

Méthodes classiques de préparation histologique

« Et comment étudient-ont les tissus ? Vous avez déjà compris l'importance des outils de visualisation comme le microscope pour étudier les tissus. Mais avant de réfléchir plus précisément à la taille des éléments étudiés en histologie, regardons et étudions une vidéo. » La vidéo en question :

https://www.youtube.com/watch?v=TvmaG_b89dU&ab_channel=DoYouKnow

« Regardez la vidéo, elle ne dure que 10 minutes et permet de bien comprendre et visualiser chacune des étapes »

I) Le prélèvement

La première étape du processus est le **prélèvement**, qui consiste à obtenir un échantillon de tissus

En clinique, un fragment d'organe est prélevé lors d'une **endoscopie** (*biopsie*) ou lors d'une **intervention chirurgicale** (*pièce opératoire*)

Des échantillons de tissus peuvent aussi être prélevés sur des cadavres lors d'**autopsies**.

Dans le laboratoire, les prélèvements reçus sont **analysés macroscopiquement** et si nécessaire ils sont recoupés pour obtenir des pièces de petite taille, d'environ **1 à 2 cm²**, qui sont alors déposées dans des **cassettes d'inclusion** en plastique servant de contenant pour la suite de la manipulation.

II) La fixation

Afin de préserver l'échantillon dans un état proche du vivant, ils sont fixés tout de suite après le prélèvement, à l'aide d'une substance chimique : **le fixateur**.

Généralement il s'agit de **formol** (pour le **MO**) ou de **paraformaldéhyde** (pour le **ME**) à des concentrations déterminées, mais d'autres types de fixateurs peuvent aussi être utilisés, cela dépend principalement du type d'examen à effectuer par la suite sur le tissu, mais aussi du temps disponible pour la fixation. En effet la durée de la fixation varie selon la taille du prélèvement. A titre d'exemple, la vitesse de pénétration du formol dans le tissu est de 1mm/heure.

Les intérêts de la fixation sont multiples :

- **immobilisation** des constituants tissulaires et cellulaires
- **prévention** de l'autolyse cellulaire
- **prévention** de la putréfaction bactérienne post-mortem.

III) L'inclusion

Pour observer les tissus au microscope, il faut réaliser de fines tranches régulières dans le prélèvement. Pour y parvenir celui-ci doit avoir une consistance solide, c'est pourquoi il est inclus dans la paraffine . C'est ce qu'on appelle la phase d'inclusion qui est généralement réalisée dans un automate .

La paraffine étant hydrophobe , les tissus doivent être préalablement déshydratés par des passages successifs dans des bains d'alcool de concentration croissante , puis dans un solvant dans lequel la paraffine est miscible, par exemple le xylène ou le toluène. A ce stade le prélèvement devient transparent : c'est la clarification .

A la fin de l'étape d'inclusion, les prélèvements sont plongés dans des bains de paraffine liquide qui occupera tous les espaces vides dans les tissus.

A la sortie de l'automate, le prélèvement est sorti de sa cassette d'inclusion et déposé dans un moule qui peut être rempli de paraffine . C'est la phase d'enrobage : en refroidissant la paraffine durcira ce qui formera un bloc dans lequel l'échantillon de tissu est inclus et qui pourra être coupé en fines tranches que l'on appelle des coupes .

Parfois un examen très rapide des tissus est nécessaire , par exemple pour un examen extemporané (pour guider le chirurgien en phase d'opération). Dans ce cas le prélèvement est fixé puis congelé et inclus dans un mélange hydrosoluble de glycol et de résine pour réaliser les coupes. Cette technique permet d'écourter le processus en évitant les étapes d'inclusion et d'enrobage en paraffine.

IV) La coupe

Si le prélèvement a été inclus dans la paraffine , le bloc est alors coupé à l'aide d'un microtome .

Si le prélèvement a été congelé , les coupes sont réalisées dans une enceinte réfrigérée à l'aide d'une machine appelée cryostat .

Le microtome et le cryostat sont des appareils équipés d'une lame aiguisée qui permettent d'obtenir des coupes de tissus fines de 2 à 5 micromètres d'épaisseur.

Au-delà de 5 micromètres, il est difficile d'observer correctement le prélèvement au microscope car les couches de tissus se superposent.

Les fines coupes réalisées sont ensuite déposées sur des lames de verre , puis séchées afin d'adhérer parfaitement à la lame.

Dans l'automate, les coupes seront déparaffinées et réhydratées par passages successifs dans des bains d'alcool de moins en moins concentrés et enfin par passage dans un bain d'eau pour pouvoir être colorées.

V) Coloration

Puisque les tissus de l'organisme ne sont pas spontanément colorés, ils seront naturellement mal visibles. C'est pourquoi, en histologie, on utilise des **colorants** qui permettent leur observation au microscope.

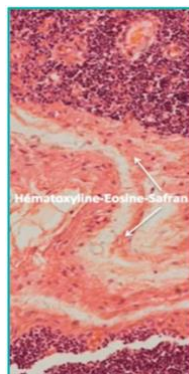
La plupart sont des composants acides ou basiques en milieu aqueux, qui interagissent avec les radicaux ionisés des tissus.

Un colorant est composé :

- D'un groupement **chromophore** qui apporte la couleur
- D'un groupement **auxophore** qui est ionisé et va se fixer de façon permanente sur les groupements acide ou basique des constituants cellulaires

1) Les colorations classiques

Hématoxyline Éosine (HE)	<p>La plus couramment utilisé</p> <p>Technique de contraste fondamentale pour tout examen microscopique histologique conventionnel.</p>	<p>Hématoxyline est un colorant basique :</p> <p>Se fixe aux acides nucléiques colorant les <u>noyaux cellulaires</u> et le <u>RER</u> en violet</p> <p>Éosine est un colorant acide : Se fixe aux protéines colorant le <u>cytoplasme</u> et les fibres en rose</p>
Hématoxyline Éosine Safran (HES)	Autre coloration fréquente	<p>Le safran : se fixe aux <u>fibres de collagènes</u> de la MEC et permet de les mettre en évidence en jaune</p>
Trichrome de Masson	Classiquement utilisée en laboratoire, surtout pour identifier les pathologies musculaires, cardiaques, hépatiques et rénales	<p>Cytoplasme des <u>fibres musculaire</u> en rouge</p> <p><u>Fibre de collagène</u> en vert</p>



Il existe évidemment bien d'autres possibilités de coloration des tissus.

2) Les colorations spécifiques

Bleu alcian Rouge mucicarmin	Mucus de certains tissus en colorant les mucopolysaccharides acides En bleu ou rouge
Acide périodique de schiff (PAS)	Glucide, glycogène, mucines, lame basale des épithéliums (riche en glycoprotéines) En rouge pourpre
Orcéine	Fibres élastiques (tissus conjonctifs)
Imprégnation à l'argent	Collagène de type III (fibres réticulées)
Fixation à l'acide osmique	Conserver et visualiser les lipides des tissus biologiques

3) Techniques d'immuno-histochimie

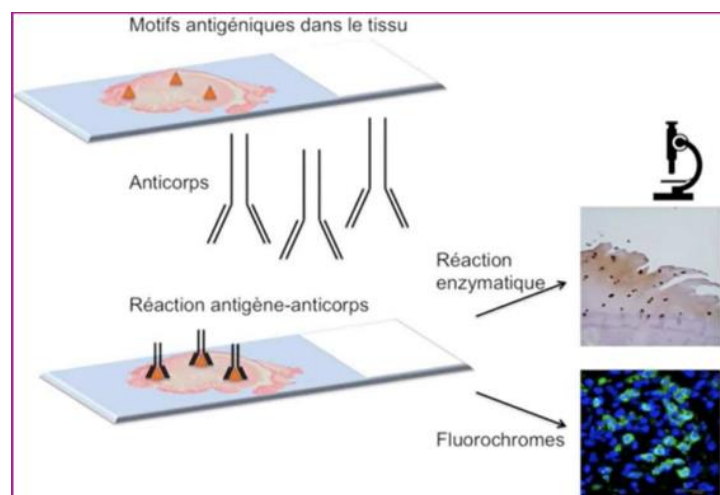
L'immuno-histochimie est utilisée pour mettre en évidence des motifs antigéniques présents dans les tissus.

Ces techniques sont couramment utilisées dans le domaine de la **recherche** et dans les laboratoires de **diagnostic**.

Elles consistent à utiliser des anticorps spécifiques de molécules d'intérêt afin d'évaluer leur présence et leur répartition dans un tissu.

La **réaction antigène** (élément recherché) **anticorps** (élément qui cherche) est visualisée soit par une réaction enzymatique, soit à l'aide de substances chimiques appelées **fluorochrome**.

Pour réaliser ces techniques, on passe aussi par la **congélation** qui offre une meilleure conservation des sites antigéniques dans les tissus que la paraffine (la chaleur les détruit).



VI) Montage

La dernière étape de la préparation des lames histologiques est le **montage**.

Le tissu coloré est à protéger par une résine et une lamelle de verre couvre-objet, ou par un film plastique.

Ainsi, la lame est conservée et peut être observée au microscope sans abimer le tissu.

Pour observer ces lames histologiques, on peut utiliser un microscope optique ou électronique, mais de plus en plus fréquemment dans la pratique médicale, dans la recherche ou dans l'enseignement par exemple, ces lames sont digitalisées pour être regardées sur ordinateur.

VII) Processus de digitalisation

La **digitalisation** c'est l'obtention d'une image numérique à partir d'une lame histologique, grâce à un scanner doté d'un microscope et d'une caméra digitale.

Le processus d'acquisition de l'image débute par le choix à faible grossissement de la partie de la lame à numériser et par le réglage de paramètres comme la netteté.

La numérisation permet d'avoir des milliers d'images d'une seule coupe histologique fournies par l'objectif du microscope réglé à l'agrandissement maximum avec un enregistrement sériel.

Elles sont ensuite regroupées pour reconstruire la totalité de l'échantillon.

L'observation des lames numérisées se fait sur l'écran d'un ordinateur à l'aide d'un **logiciel de visualisation** qui reproduit les fonctions d'un microscope en permettant de naviguer sur la lame à différents grossissements.

La numérisation possède de **nombreux avantages** comme la possibilité de **consultation à distance** et à tout moment ou **d'accès partagé** entre de nombreuses personnes du fichier ou bien la **capacité à pointer certaines structures** d'intérêts et les mettre comme référence sur l'image, ainsi que **d'incorporer des commentaires** sur l'image.