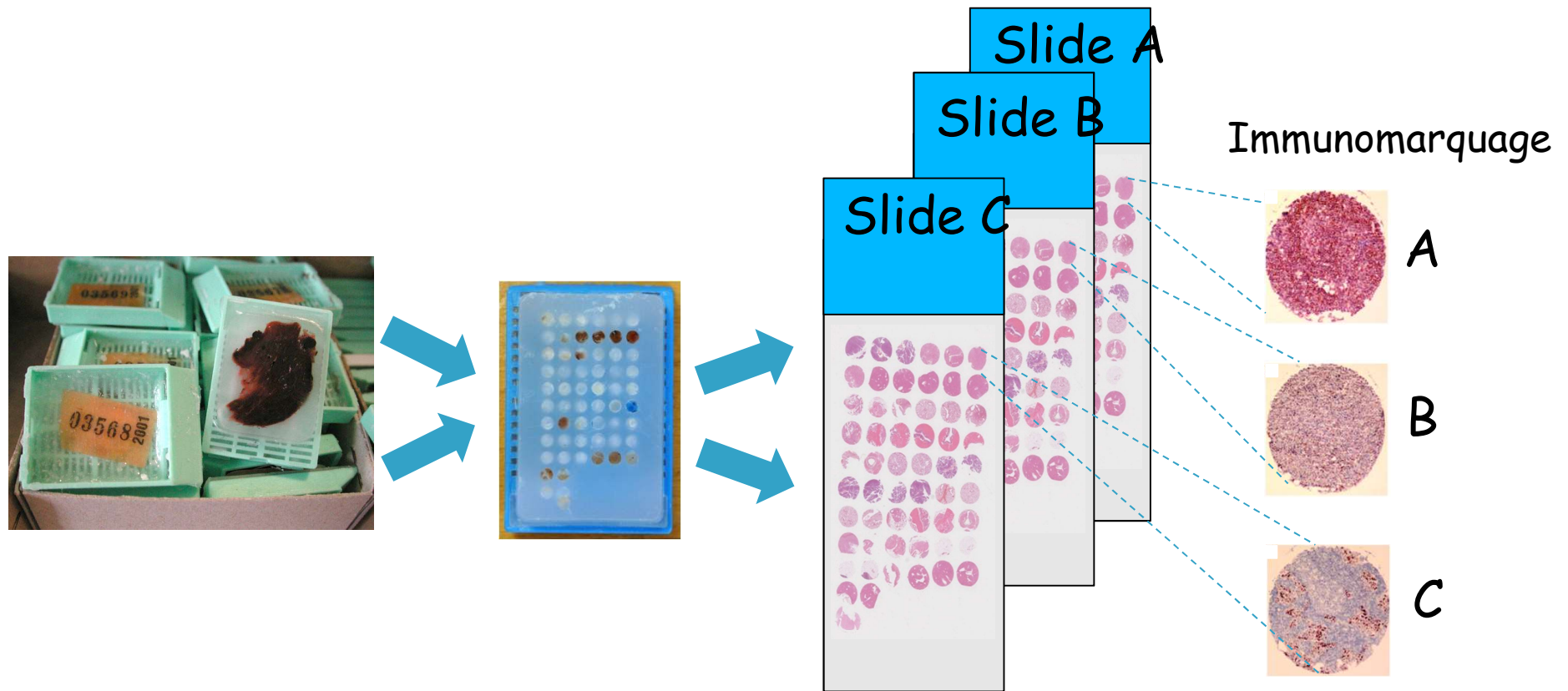
Virtual slide of mouse intestine roll immunostained by CD3e (LT marker)



- ✓ Annotation
- ✓ Segmentation
- ✓ E-Learning
- ✓ E-Pathology

2 séances de TP

But : obtenir dans un même bloc (receveur) plusieurs échantillons carottés issus de différents blocs donneurs



Blocs donneur

Bloc receveur

Lames de TMA colorées

Développement de TMA, Tissue Micro Arrays



BCM

Utilisation de la LV pour sélectionner la zone à carotter Dernière génération de TMArrayer

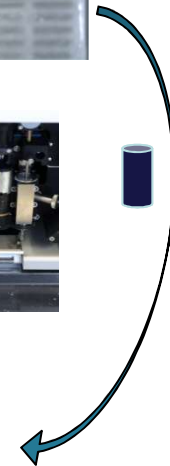
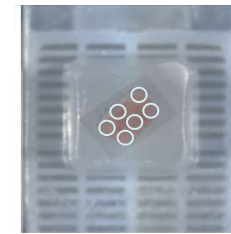
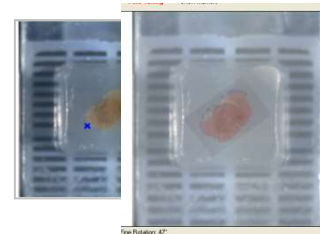
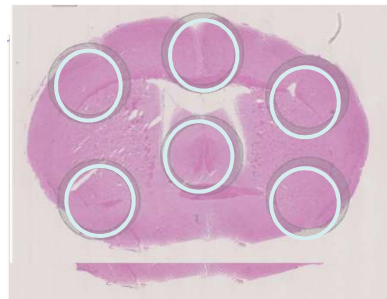


1 lame pour 1 bloc donneur

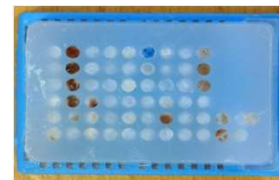
Lame virtuelle
Sélection des zones d'intérêt

Superposition de la LV
et du bloc donneur

Carottages du bloc
donneur



Lame dérivée



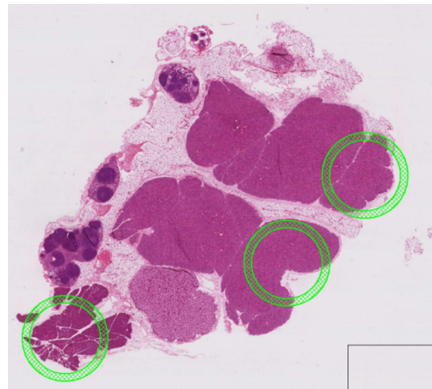
Bloc de TMA



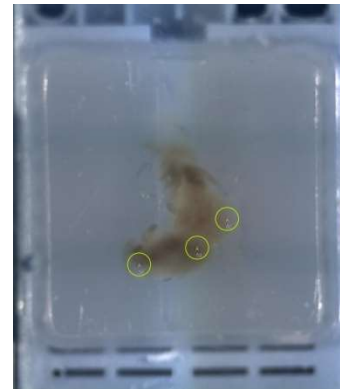
Carotte transférée dans
le bloc receveur

Avantages de cette technologie

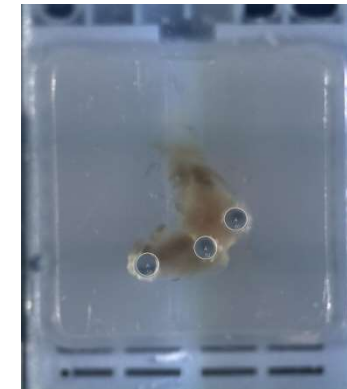
Sélection des zones d'intérêt



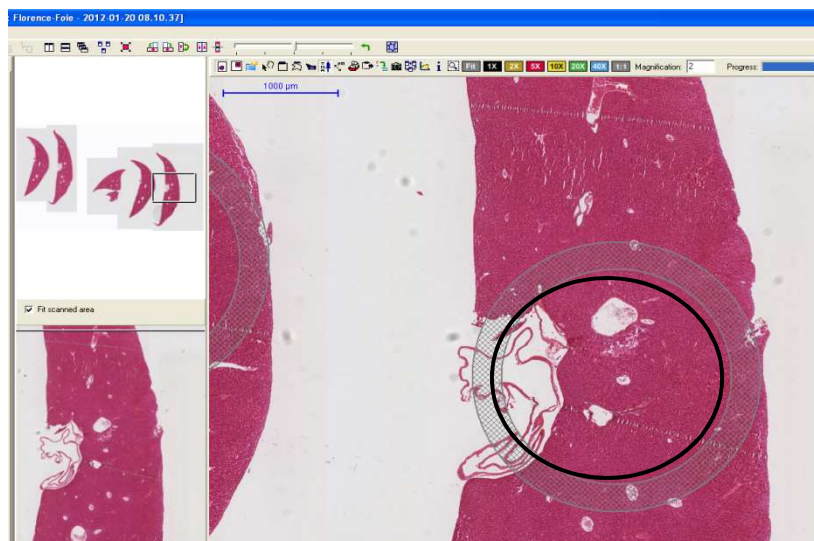
Avant carottage



Après carottage



Correspondance étroite entre la zone sélectionnée et le tissu carotté dans le bloc TMA



Avantages de cette technologie

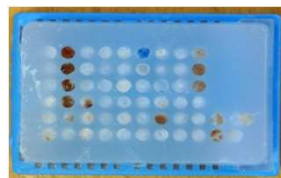
- Analyse de nombreux échnatillons et tests de nombreux marqueurs (70-100 lames/bloc TMA)

Diamètre des carottes de TMA



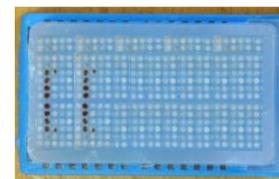
Nombre de carottes

2 mm



80 carottes
tissulaires

0,6 mm



400 carottes

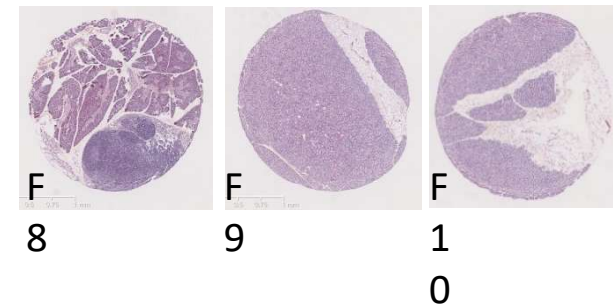
Avantages de cette technologie

- Traçabilité de chaque carotte de tissu

Carte du TMA

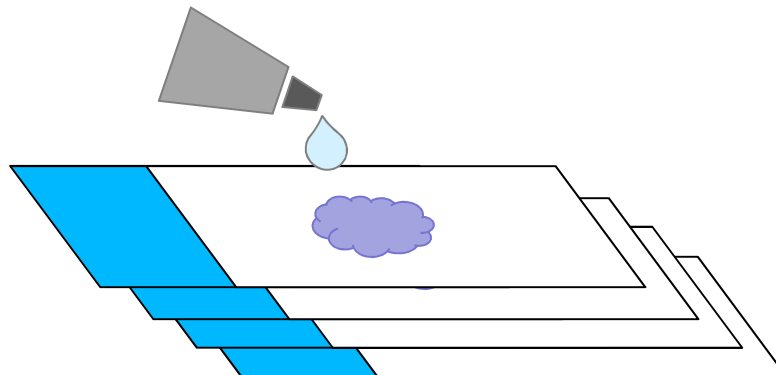
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	12040053		12040053	12030598	12030598	12030630	12030630	12030609
2		12030609		12030611	12030611	12030612	12030612	12030613
3	12030614		12030614	12030615	12030616	12030606	12030606	12030607
4	12030607	12030605	12030605	12030603	12030603	12030619	12030619	12030631
5	12030631	12030626	12030626	12030626	12030629	12030629	12030630	12030630
6	12030630	12030630	12030627	12030627	12030608	12030608	12030628	12030628
7	12030610	12030610	12030610	12030610	12030598	12030624	12030623	12030623
8	12030622	12030618	12030618	12030767	12030767	12030762	12030762	12030762
9								
10	12030763	12030772	12030772	12030774	12030774	12030776	12030777	12030777
11	12030778	12030778	12030779	12030779	12030769	12030769	12030769	12030769
12	12030770	12030770	12030768	12030768	12030793	12030793	12030793	12030782
13	12030782	12030792	12030792	12030792	12030792	12030787	12030787	12030787
14	12030787	12030790	12030790	12030791	12030791	12030791	12030788	12030771
15	12030771	12030789	12030785	12030783	12030781	12030786		12030784

Bloc #
12030762 en
triplicate

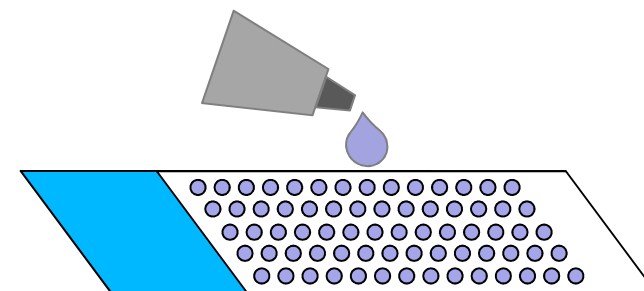


- Conditions techniques identiques pour tous les échantillons, consommables et gain de temps

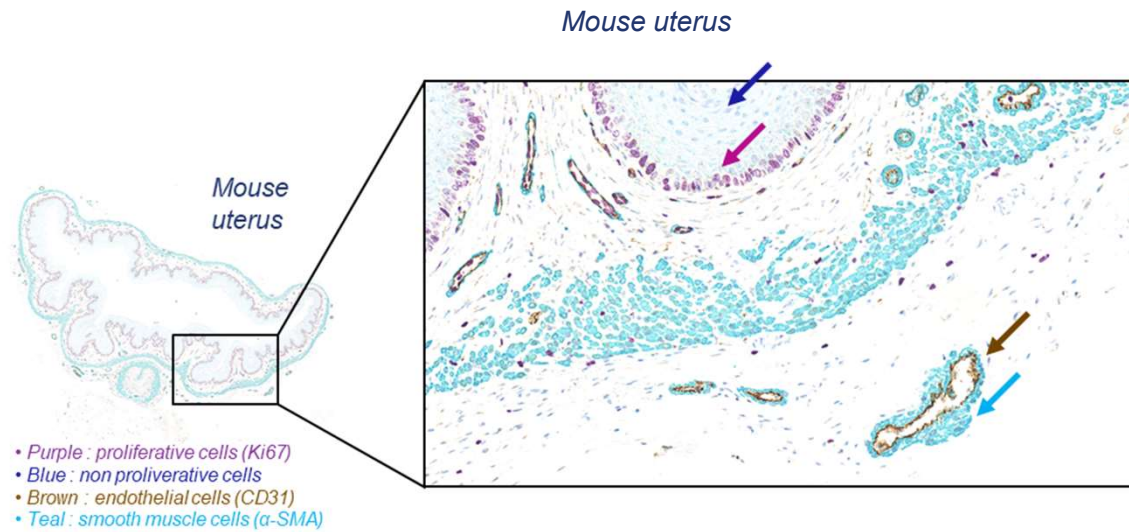
Pour 1 anticorps : 100 blocs différents
Pour 100 lames



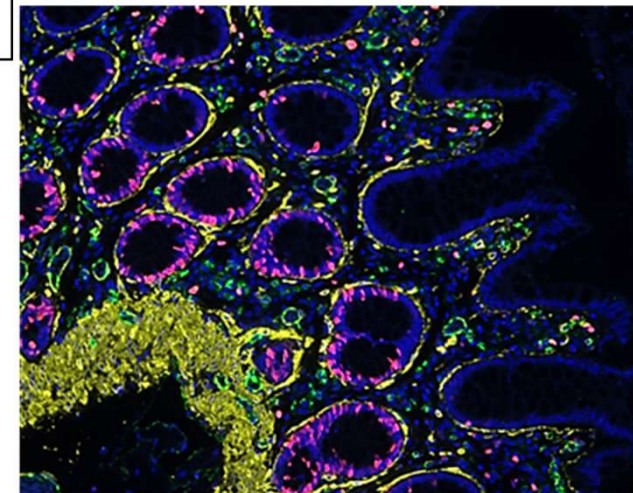
100 blocs différents dans 1 bloc TMA
pour 1 lame



1-plex & multiplex developments



Human colon



- Yellow : Smooth Muscle cells (α SMA)
- Purple : proliferative cells (Ki67)
- Green : endothelial cells (CD31)
- Blue : cell nucleus

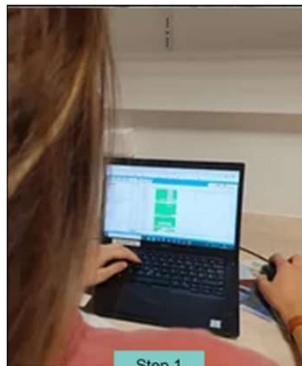
Développement d'une Biobanque



- ✓ Mieux exploiter les blocs FFPE des modèles précliniques de maladies humaines avec le développement d'un site web de requête à l'image d'une biobanque humaine



- Etablir de nouvelles collaborations scientifiques à travers le partage de blocs FFPE
- Gagner du temps et de l'argent en évitant la duplication d'expérimentation
- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation animale (Principes des 3R)



Step 1

Searching for specific FFPE blocks

- Defining needs (animal model, genotype, age, nature of tissue, etc)
- Selecting specific blocks
- Sending a request



Step 2

Checking request feasibility

- Checking the availability of blocks
- Checking the feasibility of histology techniques used



Step 3

Material transfert Agreement

- Defining the scope of the collaboration
- Validating a cost estimate and dead lines
- Signature



Step 4

Treatment of the request by RHEM

- Selectioning selected FFPE blocks
- Treating the slides produced



Step 5

Sending produced material

- Defining shipping conditions
- Sending the requested biological material

□ 2014 & 2019, **Labellisation** plateforme IBiSA

- L'ouverture aux équipes extérieures
- les moyens humains,
- le système de gestion,
- l'innovation technologique
- la formation



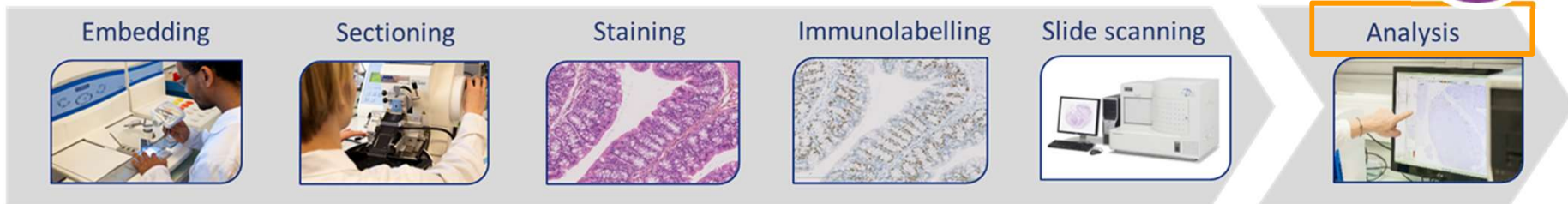
□ 2022, **Certification** du Système de Management de la Qualité

- Norme qualité ISO NF ISO 9001
- ou
- Norme qualité plateforme NFX-50-900





4- L'anatomie pathologique



- Expertise anatomopathologique par un vétérinaire pathologiste
 - Sous condition d'une demande spécifique (indépendant du 100LIMS)

1 séance de TD



5- Résumé Take Home message

Résumé / Take home message

L'autopsie est une phase primordiale en histologie et anatomie pathologique
Les tissus bien prélevés => de bons échantillons => des études de qualité

Les techniques histologiques sont variées. Le SMQ est primordial
(traçabilité, qualité des actes, standardisation des techniques ...)
Les immunomarquages sont utilisés de façon quotidienne.

L'observation, la description et l'analyse des lésions macroscopiques est
aussi une phase déterminante.

L'analyse microscopique est à confier à un spécialiste. Mais une initiation
est possible..

Merci pour votre attention