

TP 7 Histologie

Les techniques de MO et de ME sont utilisées en routine pour visualiser les structures.

Avec les conseils de Madame Julien. Anatomopathologie . 26000 Valence

Pour rendre visible ce que l'on veut observer, il est nécessaire de mettre en oeuvre des techniques diverses (préparation des échantillons) que l'on applique au matériel. Pour l'observation en MO ou en ME, les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

I Pour la MO : fixation au formol, inclusion en paraffine, colorations standard (hématoxyline-éosine ou HES ou trichrome)

- **La fixation** a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur. Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements (de quelques heures pour un petit fragment biopsique à plusieurs semaines pour un cerveau humain entier).
- **L'inclusion** a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse. Dans certains cas, on utilise d'autres milieux d'inclusion (celloïdine, résines plastiques, etc.).
- **Les coupes** du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5 μm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.



- **Les colorations** réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. Les colorations les plus fréquemment utilisées associent deux ou trois colorants différents : l'Hématoxyline-Eosine (H.E.) associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose ; les colorations trichromiques usuelles sont l'Hématéine-Eosine-Safran (H.E.S.) par ajout de safran colorant en jaune les fibres de collagène, et le trichrome de Masson qui associe un colorant nucléaire (hématoxyline), un colorant cytoplasmique et un colorant bleu ou vert colorant les fibres de collagène. De nombreuses colorations spéciales (dites signalétiques) permettent de visualiser différentes structures ou composants des tissus (par exemple, les fibres de réticuline par des colorations argentiques ou les fibres élastiques par l'orcéine).
- **Le montage.** Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au MO.

Remarque : Pour la ME : fixation à la glutaraldéhyde, post-fixation à l'acide osmique, inclusion en épon, contraste par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb

La technique dite « standard » de ME est analogue dans ses principes à celle de MO, mais les modalités précises diffèrent.

- **La fixation** se fait habituellement dans de la glutaraldéhyde tamponnée et est suivie d'une post-fixation à l'acide osmique.
- **L'inclusion** se fait dans une résine synthétique type Epon ou Araldite, après que les fragments ont été déshydratés dans les alcools et dans l'oxyde de propylène.
- **Les coupes ultrafines** des blocs sont réalisées grâce à un ultramicrotome qui permet d'obtenir des coupes ultrafines d'environ 80 nm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des grilles de cuivre. Avec le même ultramicrotome, on peut faire des coupes semi-fines, observables en MO et permettant de guider le choix des zones à étudier en ME.
- **Le contraste** des coupes s'effectue habituellement avec de l'acétate d'uranyle (contrastant les nucléoprotéines : noyau, nucléole, ribosomes) et des sels de plomb comme le citrate de plomb (contrastant les membranes).

II Technique de préparation des échantillons d'origine animale en laboratoire d'anatomopathologie.

1 Fixation

Mettre la pièce anatomique dans un bain de formol à 10% entre 24h et 48h. (il est préférable de la laisser 48h).

Il faut veiller à préparer un bain qui représente 10 fois la masse de la pièce à fixer.

Remarque : Formol à 10% en sachant que les solutions du commerce sont à 30%

Prélever un fragment de l'organe à étudier. Le positionner dans une cassette que l'on ferme et que l'on trempera dans les bains successifs. (Attention à la coupe du fragment. Il y a un sens pour l'organe).

2 Préparation avant inclusion : La déshydratation

Mettre dans des bains successifs d'alcools de concentration croissante pour déshydrater l'organe sachant que la paraffine est très hydrophobe.

Alcool	70°	85°	90°	100°
Temps	10 min	30 min	45 min	1h30

Ensuite mettre dans 3 bains successifs de **safsolvent** de concentration identique pour laver l'organe.

safsolvent	15 min	30 min	45 min
-------------------	--------	--------	--------

Mettre dans de la paraffine liquide pour laver les excès de solvant. Pour cela on utilise une étuve entre 56°C et 60 °C pour garder la paraffine liquide.

Paraffine liquide	1h	1h	1h
-------------------	----	----	-----------

Le dernier bain peut durer 1 nuit afin d'effectuer, le lendemain, la coupe avec les étudiants

3 Inclusion/ enrobage

Dans un moule métallique ou jetable préalablement placé à l'étuve à 56°C.

Mettre au fond quelques gouttes de paraffine liquide

(Les pinces doivent être chaude pour faciliter cette opération.. Utiliser le bec bunsen).

Mettre l'organe en veillant au sens pour obtenir une coupe de tous les tissus

Rajouter de la paraffine liquide

La cassette, puis de nouveau de la paraffine liquide

On place l'inclusion au congélateur (bain glacé) pour faciliter le démoulage.

4 Coupe histologique

le microtome

- reculer le porte objet au maximum
- placer le bloc dans le porte objet sans le fixer
- placer le rasoir face gravée vers l'extérieur : e fixer (face à couper dans un plan vertical, parallèle au fil du rasoir, les deux arêtes du bloc les plus longues horizontalement
- dégrossir à la main
- régler l'épaisseur des coupes (5 microns)
- mettre le cliquet
- couper

DIFFICULTES

- **Les coupes ne se font pas** vérifier le cliquet, l'inclinaison du rasoir, la fixation du porte objet
- **coupes striées** essuyer le rasoir ou le déplacer
- **coupes irrégulières** vérifier la fixation du rasoir et du porte-objet

La cire doit être assez froide, pour obtenir un ruban. =>Mettre le bloc de paraffine au congélateur si besoin ou utiliser une bombe cryolab qui refroidit la surface de la cire.

5 Fixation de la coupe sur la lame

Sur une plaque chauffante maintenant une température de 50 °C.

On place une lame sur laquelle on dépose une solution eau distillée albuminé à 1% en veillant à faire un dôme d'eau sur la lame pour éviter des bulles d'air. L'eau albuminé permet à la coupe de bien glisser sur la lame.

On peut utiliser un bac d'eau chaude.

Rajouter dans l'eau chaude du **stick on** qui permet une meilleur fixation. 10ml dans un L d'eau

On dépose alors la coupe histologique sur la lame.

On égoutte la lame , en renversant simplement l'eau sur un sopalin.

On place la lame droite pour bien faire sécher. Par exemple sur un sopalin.

Puis on place la lame dans une étuve à 56°C pendant 1 h.

Cela permettra de faciliter d'enlever le reste de paraffine et de bien permettre la fixation de la coupe sur la lame.

Les critères d'une bonne coupe histologique:

- **couper tout l'organe étudié.**
- **une épaisseur constante.**
- **pas de pli, pas de bulle**
- **pas de détérioration de la coupe**
- **Bien déposer sur l'eau chaude pour que la coupe s'étale correctement.**

6 Déparaffinage

Puis il est nécessaire d'enlever la paraffine. (en veillant à ne pas enlever la coupe de la lame)

Par passage de la lame dans 2 bains de toluène. (en veillant à la propreté du dernier bain)

safsolvent	2 min	2 min
------------	-------	-------

Passage dans de l'alcool pour réhydrater l'échantillon.

Alcool	100°	80°	50°
Temps	2 min	2 min	2 min

On place la lame dans un bain d'eau du robinet pendant quelques secondes.

On place la lame dans un bain d'eau distillée pendant quelques secondes

7 Coloration à HE

Bain à l'hématoxyline, permet de colorer les noyaux 5 min

Rinçage eau du robinet 3 min

Rinçage eau distillée passage

Bain à l'éosine, permet de colorer le cytoplasme en rose 3 minutes

Rinçage eau distillée passage

Bain dans l'alcool à 95% 1 min

Bain dans l'alcool à 100 % 1 min

Laisser tremper la lame dans le ----- jusqu'au montage. On peut laisser la lame plusieurs semaines dans le toluène.

8 Montage

On place une goutte de **safemont** sur la lame, puis on dépose la lamelle que l'on fixe soigneusement avec une pince.

Déterminer le rôle de l'intestin.

Critères de réussite d'une bonne lame.

Pas de pli sur la lame.

Pas de bulle au montage.

Bon contraste au niveau des noyaux.

Coupe complète de la pièce de l'intestin.

Epaisseur régulière dans la coupe