

## Impact des procédures de fixation et de congélation sur la préservation du tissu de la glande mammaire de souris

Sophie Chat<sup>1</sup>, Christine Péchoux<sup>1</sup>

**Résumé :** *L'étude du trafic intracellulaire (voies de sécrétion et/ou d'endocytose) dans les cellules épithéliales de la glande mammaire au cours de la différenciation cellulaire, ou pendant la lactation, par les méthodes de microscopie nécessite une préparation minutieuse des tissus. Cette préparation a un double but : conserver l'antigénécité des molécules à analyser et préserver la morphologie cellulaire pour la localisation précise de ces molécules.*

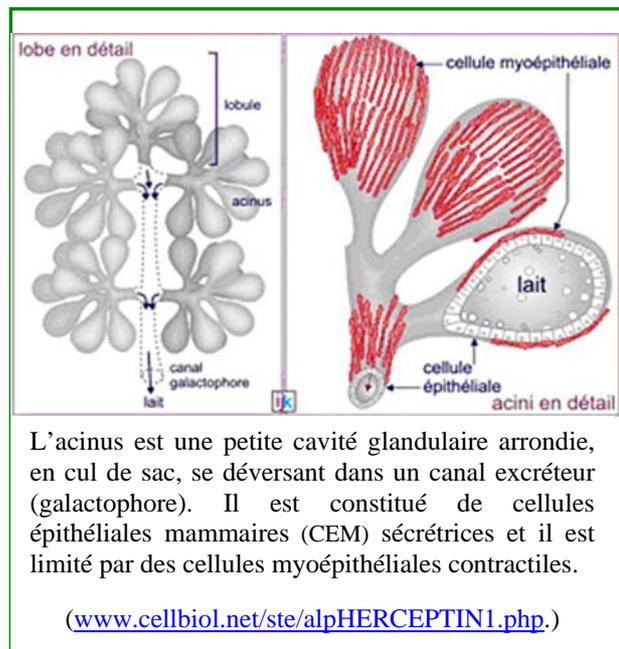
*Nous avons testé différentes méthodes de fixation/congélation de fragments de glande mammaire de souris en lactation pour définir la méthode la mieux adaptée à notre problématique.*

**Mots-clés :** glande mammaire, fixation, congélation, préservation tissulaire et moléculaire, immunohistochimie

### Introduction

La fonction principale de la glande mammaire est la synthèse et la sécrétion des produits du lait. Ces processus se mettent en place au cours de la gestation dans les cellules épithéliales mammaires (CEM) qui constituent la glande mammaire en lactation. Les CEM, cellules sécrétrices, entourées de cellules myoépithéliales contractiles, s'organisent en acini au sein d'une matrice extracellulaire (MEC) qui est constituée principalement de collagène et de vaisseaux sanguins. Pendant la lactation, les CEM synthétisent de grandes quantités de protéines, de lipides et de lactose. Les produits sont sécrétés par exocytose au pôle apical des cellules, dans la lumière des acini. Les CEM transportent également vers la lumière, des molécules issues du sang par le processus de transcytose.

Le transport intracellulaire des molécules sécrétées est une des thématiques de notre unité de génomique et physiologie de la lactation (GPL) du centre Inra de Jouy-en-Josas. Ce processus fait intervenir divers compartiments cellulaires : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, réseau trans-Golgien et des vésicules de sécrétion. Nous étudions les mécanismes moléculaires et cellulaires de la sécrétion par différentes techniques. Ainsi, la localisation des molécules et des différents compartiments se fait par immunohistochimie et/ou par



<sup>1</sup> Inra, Unité GPL (Génomique et Physiologie de la Lactation) – Plateforme MIMA2

Domaine de Vilvert – 78352 Jouy-en-Josas ☎ 01 34 65 25 35 ✉ [sophie.chat@jouy.inra.fr](mailto:sophie.chat@jouy.inra.fr) et [christine.longin@jouy.inra.fr](mailto:christine.longin@jouy.inra.fr) responsable du plateau « microscopie électronique à transmission »

microscopie électronique à transmission. Ces approches requièrent une bonne préservation des structures pour l'interprétation des résultats.

Actuellement la préparation des échantillons varie selon les équipes de l'unité. Pour unifier les protocoles de préparation des échantillons de glandes mammaires pour la microscopie photonique, nous avons testé 4 modes opératoires de fixation en microscopie optique, utilisés dans l'unité. Nous avons utilisé un mode opératoire classique de microscopie électronique à transmission (MET) pour contrôler la morphologie subcellulaire des quatre échantillons obtenus. Nous espérons pouvoir uniformiser les préparations pour mieux comparer et interpréter nos résultats.

Nous avons contrôlé la conservation de l'antigénécité moléculaire par immunofluorescence et nous avons observé la structure fine des tissus en microscopie électronique à transmission (**tableau 1 - MET**). A partir de cette étude nous avons rédigé un mode opératoire standard selon les normes de l'assurance qualité, il est à la disposition des utilisateurs de notre unité.

## **1. Matériels et méthodes**

### **1.1 Animaux**

Les souris lignée CD1, femelles en lactation élevées dans l'animalerie rongeurs du centre Inra de Jouy-en-Josas, sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les glandes mammaires sont excisées et déposées sur la glace avant d'être traitées.

### **1.2 Fixation**

Les glandes sont recoupées en fragments de 5 mm<sup>3</sup> et divisées en 3 groupes :

- le premier groupe de fragments est directement plongé dans l'azote liquide (**tableau 1, A**) ;
- le deuxième groupe est fixé dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) pendant 4 heures à température ambiante (**tableau 1, B-C-D**) ;
- le troisième groupe est recoupé en fragments de 1 mm<sup>3</sup> qui sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2% dans un tampon cacodylate 0,1M, pH 7.2, pendant 4 heures à température ambiante, en vue d'une analyse MET (**tableau 1, MET**).

### **1.3 Congélation et coupes**

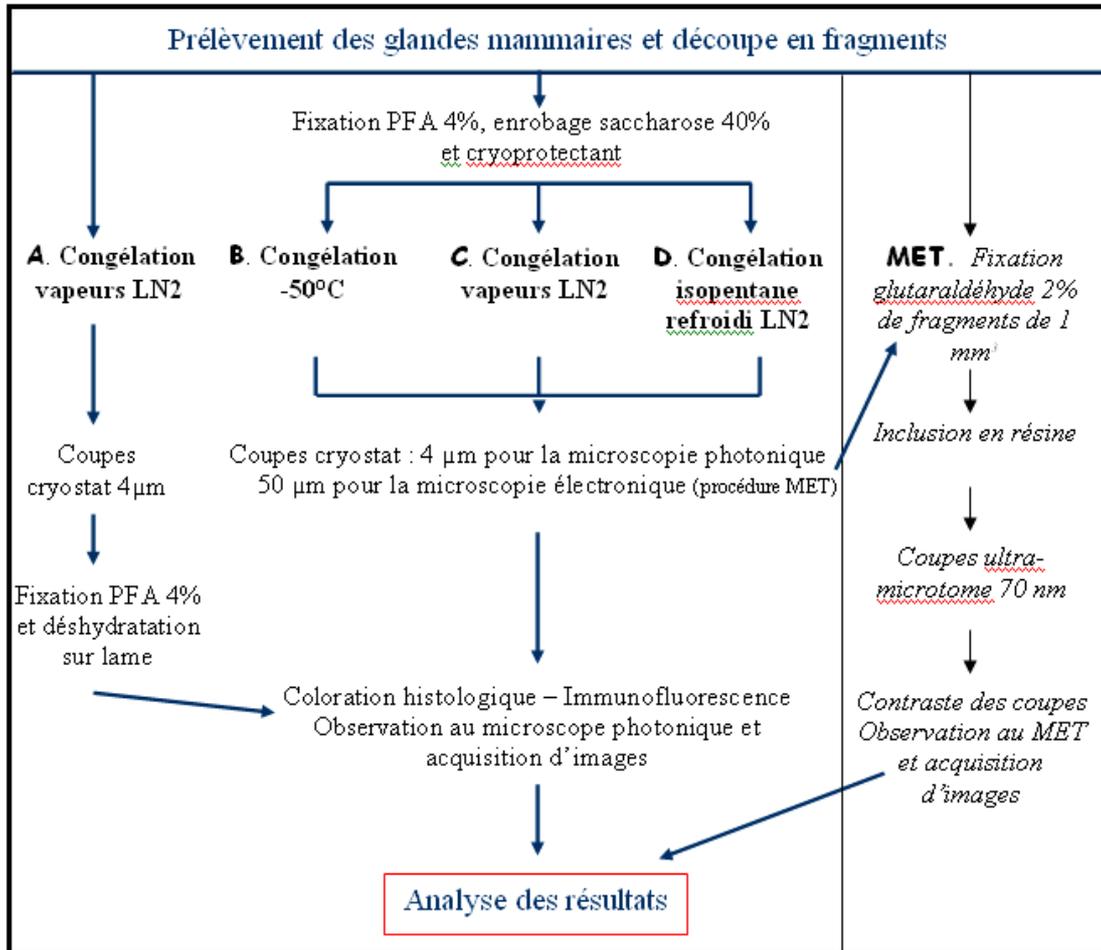
- L'échantillon directement congelé à l'azote liquide est sectionné en coupes de 4µm d'épaisseur. Les coupes sont réalisées avec un cryocut (Leica CM3050S - France) à une température de -25°C. Elles sont recueillies sur des lames superfrost, fixées 15 min dans une solution de PFA 4% à +4°C puis rincées dans du tampon PBS avant d'être déshydratées par des concentrations croissantes d'éthanol. Les lames sont stockées à -20°C (**tableau 1, A**).

- Les échantillons fixés dans la solution de PFA 4% sont incubés dans une solution de saccharose à 40%, une nuit à +4°C sous agitation, puis enrobés dans un milieu cryo-protecteur. (**tableau 1, B, C, D**) :

- les fragments B sont congelés à -50°C selon le protocole du cryocut Leica. Les blocs de tissus cryo-protégés sont déposés sur un porte-objet refroidi à -50°C dans l'enceinte du cryocut.
- les fragments C sont congelés dans les vapeurs d'azote liquide.
- les fragments D sont congelés dans de l'isopentane refroidi par l'azote liquide. Un erlen contenant de l'isopentane est refroidi dans une cuve remplie d'azote liquide, les blocs de tissus déposés sur une feuille de papier d'aluminium sont mis à flotter sur l'isopentane.

Pour tous ces échantillons, des coupes de 4  $\mu\text{m}$  sont réalisées avec le cryocut et recueillies sur des lames superfrost.

-Parallèlement, un fragment de 30 à 50  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est prélevé puis plongé dans la solution de glutaraldéhyde à 2% tamponnée, ce dernier prélèvement sera traité pour l'analyse en MET (**tableau 1, MET**).



**Tableau 1 :** Description des protocoles suivis pour la préparation des échantillons

#### 1.4 Coloration histologique

La morphologie des tissus est contrôlée sur une coupe de chaque échantillon (**figure 1 A,B,C,D**). Les coupes sont colorées 1 min au Violet Crésyl, rincées à l'eau distillée et recouvertes d'une lamelle dans un milieu de montage hydrophile (BioMount – Microm-France).

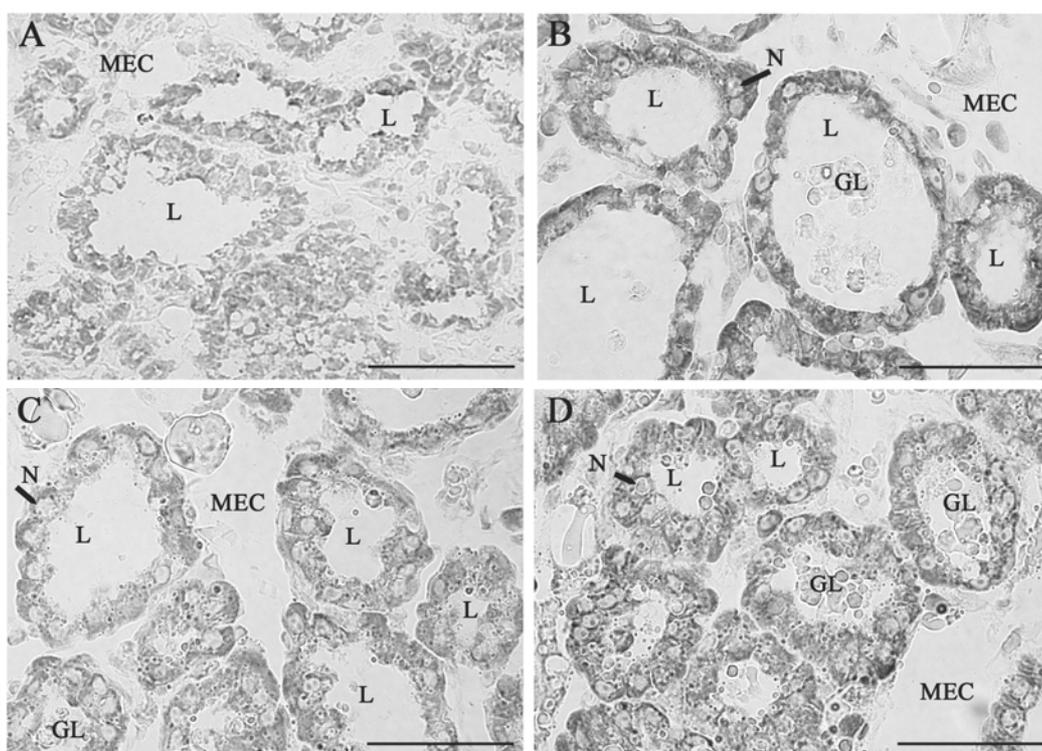
#### 1.5 Immunofluorescence

La qualité antigénique des tissus est testée par immunohistofluorescence (Péchoux et al, 2005). Nous avons testé un anticorps dirigé contre la protéine  $\alpha$ -actine musculaire lisse (ASMA : a-smooth muscle actin) diluée au 1:1000 (clone 1A4 – Sigma Aldrich). L'actine-F cellulaire est révélée par la phalloïdine couplée à la rhodamine, diluée au 1:300 (Murtagh J *et al.*, 2004). L'anticorps anti-ASMA est révélé par un anticorps secondaire couplé au FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) qui donne une fluorescence verte. Les coupes sont montées dans une solution de Vectashield – Dapi (Vector) et observées sur un microscope Leica DMRB. Les images en

lumière transmise et en fluorescence sont acquises sur une caméra CCD Olympus DC50 et traitées par le logiciel Cell (Olympus – France).

### 1.6 Microscopie électronique à transmission

Les prélèvements sont post-fixés dans un mélange de ferrocyanure de potassium 1.5% - tétraoxyde d'osmium 1%. Les tissus sont ensuite déshydratés dans des concentrations croissantes d'éthanol puis substitués par une résine époxy et finalement inclus dans la résine pure (Péchoux *et al*, 2005). Des coupes de 70 nm sont réalisées sur un ultramicrotome Leica UC6 (Leica - France) et récupérées sur des grilles de cuivre/palladium. Les coupes sont contrastées au plomb et observées avec un microscope électronique à transmission Zeiss EM902 à 80KV. Les images numériques sont acquises sur une caméra CCD MégaView III (Eloïse – France) et traitées avec le logiciel ITEM (SIS – France) de la Plate forme MIMA2 – Jouy-en-Josas.



**Figure 1 :** Coloration au violet crésyl de coupes congelées de 4  $\mu\text{m}$ . Visualisation des acini.  
L : lumière ; N : noyaux ; GL : globules lipidiques ; MEC : matrice extracellulaire. Barre : 25  $\mu\text{m}$ .

## 2. Résultats

### 2.1 Coloration histologique (figure 1)

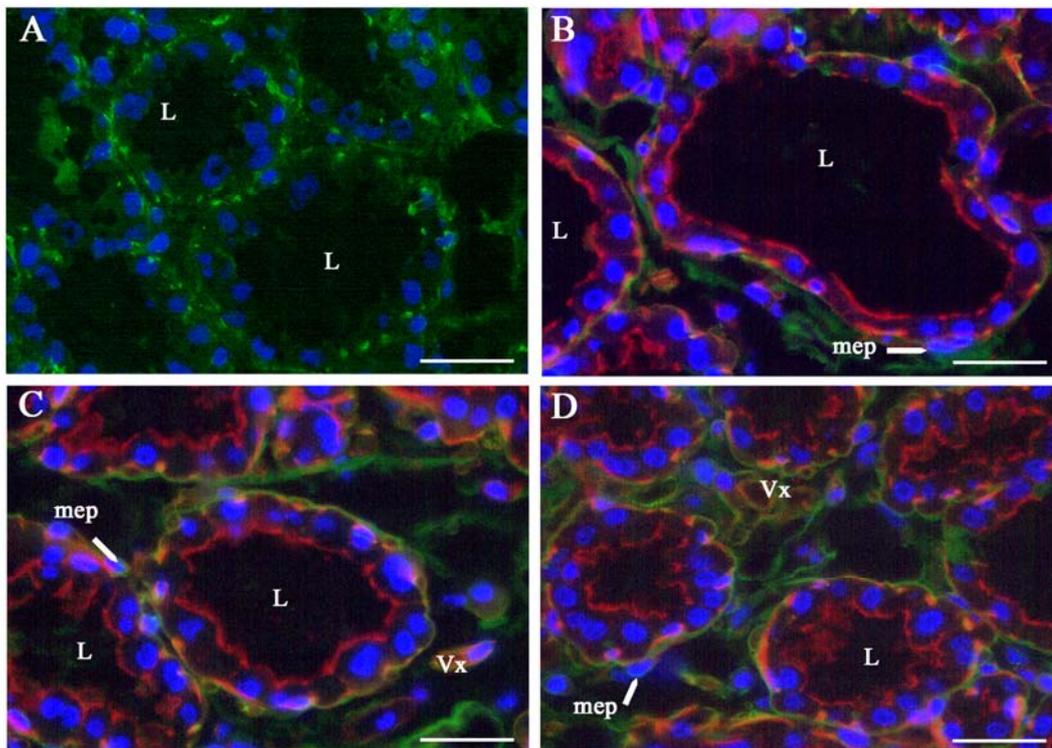
La coloration histologique révèle une différence de morphologie entre les tissus, selon les traitements. Le tissu congelé sans fixation préalable apparaît disloqué, les cellules épithéliales des acini sont moins structurées (**figure 1, A**). De même, dans l'échantillon fixé puis congelé à  $-50^{\circ}\text{C}$ , les acini présentent des lumières très élargies. Les cellules paraissent plutôt carrées, avec un noyau comprimé entre les deux pôles cellulaires. Cependant, les organites intracellulaires sont bien conservés (**figure 1, B**).

La morphologie des tissus fixés et congelés à très basse température est bien conservée. Les acini s'organisent autour d'une lumière plus réduite. Les cellules épithéliales présentent un noyau en position basale et un cytoplasme important (**figure 1, C-D**).

## 2.2 Immunofluorescence (**figure 2**)

La phalloïdine est une phallotoxine qui interagit spécifiquement avec l'actine-F cellulaire (Stürmer *et al*, 1995). L'actine F est principalement localisée dans les cellules épithéliales, au niveau du pôle apical et des jonctions cellulaires (Achler *et al*, 1989). L'image A de la **figure 2**, (congélation dans l'azote liquide) ne révèle aucune fluorescence rouge correspondant à la phalloïdine rhodamine. L'ASMA (fluorescence verte) est détectée dans les cellules myoépithéliales mammaires et les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins (Péchoux *et al.*, 1999) sous forme d'un marquage ponctiforme.

Les images B, C, D (**figure 2**) révèlent la double fluorescence. L'ASMA est mise en évidence sur le pourtour externe des acini dans les cellules myoépithéliales ainsi que dans les vaisseaux sanguins. La détection de l'actine F par la phalloïdine Rhodamine dans les tissus fixés et congelés à  $-50^{\circ}\text{C}$  (**image B**), révèle un marquage discontinu au pôle apical. Comme l'a déjà révélé la coloration histologique, les cellules sont aplaties et leur noyau occupe un volume important du cytoplasme. Au contraire, dans les tissus fixés et congelés à basse température (**images C et D**), la phalloïdine rhodamine dessine un trait presque continu au pôle apical et un fin marquage est visible au niveau des membranes baso-latérales. Les noyaux sont centrés dans des cellules hautes.

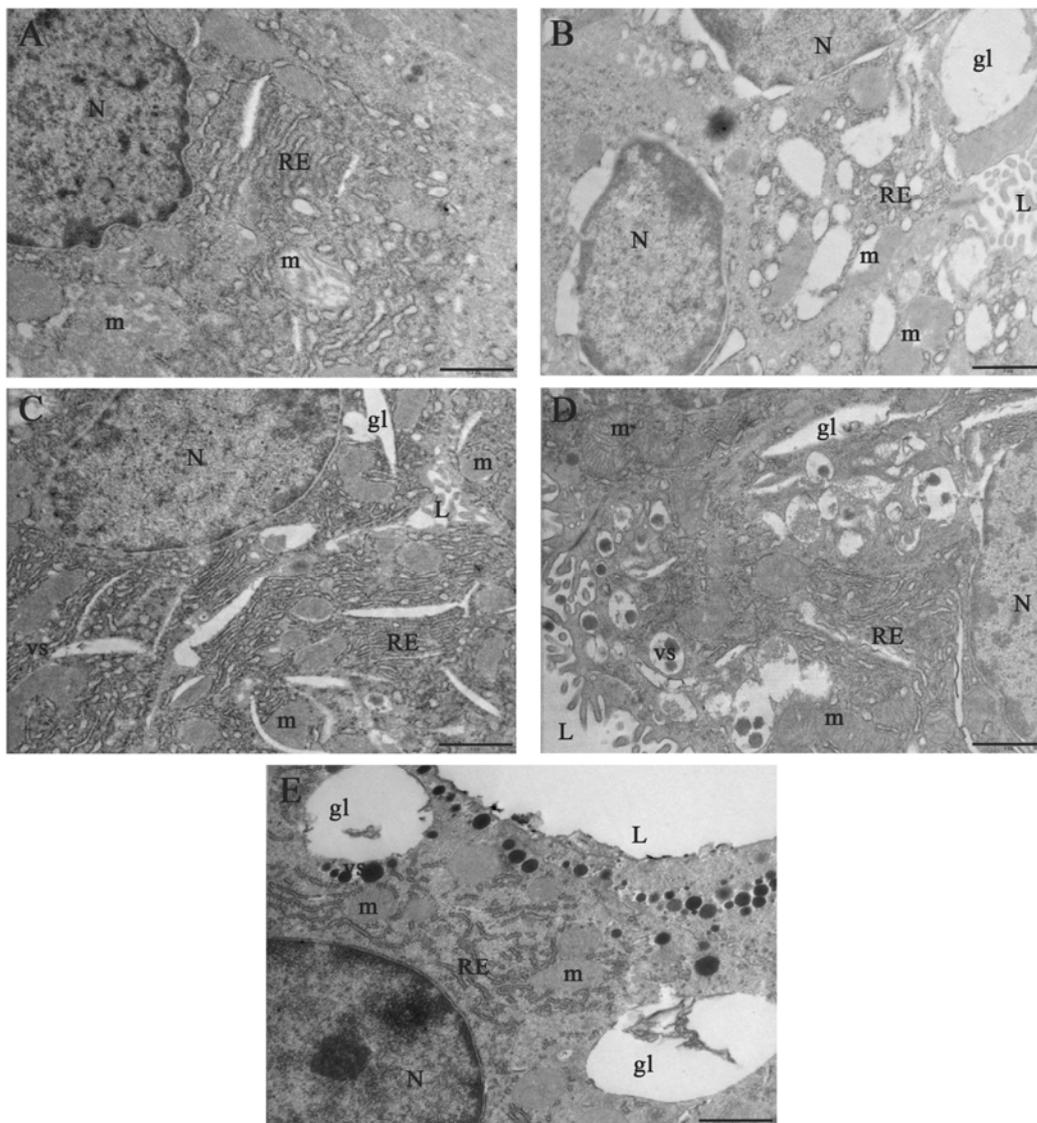


**Figure 2 :** Marquage de l'actine musculaire lisse révélée par un anticorps secondaire couplé au FICT (vert).  
 Mise en évidence de l'actine F par la Phalloïdine Rhodamine (rouge).  
 Les noyaux sont visualisés avec le DAPI (bleu).  
 L : lumière ; vx : vaisseaux sanguins ; mep : cellules myoépithéliales. Barre : 25  $\mu\text{m}$

### 2.3 Microscopie électronique à transmission (figure 3)

Les images obtenues à partir des fragments de tissus traités pour la microscopie optique sont comparées aux images obtenues à partir du tissu préparé pour la microscopie électronique (**image E**). Seuls les tissus fixés et congelés à basse température (**images C et D**) ont une morphologie bien conservée. Les différents organites intra cellulaires sont bien identifiés, le réticulum se présente sous forme de lames parallèles bien organisées. Les mitochondries sont structurées avec la matrice et des crêtes formées.

Comparativement, les cellules des tissus ayant subi une congélation lente (**images A et B**) sont altérées ; elles présentent des noyaux dentelés ou avec une membrane nucléaire décollée, le réticulum est dilaté et les mitochondries sont altérées, les crêtes sont difficilement visibles. Ces observations confirment les résultats obtenus par coloration histologique et en immunofluorescence et montrent que les tissus correctement fixés et congelés peuvent être éventuellement utilisés pour une analyse morphologique en MET.



**Figure 3 :** Visualisation des différents traitements par microscopie électronique à transmission.  
*L : lumière ; gl : gouttelettes lipidiques ; N : noyaux ; vs : vésicules de caséines ;  
RE : réticulum endoplasmique ; m : mitochondries. Barre : 1  $\mu$ m*

## Discussion et conclusion

Cette étude a pour but de montrer l'importance de la préparation des tissus, de la fixation aux modes de conservation, sur la préservation de la morphologie et de l'antigénécité des molécules. Les tissus animaux se caractérisent par une grande hétérogénéité de structure, de constituants, de proportion en eau, en lipides et en protéines. Il est donc fondamental de définir les meilleures conditions de préparation des échantillons pour obtenir une bonne préservation des tissus et cela dès les premières étapes d'un projet.

Les thématiques de notre unité ont pour modèle d'étude la glande mammaire au cours de la gestation et de la lactation. La glande mammaire est un tissu hétérogène, composé d'acini au sein d'une matrice de fibres et de protéines, richement vascularisée pendant la différenciation. Au cours de la lactation, les CEM synthétisent les constituants du lait et les déversent dans la lumière des acini qu'elles constituent : le lait est composé d'eau contenant des minéraux, des vitamines, des protéines et des lipides. De part sa constitution hétérogène, le tissu mammaire est délicat à préparer et une mauvaise préservation des composants peut influencer l'interprétation des résultats.

Nous avons testé différents protocoles de préparation de tissus pour obtenir le meilleur compromis entre la conservation des structures et l'intégrité des molécules.

Les procédures de congélation directe des tissus par l'azote liquide sans fixation préalable, ou d'une fixation chimique suivie d'une congélation à faible température (-50°C), sont peu adaptées pour le tissu mammaire différencié. En lactation, le tissu est riche en lait donc en eau et nous avons observé que la congélation dans l'azote liquide de fragments de tissus non fixés, ou la congélation à -50°C, détruisent la morphologie du tissu ainsi que certains constituants cellulaires sensibles au froid. Il est probable que ce mode de préparation induit la formation de cristaux de glace. La taille des cristaux est d'autant plus importante que la température de congélation est peu élevée et/ou la vitesse de congélation est lente (Tokuyasu, 1973). L'absence de détection de l'actine F par la phalloïdine rhodamine peut en partie s'expliquer par cette formation de cristaux d'eau et par la dépolymérisation des protéines sous l'action du froid (Galkin *et al*, 2008) les rendant ainsi indétectables.

La fixation chimique permet la création de ponts intermoléculaires entre les protéines pour les rendre insolubles. Le gel protéique dû à la concentration en protéines cellulaires de plusieurs centaines de mg/ml, se transforme en une trame réticulée qui ensuite pourra être déshydratée par un solvant et incluse dans une résine (Ayache *et al*, 2007). Dans le cas de tissus congelés, donc non déshydratés après une fixation chimique, il est important de procéder à une substitution de l'eau. Le saccharose est généralement utilisé à des molarités de 1.1M jusqu'à 1.6M pour substituer l'eau. Il permet de prévenir la formation de cristaux de glace pendant la congélation, ce qui améliore la conservation des structures et des antigènes du tissu et facilite la coupe.

Lorsque les tissus sont correctement fixés, cryo-protégés et congelés dans des conditions optimales pour la microscopie optique, les cellules et leurs composants sont bien préservés. La morphologie est bien conservée et les coupes re-incluses pour la microscopie électronique révèlent une structure fine assez comparable à celle observée sur l'échantillon traité uniquement pour la microscopie électronique. Ces résultats s'expliquent par l'application combinée d'une température de congélation basse (-196°C) qui permet une congélation plus rapide sur des tissus préalablement fixés et cryo-protégés.

En conclusion, des quatre procédures testées, les meilleurs résultats sont obtenus sur les tissus fixés, cryo-protégés et congelés rapidement à très basse température. Ce travail met bien en évidence l'importance de la préparation des tissus. La préservation structurale et moléculaire des tissus est indispensable pour une bonne interprétation des résultats (localisation d'antigène, voire même d'acides nucléiques) et la reproductibilité des expérimentations. L'observation en MET de ces procédures a bien mis en évidence les effets d'une mauvaise préparation sur les cellules et les organites intracellulaires.

**Remerciements** : Nous tenons à remercier M. Eric Chanat pour ses corrections pertinentes.

## **Bibliographie**

- Péchoix C., Boisgard R., Chanat E., Lavalie F. (2005) Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 participates in the vesicular transport of milk proteins. *BBA*, 1743, 317-329.
- Murtagh J., McArdle E., Gilligan E., Thornton L., Furlong F., Martin F. (2004) Organization of mammary epithelial cells into 3D acinar structures requires glucocorticoid and JNK signaling. *J. Cell Biol.*, 166, 133-143.
- Stürner K., Baumann O., Walz B. (1995) Actin-dependent light-induced translocation of mitochondria and ER cisternae in the photoreceptor cells of the locust *Schistocerca gregaria*. *J. Cell Sci.*, 108, 2273-2283.
- Achler C., Filmer D., Merte C., Drenckhahn D. (1989) Role of microtubules in polarized delivery of apical membrane proteins to the brush border of the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.*, 109, 179-189.
- Tokuyasu K.T. (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.*, 57, 551-565.
- Galkin V. E., Orlova A., Cherepanova O., Lebart M.C., Egelman E. H. (2008) High-resolution cryo-EM structure of F-actin-fimbrin/plastin ABD2 complex. *PNAS*, 105, 1494-1498.
- Ayache J., Beaunier L., Boumendil J., Ehret G., Laub D. (2007) Guide de Préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission (tome 1 et 2). Publications de l'Université de Saint-Etienne.