

# 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.**

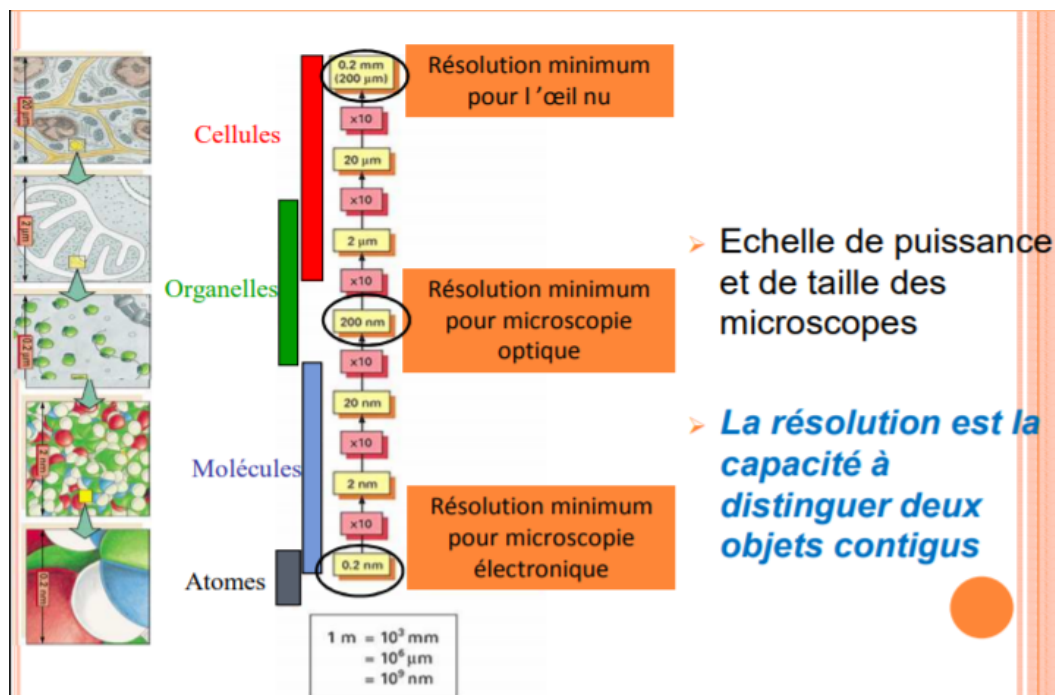
Pour cela il existe différent traitement, selon les étapes suivantes :

⇒ **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 → **0,2 µm**

Microscope électronique → **0,2 nm**

Œil nu → **0,2 mm**

## Du prélèvement au conditionnement du 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.

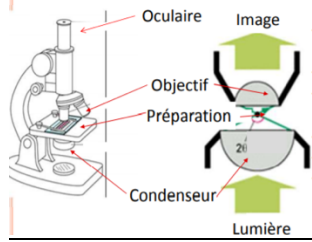
**Pour le MO :** On fixe au **formol** 10% (aussi pour immunohistochimie et analyse moléculaire)

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

## Les moyens d'études microscopique et le traitement des échantillons

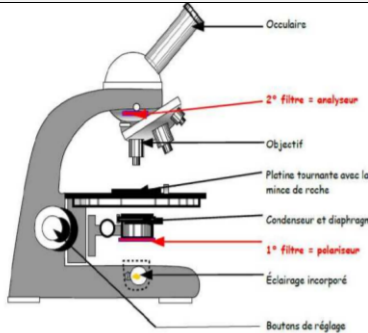
- Microscope le plus utilisé
- Système de **3** lentilles qui vont condenser la lumière blanche et agrandir l'image.  
Transillumination = Quand la lumière blanche traverse l'échantillon.
- La résolution minimum est de **200 nm**.

## 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'est 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.

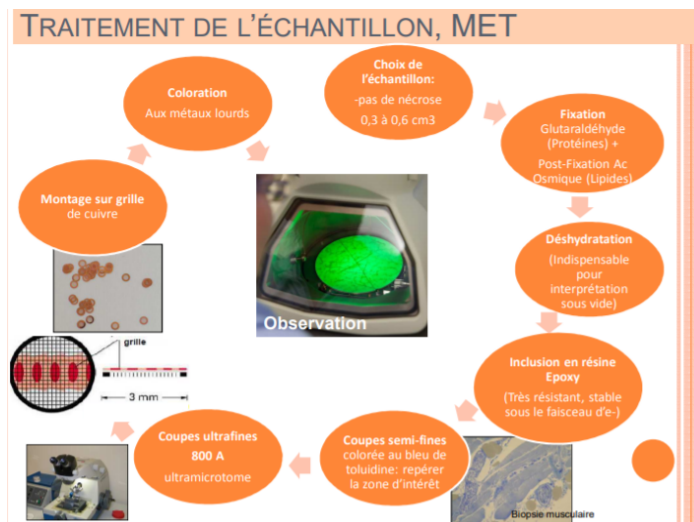
La préparation des échantillons est donc différente de la microscopie électronique.

→ 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 composé 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**

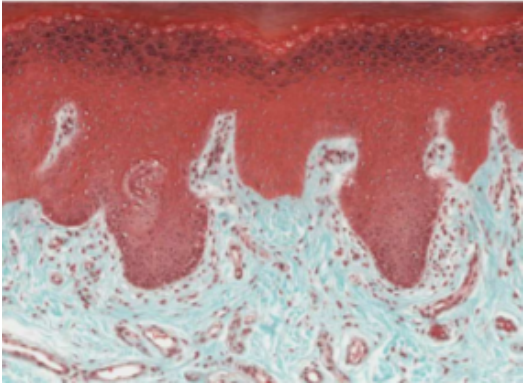
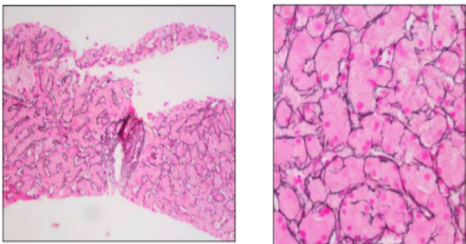
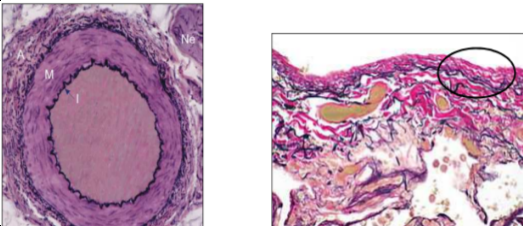
En plus de HE, il est possible de rajouter du **safran** qui est **une grosse molécule** restant bloquer dans les structures denses et colorant le **collagène en orange**

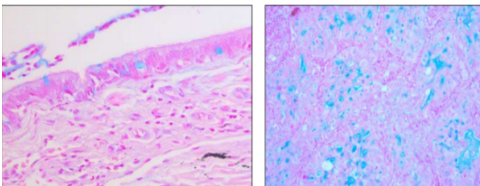
**⚠ On commence toujours par une coloration standard avant de passer aux colorations spécifiques ⚠**

## La coloration spécifique :

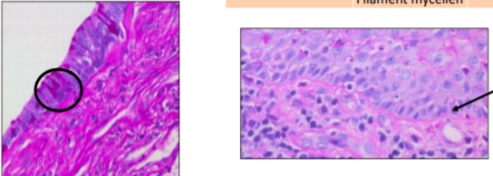
Elles sont utilisées pour affiner l'analyse morphologique en mettant en évidence les composants de certains tissus :


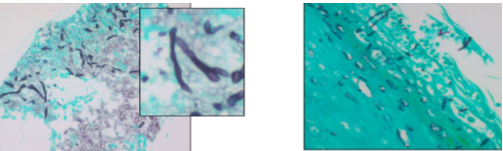
- **Matrice extra cellulaire** : élastine, collagène
- **Sécrétions intracellulaire** : Mucus, pigment, glycogène
- **Des dépôts/surcharge** : Fer, amylose
- **Des agents infectieux** : Bactéries ou champignons (Attention les colorants ne suffisent pas pour typer précisément les agents infectieux)

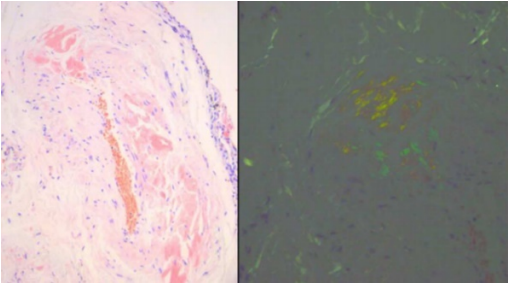
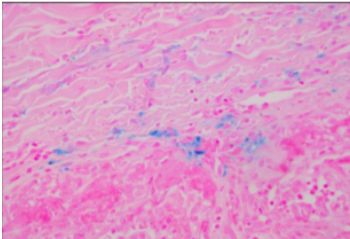
Colorations des fibres du tissu conjonctif	
<b>Le trichrome de Masson</b> 	<p>Met en évidence le <b>collagène 1</b></p> <p>Cette coloration donne une couleur <b>bleue clair/verte</b> pour le <b>collagène 1</b>  <b>L'épithélium est en rouge et les noyaux en noir</b></p> <p>Utilisation en pathologie pour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

Coloration des mucines	
<b>Bleu alcian</b> 	<p>Met en évidence le mucus en <b>bleu ciel</b></p>
<b>Périodique Acid schiff</b>	



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

Coloration des micro-organismes	
<p><b>Le Ziehl</b></p> 	<p>Met en évidence le <b>BAAR</b> (Bacilles acido-alcoolo-résistants) spécifique de la <b>tuberculose</b></p>
<p><b>Gomori-Grocott</b></p> 	<p>Met en évidence <b>les infections fongiques</b></p>

Colorations des surcharges	
<p><b>Le rouge congo</b></p> 	<p>Met en évidence les <b>dépôts d'amyloïde</b>          La molécule d'amylose est <b>biréfringente</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>MO à fond clair</b> : rouge</li> <li>- <b>MO lumière polarisée</b> : vert/jaune</li> </ul>
<p><b>Le perls</b></p> 	<p>Met en évidence les <b>dépôts ferriques</b></p> <p><b>MO standard</b> : 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 = <b>criblage d'hybridome</b>	Par <b>immunisation</b> d'un animal
Avantage	<b>Plus spécifique de l'antigène</b> , donc moins de bruit de fond	Facilité de production, Peu coûteux/ <b>Très bonne avidité</b> → Plusieurs épitopes sont reconnus
Inconvénient	<b>Technique longue, complexe et coûteuse</b> , Manque d'avidité, si les antigènes sont altérés, il y a un risque de non reconnaissance, <b>Technique moins sensible</b>	L'anticorps se fixe facilement donc il va y avoir <b>un bruit de fond important</b>

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