

Préparations tissulaires, techniques de marquage et moyens d'études morphologique en histologie

Introduction

L'histologie est une science qui étudie les tissus, l'objectif est de contourner la problématique principale : **Les tissus ne sont pas visibles à l'œil nu.**

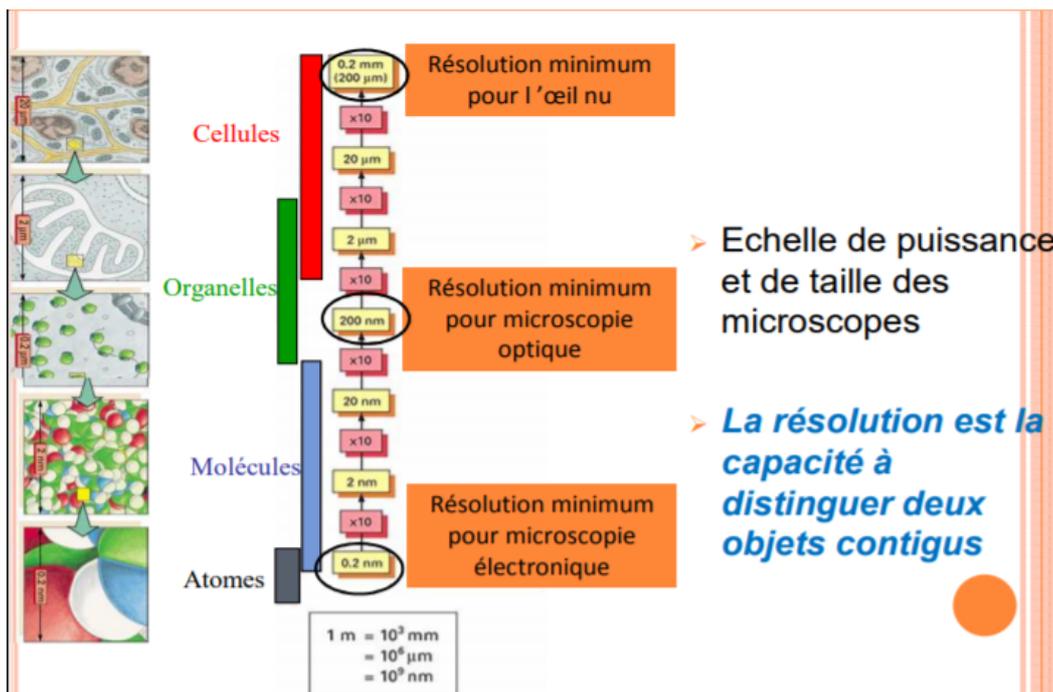
Pour cela il existe différent traitement, selon les étapes suivantes :

⇒ **Fixation ; inclusion ; coupe ; coloration ; montage**

⚠ Le but est de préserver l'intégrité du tissu, ses caractéristiques morphologiques, mais ces étapes vont tuer la cellule → **On ne peut pas faire une étude dynamique !**

Point Microscopie → Après le traitement on peut observer nos échantillons à l'aide d'un microscope qui se caractérise par sa **résolution spatiale** (Capacité de distinguer 2 points très proches sans perturbation)

Le microscope doit être sensible et l'image contrastée



Il existe différentes résolutions à connaître (et qui tomberont au tutorat 😊)

Microscope optique → **0,2µm**

Microscope électronique → **0,2 nm**

Œil nu → **0,2mm**

Du prélèvement au conditionnement de l'échantillon :

L'échantillon : Il peut être de différents types, soit des tissus humains ou animaux soit des cellules.

- 1) **La macroscopie :** Description de l'échantillon **frais** (n'ayant subi aucun traitement) et **non fixés** à l'œil nu. On définit le poids, la taille, la consistance, la couleur...
- 2) **L'échantillonnage :** Consiste à prélever des fragments de tissu aux endroits stratégiques et à les placer sur une cassette d'inclusion.
- 3) **Le conditionnement :** il a **plusieurs objectifs** :
 - **La conservation de l'échantillon** → Les figer dans l'état dans lequel on les a reçus
 - **La préservation de la morphologie cellulaire et tissulaire**
 - **La rigidification du tissu pour faciliter les coupes**
 - **La réalisation des techniques d'histologie**

Il est important que le conditionnement soit rapide et pour cela il existe deux moyens principaux selon l'étude qu'on doit mener :

- ⇒ **La congélation**
- ⇒ **La fixation**

La congélation : Dans 3 cas précis

- **Examen extemporané :** « en temps réel », pour un diagnostic rapide. Différentes étapes :
 - 1) Echantillonnage
 - 2) Placement de l'échantillon sur un plot avec un gel à base d'eau
 - 3) Congélation rapide à -30 C°
 - 4) Coupe fine rapide avec cryomicrotome
 - 5) Coloration bleu de Toluidine
 - 6) Analyse grossière → Architecture du tissu
- **Cryoconservation dans l'azote liquide** à -196 C° très rapide donc les cellules vont être figées dans leur état d'origine. Conservation de l'échantillon dans une banque de tumeur à -80 C°
- **Coloration spéciale**

La fixation :

Le volume de fixateur doit être **10 fois supérieur** au volume de l'échantillon. La durée de fixation comme le volume de fixateur dépendra du **volume** de l'échantillon.

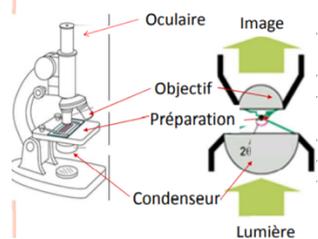
Pour le MO : On fixe au **formol** 10% (aussi pour immunohistochimie et analyse moléculaire)

Pour le ME : On fixe au **glutaraldéhyde**

Les moyens d'études microscopique et le traitement des échantillons

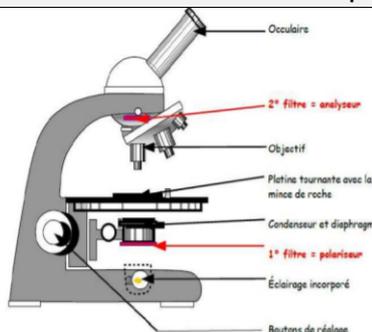
- Microscope le plus utilisé
- Système de **3** lentilles qui vont condenser la lumière blanche et agrandir l'image. Transillumination = Quand la lumière blanche traverse l'échantillon.
- La résolution minimum est de **200 nm**.

Microscope photonique à fond clair



La source lumineuse va être condensée sur le condenseur puis va traverser l'échantillon non visible à l'œil nu, va traverser l'objectif (grandissement x10) et on va ensuite pouvoir visualiser l'image à travers l'oculaire (grandissement x10)

Microscope photonique à fond clair équipé d'un **filtre polarisant**



1 er filtre : Avant le **condenseur**, entre lumière et échantillon, **Polariseur**

2 ème filtre : Avant les **oculaires**, **Analyseur**

→ Permet de mettre en évidence les propriétés **biréfringentes** de la cellule, c'est-à-dire la capacité de la structure à dédoubler un rayon lumineux (grâce au 1er filtre c'ad le polariseur)

→ En traversant le filtre, la lumière ne vibre que sur **une seule** longueur d'onde, dans un **seul plan** de polarisation

Le microscope électronique :

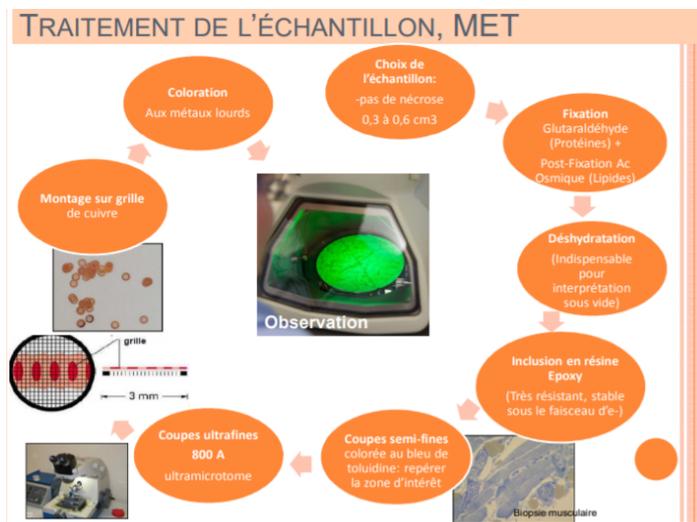
- Il a une **meilleure résolution (0,2 nm)** que la microscopie optique et permet d'observer des organismes intracellulaires.
- C'est une technique qui utilise des **électrons** dont le pouvoir de pénétration des tissus est bien **inférieur** aux photons.

La préparation des échantillons est donc différente de la microscopie électronique.
→ Il y a **2 types** de ME : à **transmission** et à **balayage**

A noter que l'échantillon subit les mêmes étapes que pour la MO sauf pour la **fixation, la coupe et la coloration**

La préparation des échantillons :

- **Fixation** → Elle se fait au **glutaraldéhyde** qui fixe les protéines. On peut rajouter une post fixation à l'acide osmique qui fixe les lipides.
- **Déshydratation** → Elle est nécessaire à l'**observation sous vide** +++ . L'échantillon est rapidement refroidi à basse température et l'eau est remplacée par des dérivés d'alcool
- **Enrobage dans une résine** → L'échantillon est enrobé dans une résine en **époxy** (et pas dans de la paraffine comme pour la MO). Cette résine est dure et stable face au réseau d'électron et elle est insoluble dans l'eau.
- **Coupe ultra-fine** → Réalisée avec un ultramicrotome (lame de verre ou de diamant) et peut être précédée d'une coupe semi-fine.
- **Montage sur grille** pour nous orienter dans le tissu
- **Coloration** → Grâce à des métaux lourds qui renforcent les contrastes. On va avoir un dégradé en noir et blanc mais pas de couleur.



→ Les métaux lourds **ne laissent pas passer** les électrons ce qui augmente les contrastes.

→ La microscopie électronique va permettre une très bonne visualisation des contours des cellules et des organites. Plus une structure cellulaire est **dense** aux électrons, plus elle est **foncée** car elle ne laisse pas passer les électrons.

Toutes les structures cellulaires vont être plus ou moins perméables aux électrons. → Les principaux métaux lourds sont le **plomb** qui colore les **membranes** et l'**acétate d'uranyle** qui va colorer les **nucléoprotéines**.

Coupe semi-fine : Cette étape se fait **avant** la coupe ultra-fine et permet de s'orienter sur l'endroit qu'on veut étudier. On fait une coloration grossière **au bleu de toluidine**.

La ME permet une bonne visualisation des contours de la cellule et des organites : les caractéristiques ultra structurales d'une cellule

La ME comporte des techniques spéciales de colorations (Plus pour faire jolie qu'autres chose)

- Marquage à l'or
- L'ombrage
- La cryomicroscopie

La ME à balayage

À la différence de la transmission ici il n'y a qu'un faisceau d'électron qui excite la surface à observer, produisant des électrons secondaires.

L'échantillon est **soit fixé aux métaux lourds soit vivant** (Alors je n'ai jamais compris comment, mais si ça tombe c'est vrai)

La résolution est **plus faible** qu'en MET.

Le traitement de l'échantillon

Après la fixation, différentes étapes sont **nécessaires** afin de préparer notre échantillon à l'observation.

L'étape d'inclusion : L'échantillon va être enrobé de paraffine pour faciliter la coupe

⚠ Cette étapes est précédé par une déshydratation et un enrobage ⚠

A noter que la paraffine est chauffée à **58°** maximum pour ne pas altérer l'échantillon

L'inclusion a **deux** objectifs : **Réaliser des coupes tissulaire**
Archivages des tissus à 25°

Réalisation des coupes/microtomie :

Le bloc refroidi est placé sur la tête du microtome et coupé avec un rasoir pour obtenir un ruban de paraffine ou une coupe sériée (2 à 5 microns). Les coupes sont posées sur une lame de verre, dépliées et séchées

→ **On obtient la lame blanche non colorée**

Après avoir choisi la coloration (détaillé juste après) on passe au montage pour pouvoir observer notre échantillon au microscope.

COLORATIONS

Les colorants accentuent les contrastes et permettront de reconnaître les différents tissus.

Il existe **deux types** de colorations :

→ **Les colorations standards = topographiques = de routine**

→ **Les colorations spéciales qui permettent de mettre en évidence une composante spécifique du tissu**

⚠ Avant cette étape il faut déparaffiner, réhydrater pour ensuite colorer ⚠

Le colorant est une solution aqueuse composée de **2 groupements** :

- Chromophore (couleur)

- Auxophore (ionisé)

Les colorants ne sont pas spécifiques d'un type de molécule mais plutôt d'un type de charge (**à noter que la fixation d'un colorant est permanente**)

⚠ Les colorants basiques vont avoir une affinité à colorer les composants tissulaires acides et inversement pour les colorants acides ⚠

La coloration standard : Hématoxyline/Éosine (HE)

Hématoxyline => colorant **basique**, affinité pour les **acides nucléiques** donc colore les **noyaux en violet**

Eosine => colorant **acide**, affinité pour les composants **basiques** des cellules ; **les protéines** donc **colore le cytoplasme en rose**

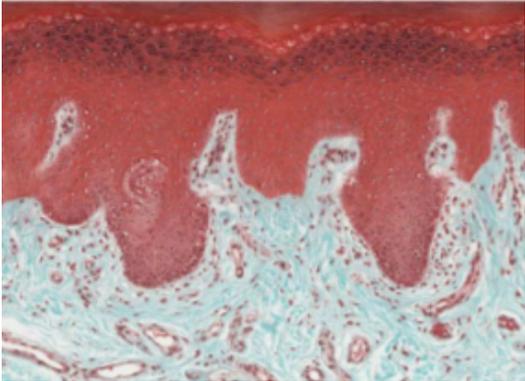
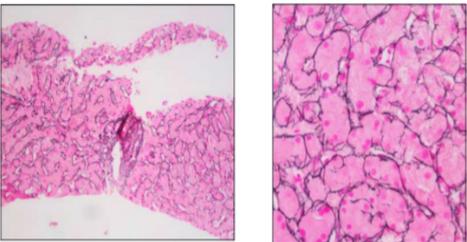
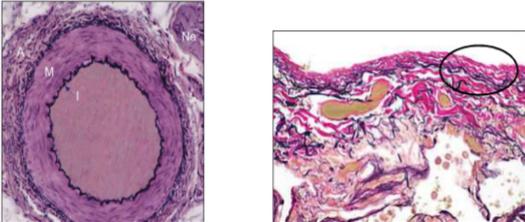
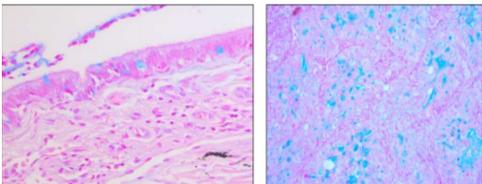
En plus de HE, il est possible de rajouter du **safran** qui est **une grosse molécule** restant bloquer dans les structures denses et colorant le **collagène en orange**

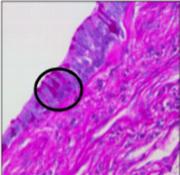
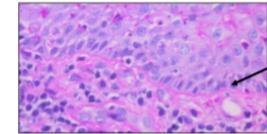
⚠ On commence toujours par une coloration standard avant de passer aux colorations spécifiques ⚠

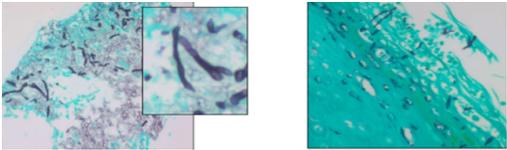
La coloration spécifique :

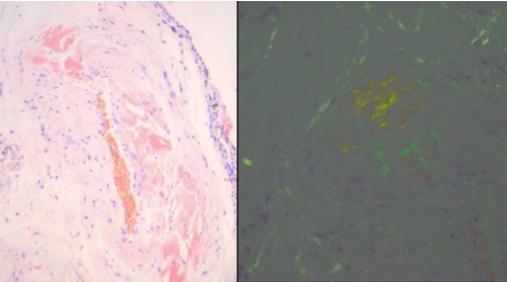
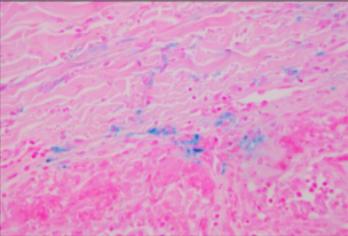
Elles sont utilisées pour affiner l'analyse morphologique en mettant en évidence les composants de certains tissus :

- **Matrice extra cellulaire** : élastine, collagène
- **Secrétions intracellulaire** : Mucus, pigment, glycogène
- **Des dépôts/surcharge** : Fer, amylose
- **Des agents infectieux** : Bactéries ou champignons (Attention les colorants ne suffisent pas pour typer précisément les agents infectieux)

Colorations des fibres du tissu conjonctif	
Le trichrome de Masson	
	<p>Met en évidence le collagène 1</p> <p>Cette coloration donne une couleur bleue clair/verte pour le collagène 1 L'épithélium est en rouge et les noyaux en noir</p> <p>Utilisation en pathologie pour observer des cirrhoses de foie, des fibroses rénales ou infarctus du myocarde</p>
Gordon-sweet	
	<p>Met en évidence les fibres de réticulines</p> <p>Réticuline fait penser à réglisse, gordon sweet fait penser à un bonbon</p>
Verhoeff	
	<p>Met en évidence les fibres élastique notamment dans les coupes vasculaire</p> <p>Imaginez un élastique vert</p>
Coloration des mucines	
Bleu alcian	
	<p>Met en évidence le mucus en bleu ciel</p>
Périodique Acid schiff	

	<p>Filament mycélien ma</p> 	<p>Met en évidence le mucus, les glycoprotéines et certains champignons</p>
---	---	--

Coloration des micro-organismes	
<p data-bbox="347 421 472 450">Le Zielh</p> 	<p>Met en évidence le BAAR (Bacilles acido alcool résistants) spécifique de la tuberculose</p>
<p data-bbox="288 719 533 748">Gomori-Grocott</p> 	<p>Met en évidence les infections fongiques</p>

Colorations des surcharges	
<p data-bbox="288 1043 533 1072">Le rouge congo</p> 	<p>Met en évidence les dépôts d'amyloïde La molécule d'amylose est biréfringente</p> <ul style="list-style-type: none"> - MO à fond clair : rouge - MO lumière polarisée : vert/jaune
<p data-bbox="347 1375 472 1404">Le perls</p> 	<p>Met en évidence les dépôts ferriques</p> <p>MO standard : certaines cellules sont pigmentées ; ce sont des pigments endogènes provenant de la dégradation par exemple de nos hématies</p>

L'immunohistochimie

Cette méthode consiste à détecter une protéine **DIRECTEMENT** sur la coupe tissulaire, elle repose sur la réaction d'un antigène sur un anticorps à la surface d'un tissu.

La réaction antigène anticorps a pour but de détecter des Ag précis grâce en premier lieu à des anticorps primaires spécifiques de l'Ag à détecter.

Néanmoins l'AC primaire n'est pas visible à l'œil nu. Pour permettre son observation on utilise un AC secondaire non spécifique de l'Ag mais spécifique de l'AC primaire, **il exprime une couleur lors de la liaison AC primaire/ AC secondaire**

Il faut savoir qu'il existe plusieurs types d'anticorps :

Ac	Monoclonaux	Polyclonaux
Production	Par culture cellulaire = criblage d'hybridome	Par immunisation d'un animal
Avantage	Plus spécifique de l'antigène , donc moins de bruit de fond	Facilité de production, Peu coûteux/ Très bonne avidité → Plusieurs épitopes sont reconnus
Inconvénient	Technique longue, complexe et couteuse , Manque d'avidité, si les antigènes sont altérés, il y a un risque de non reconnaissance, Technique moins sensible	L'anticorps se fixe facilement donc il va y avoir un bruit de fond important

L'immunohistochimie à un rôle dans le diagnostic :

- **Détermine la nature d'un tissu**
- **Détermine l'origine d'un organe**
- **Orienté si la lésion est bénigne** (Le oriente est important, ce n'est pas prouvé)
- **Prédire la réponse d'un traitement** (Anticorps théranostique)

En conclusion

L'observation et l'interprétation en histologie dépend de différentes étapes qui sont indispensables et qui garantissent la qualité des étapes analytiques

- **La préparation tissulaire**
- **L'inclusion**
- **La coupe**

C'est la fin de cette première fiche d'histologie et la première fiche de ma vie de tuteur, j'espère qu'elle vous plaira, n'hésitez pas à me donner vos avis (positifs j'espère 😊) que ce soit sur le forum ou sur messenger.

Passons enfin au dédicace, la première de cette année ira à ma marraine (#Marianne), merci encore même si tu liras sans doute jamais cette fiche.

La deuxième à mes co tuts, j'aurai pas pu rêver mieux <3

A mes fillots, Alexis, Enzo, Marie, Emilie et Rose et à ma co marraine du feu

A Tristan baillon qui se trouve à côté de moi, très content de t'avoir comme chef tut 😊

A la team co learning et à Diegz

Et enfin à toi petit P1, j'étais à ta place l'an dernier et bientôt si tu t'en donnes les moyens tu seras peut être à la mienne.

DEDICACE A LEO LE BO GOSSE