

# METHODES CLASSIQUES DE PREPARATION HISTOLOGIQUE

## SOMMAIRE

Coucouu, j'espère que vous êtes prêts pour ce cours qui vous servira dans n'importe quelle filière où vous irez !! Cette fiche est dans la continuité de celle d'intro à l'histologie. Je vous mets encore des questions au fil du cours pour rester actifs!! Bon courage

« Et comment étudie-t-on 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](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 »

Nous allons les voir ensemble, c'est parti mais avant tout:



1) Quel est l'objectif principal de la préparation histologique ?



## 1. Le prélèvement

### Echantillon

La **première étape** du processus est le **prélèvement**, qui consiste à obtenir un **échantillon** de tissus en le coupant **hors** d'un **organe**, ou même de prélever un **organe entier**.

En clinique, un fragment d'organe est prélevé lors d'une **endoscopie** ou lors d'une **intervention chirurgicale**. On parle respectivement de **biopsie** ou de **pièce opératoire**.



2) Dans quel contexte clinique réalise-t-on une biopsie ?

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 cm<sup>2</sup>**, qui sont alors déposées dans des **cassettes d'inclusion** en plastique servant de contenant pour la suite des manipulations.

L'orientation du prélèvement est cruciale (épithélium, muscle, tube digestif...).

## II. La fixation

### Conservation

Afin de conserver les tissus prélevés dans un état proche du vivant, ils sont fixés tout de suite après le prélèvement, à l'aide d'une **substance chimique** que l'on appelle le **fixateur**.



3) Quel est le rôle n°1 de la fixation ?

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 1 mm/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



4) Le formol pénètre plus vite quand le prélèvement est épais ?

### Enrobage

Pour pouvoir 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 occupe 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 tissus est inclus et qui pourra être coupé en fines tranches que l'on appelle des **coupes**.



### 5) Pourquoi la paraffine nécessite-t-elle une déshydratation préalable ?

Parfois un **examen très rapide des tissus est nécessaire**, par exemple pour un examen **extemporané** (afin de guider le chirurgien pendant l'intervention). 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**.

inclusion → infiltration par la paraffine  
enrobage → formation du bloc

## IV. La coupe

### Section

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. La coloration



### b) Quelle est l'épaisseur optimale d'une coupe histologique ?

### Imprégnation colorée

Puisque les tissus de l'organisme ne sont pas **spontanément colorés**, ils seront naturellement **mal visibles**. C'est pourquoi on utilise en histologie 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 acides ou basiques** des constituants cellulaires



La coloration la **plus couramment utilisée** est l'**Hématoxyline-Eosine (HE)**.

Cette coloration est la technique de contraste fondamentale pour tout examen microscopique histologique conventionnel.

L'**Hématoxyline** est un colorant **basique** qui se fixe aux **acides nucléiques** et colore ainsi les **noyaux cellulaires** et le **réticulum endoplasmique rugueux (REG)** en **violet**.

Au contraire, l'**Eosine** est un colorant **acide** qui se fixe aux **protéines** et donc **colore le cytoplasme et les fibres** en **rose**.

Une autre coloration **fréquente** est l'**Hématoxyline-Eosine-Safran (HES)**. Ce dernier colorant a une affinité avec les **fibres de collagène de la MEC des tissus**, et permet donc de mettre ces fibres en évidence en **jaune**. pense à l'épice



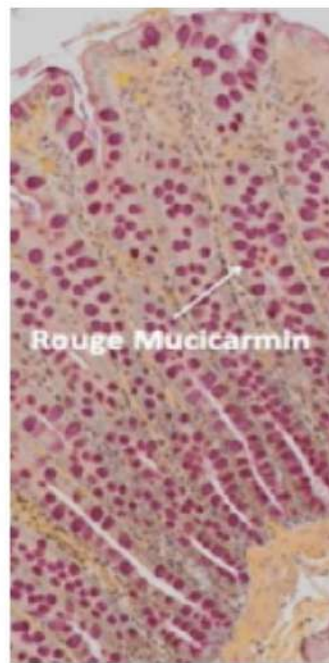
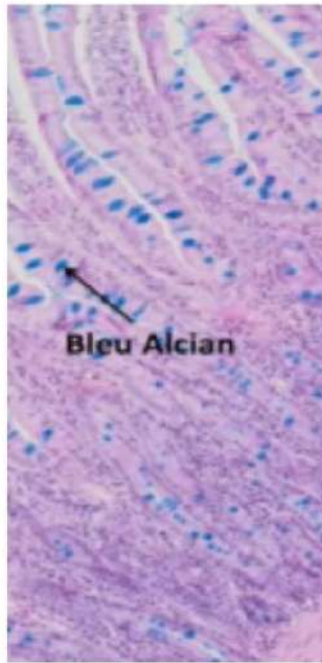
La coloration **Trichrome de Masson** est elle aussi **classiquement** utilisée en laboratoire, surtout pour identifier les **pathologies musculaires, cardiaques, hépatiques et rénales**.

Elle permet de bien différencier d'une part les **fibres musculaires** dont le **cytoplasme** prend une coloration **rouge** et d'autre part les **fibres de collagène** qui se colorent en **vert**. je vois plus du bleu perso



7) HE : noyaux roses et cytoplasme violet ?

Il existe évidemment bien d'autres possibilités de coloration des tissus. Des **réactions chimiques plus spécifiques** peuvent aussi parfois être utilisées pour mettre en évidence **certaines structures**.



Le **mucus** présent dans certains tissus peut être coloré à l'aide du **bleu Alcian** ou du **rouge Mucicarmin** qui colorent les **mucopolysaccharides acides** respectivement en **bleu** et en **rouge**.

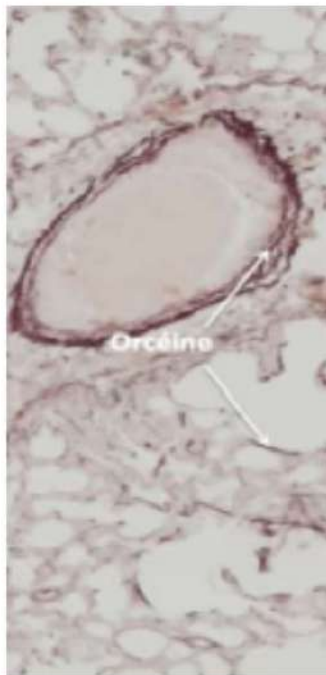
La coloration à **l'acide périodique de Schiff (PAS)** qui met en évidence les **glucides** par un colorant **rouge pourpre** (là aussi ce n'est pas très rouge pourpre mais admettez mdr).

Cette coloration permet par exemple de mieux visualiser le **glycogène ou les mucines** contenues dans certaines cellules, ou encore la **membrane basale des épithéliums** qui sont riches en **glycoprotéines**

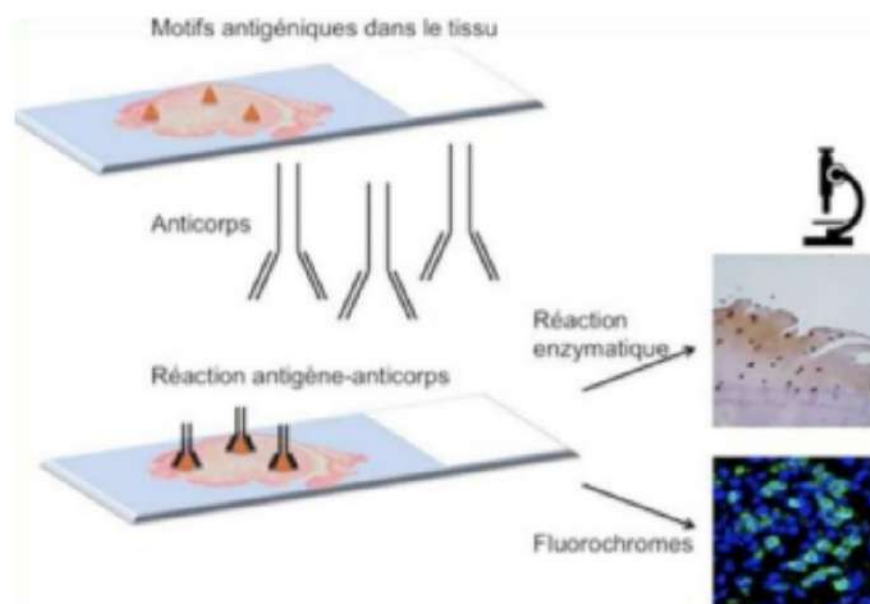


**8) Quel colorant a une affinité pour les fibres de collagène de la MEC et les colore en jaune ?**

**Mentions spéciales** : coloration à l'**orcéine** qui est une coloration spécifique des **fibres élastiques** que l'on trouve dans les **tissus conjonctifs**, mais aussi l'imprégnation à l'**argent** qui permet de visualiser les **fibres de collagène de type 3 (fibres réticulées)** et finalement la fixation à l'**acide osmique** qui permet de conserver et visualiser les **lipides** des tissus biologiques.



Finalement, d'autres techniques dites **d'immunohistochimie** peuvent être utilisées pour mettre en évidence des **motifs antigéniques** présents dans le tissu. Elles sont couramment utilisées en 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.



Pour la réalisation de cette technique la **congélation des tissus est préférable** car elle permet une **meilleure conservation des sites antigéniques** dans le tissu que la paraffine (la chaleur les détruit) .



9) Congélation ou paraffine : laquelle conserve le mieux les antigènes ?

## VI. Le montage

### L'assemblage

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

Lorsque le tissu a été coloré, il faut le **protéger par l'apposition d'une résine et d'une lamelle de verre couvre-objet**, ou bien par un **film plastique**. Ceci permettra de conserver la lame et de l'observer au microscope **sans risque d'abîmer le tissu**.

On sait donc maintenant comment on réalise des lames histologiques à partir d'un prélèvement de tissus.

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. Le processus de digitalisation

### Numérisation

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'intérêt** et les mettre comme référence sur l'image, ainsi que d'**incorporer des commentaires sur l'image**. *En histologie, ce que l'on voit dépend autant de la technique utilisée que du tissu lui-même*



**Réponses aux questions:**

- 1) rendre le tissu observable au microscope
- 2) lors d'une endoscopie ou pour un prélèvement diagnostique de petite taille
- 3) conserver (ou immobiliser)
- 4) Faux
- 5) la paraffine est hydrophobe
- 6) 2 à 5  $\mu\text{m}$
- 7) Faux
- 8) Safran
- 9) la congélation

*Si tu sais répondre aux mini questions, tu es prêt(e) pour les QCM*

Dédicaces aux personnes que je suis de loin comme de près :

- ★ Dédi à toi Ersilia, una clau d'or d'herbe partout ;)
- ★ Dédi à toi Safa, notre grande tête
- ★ Dédi à toi Lucas et à la vie qui est belle !! (je crois en toi)
- ★ Dédi à mes fillots et fillotes, que je chéris tellement !!!!! à toi Caroline, à toi Radima, à toi Nathan et à toi Marwan !! On forme une très belle famille <3, je crois beaucoup en vous : la réussite est présente !!
- ★ Dédi à toi Oscar, le physiologiste dans l'âme et à notre super médecin
- ★ Dédi à toi, P1, qui lis tout ça !!
- ★ Dédi à tous les LAS 2/3 : vous avez fait tellement de chemin, ce n'est pas le moment de lâcher !!
- ★ Dédi au Pr Ambrosetti qui m'a fait aimer l'histologie