

PRÉPARATION TISSULAIRE, TECHNIQUES DE MARQUAGE ET MOYENS D'ÉTUDE MORPHOLOGIQUE EN HISTOLOGIE

Du prélèvement au conditionnement de l'échantillon

Problématique : Ce que l'on veut étudier n'est pas visible à l'œil nu. On utilise des microscopes et on traite notre échantillon avec des agents physiques et chimiques pour résoudre ce problème avec différentes étapes :

→ **Fixation – Inclusion – Coupe – Coloration – Montage +++**

!/ Le but est de préserver l'intégrité du tissu, ces caractéristiques morphologiques, mais ces étapes vont **tuer la cellule** → On ne peut pas faire une étude dynamique, on obtient une photo figée à l'instant T.

Résolution spatiale d'un microscope : Capacité de distinguer 2 points contigus très rapprochés. Pour avoir une bonne résolution spatiale, le microscope doit être sensible et l'image contrastée. **Plus la résolution est élevée, plus on peut distinguer 2 points très proches.** +++

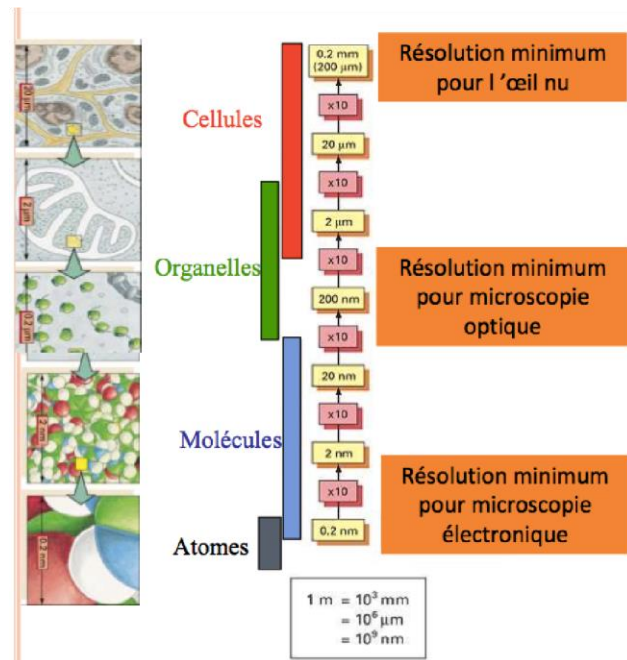
Les échantillons :

- **Des tissus humains ou animaux** : pièces opératoires, biopsies, autopsies
- **Des cellules** : Liquides biologiques physiologiques ou pathologiques, frottis.

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.

→ Cette étape permet de ventiler l'échantillon vers des techniques d'analyse différentes : ME (pouvoir de résolution élevé qui permet de voir les organites intracellulaires), biologie moléculaire (ex : caryotype), microbiologie, Congélation (conservation dans tumorothèque ou techniques de coloration)



Les perturbations peuvent être liées aux agents de fixation ou aux différentes colorations.

3) Le conditionnement : Les objectifs sont :

- **La conservation de l'échantillon** → Les figer dans l'état dans lequel on les a reçus. Il prévient de la lyse cellulaire, du dessèchement, de la contamination microbienne. Sans conditionnement, l'analyse sera de très mauvaise qualité voire impossible
- **La préservation de la morphologie cellulaire et tissulaire**
- **La rigidification** du tissu pour faciliter les coupes
- **La réalisation des techniques d'histologie** (coupe, coloration, immunohistochimie)

→ Le conditionnement doit être **rapide** et se divise en 2 techniques selon l'étude à laquelle est destinée l'échantillon.

➤ **La congélation** : En pathologie !

- **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
Effet indésirable : Artefact lié à la congélation
- **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** pour la ME et la MO

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

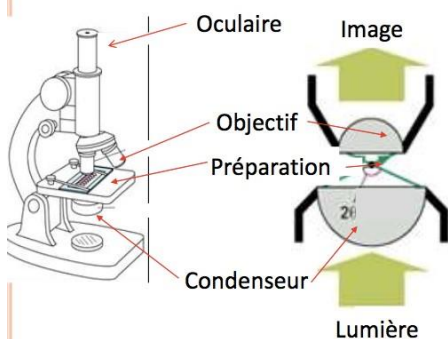
Pour le MO : On fixe au **formol 10%** (aussi pour immunohistochimie et analyse moléculaire)

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

/!\ En analyse moléculaire on peut envoyer des tissus frais pour un caryotype, des tissus fixés pour un séquençage. **Caryotype = cellules vivantes** +++

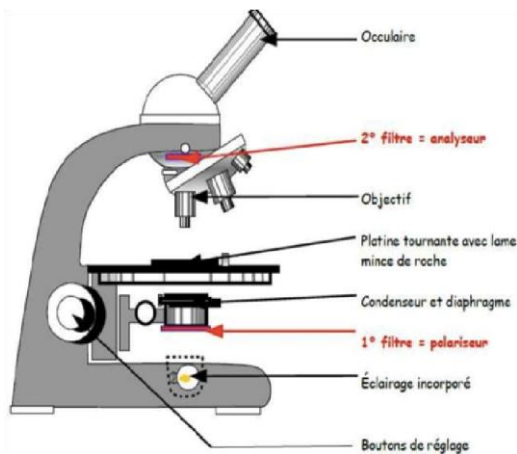
La microscopie Optique/photonique

- 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 à 0,2 μm .** Si les cellules sont plus proches que ça on aura une image floue.



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 en lumière polarisée

C'est un microscope photonique à fond clair que l'on équipe 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 1^{er} 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

Traitement de l'échantillon, l'inclusion en paraffine

Rappel : On a prélevé le morceau de tissu intéressant qu'on a mis dans des cassettes puis fixé au formol pour observation au MO

- **La paraffine** est une huile qui se solidifie à température ambiante et va donc donner une **consistance solide au tissu** permettant de faire des coupes fines qui laisseront passer la lumière.
- **L'inclusion en paraffine est précédée d'une étape de déshydratation et d'enrobage.** Lors de l'étape de déshydratation, on va éliminer l'eau et le fixateur. L'eau tissulaire est remplacée par de la paraffine mais ces milieux ne sont pas miscibles donc on procède par étapes :
 - On remplace l'eau par l'alcool
 - L'alcool par un solvant organique comme le Toluène
 - Le Toluène par la Paraffine.
- Une fois que l'échantillon est enrobé de paraffine, on le place sur une station d'inclusion afin de l'orienter et on fait couler de la paraffine liquide entre 56 et 58 °C qui va durcir et former **un bloc de paraffine**.
- On place l'échantillon sur de la glace pour que la paraffine durcisse plus vite.
- Lorsque le bloc est refroidi, on le démoule, et c'est grâce à ce bloc qu'on va pouvoir faire les coupes.

Réalisation des lames

- ✓ **La coupe** → C'est ce que l'on appelle **la microtomie** car les coupes sont réalisées avec un microtome. 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**
- ✓ **Montage** → Une fois la coloration choisie (standard, spéciale, immunohistochimie), on applique **une lame de verre ou un film** sur l'échantillon qui apparaîtra net au microscope.

Coloration : Voir fiche n°2

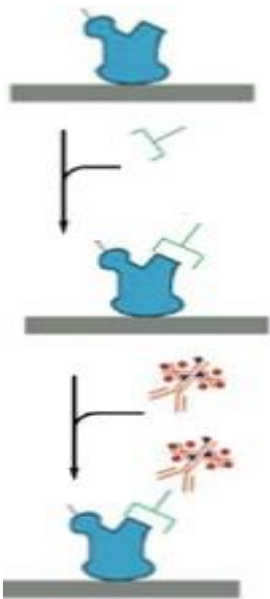
L'immunohistochimie

Définitions :

- **Un anticorps** est une immunoglobuline produite par le système immunitaire des mammifères en réponse à l'introduction d'un élément étranger dans l'organisme. Il se fixe spécifiquement sur les motifs antigéniques.
- **Un épitope** c'est ce qu'exprime l'antigène.
- **L'avidité** c'est l'affinité avec laquelle l'anticorps va se fixer sur l'antigène.

→ C'est une **méthode de détection d'une protéine** sur une coupe tissulaire (immunohistochimie) ou plus rarement sur un prélèvement cytologique (immunocytochimie).

→ C'est une **révélation in-situ**, c'est-à-dire directement sur la coupe. C'est basé sur le principe de **réaction Antigène/anticorps** et est lié à la présence de récepteurs antigéniques qui vont se trouver au niveau *extracellulaire* ou bien au niveau *intracellulaire*.



Fonctionnement :

→ La lame de verre est schématisée en gris et l'antigène en bleu

1) On ajoute **l'anticorps primaire qui est spécifique de l'antigène** que l'on recherche directement sur le tissu. Si cet antigène est présent, le motif antigénique est reconnu et il y a **liaison entre l'anticorps primaire et l'antigène**

2) L'anticorps primaire n'est pas visible, on a besoin d'un **anticorps secondaire** pour faire la révélation. L'anticorps secondaire est **spécifique de l'anticorps primaire** et pas de l'antigène (!)

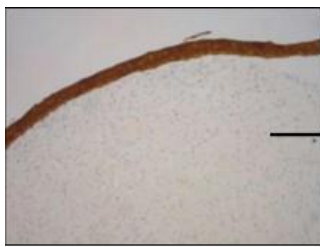
3) Le complexe est couplé à un système de révélation enzymatique qui va produire une couleur en général brun-rouge.

→ Il existe des anticorps spécifiques d'organes et des anticorps spécifiques de tissu.

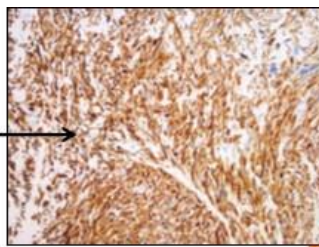
Anticorps POLYCLONAUX

Anticorps MONOCLONAUX

Production	- S'obtiennent par <i>immunisation d'un animal</i>	- S'obtiennent par culture cellulaire, par <i>criblage d'hybridome</i>
Avantages	Facilité de production, Peu coûteux <u>Très bonne avidité</u> → Plusieurs épitopes sont reconnus	Plus spécifique de l'antigène, donc moins de bruit de fond
Inconvénients	L'anticorps se fixe facilement donc il va y avoir un bruit de fond important	Technique longue, complexe et coûteuse, Manque d'avidité , si les antigènes sont altérés, il y a un risque de non reconnaissance, Technique moins sensible



Prolifération Tumorale sous cutanée
Anticorps anti-pancytokeratine



Prolifération Tumorale sous cutanée
Anticorps anti-desmine



Tumeur d'origine inconnue

→ L'immunohistochimie sert au **diagnostic du tissu** (épithélial, mésenchymateux, musculaire). Les 2 premières photo représentent la prolifération d'une tumeur sous cutanée dont *on voulait connaître la nature*. On fait d'abord un test avec des anticorps qui marque les cellules épithéliales mais les cellules tumorales ne sont pas marquées donc la tumeur n'est pas d'origine épithéliale (**Photo 1**). On utilise ensuite un anticorps qui marque les fibres musculaires et là il y a un marquage, donc la tumeur est d'origine musculaire (**Photo 2**).

→ Cette technique ne permet presque jamais de faire le diagnostic d'une tumeur maligne vs bénigne, elle donne juste le type de tissu dont elle provient.

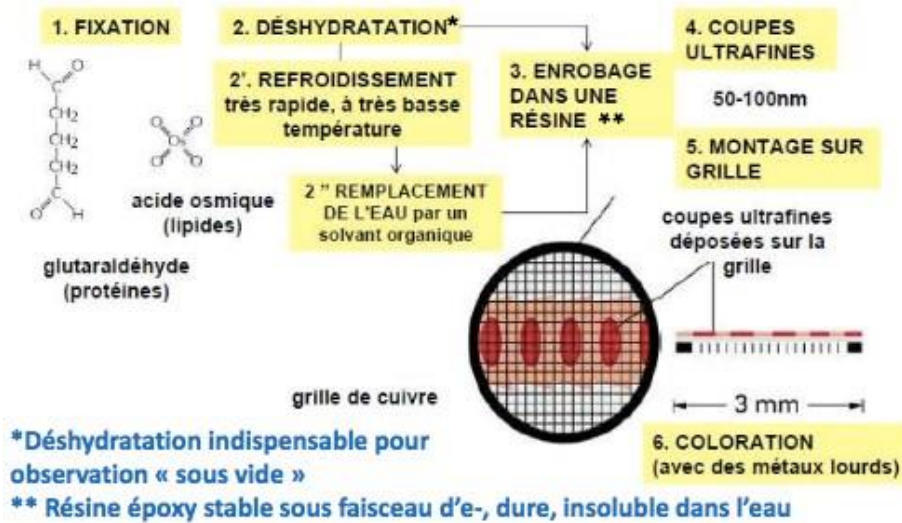
La microscopie électronique

- Elle 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 : A transmission et à balayage

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 ou épon** (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.

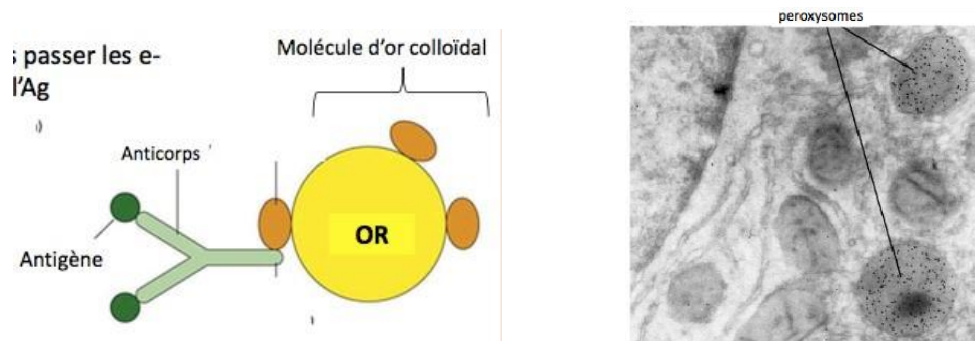
→ La microscopie électronique va permettre une **très bonne visualisation des contours des cellules et des organites**. Plus une structure cellulaire est dense aux électrons, plus elle est foncée car elle ne laisse pas passer les électrons. Toutes les structures cellulaires vont être plus ou moins perméables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

Marquage à l'or ou immuno-marquage

- C'est le même principe que l'immunohistochimie à la différence que c'est marqué grâce à de l'or et pas de la couleur. L'or ne laisse pas passer les électrons donc toutes les molécules fixées apparaîtront en noir. Les coupes de l'échantillon sont mis en présence d'anticorps dirigés contre la protéine à visualiser (joue le rôle d'antigène). Les anticorps s'associent aux particules d'or (dense aux électrons).



- C'est ce que l'on voit sur cette section de foie : On veut mettre en évidence l'enzyme qui dégrade le peroxyde d'hydrogène. On peut voir les peroxysomes tous les points noirs.

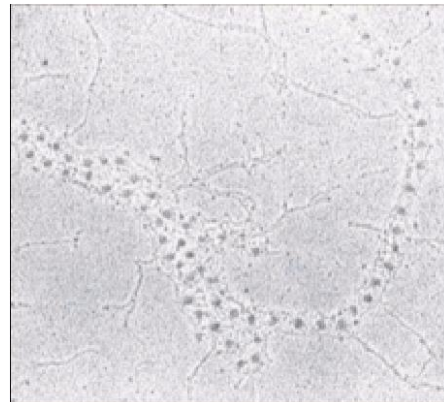
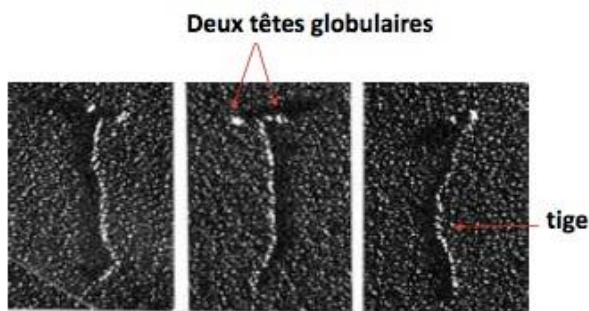
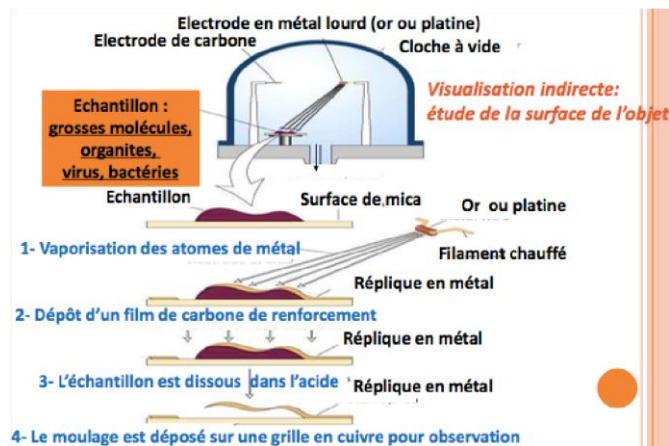
Coloration par ombrage

- Le but est de **renforcer le contraste d'un échantillon initialement faiblement contrasté** et permet **d'étudier la surface des objets**. On dépose des **métaux lourds** sur et autour de l'échantillon et par un jeu d'ombre le contraste augmente.

<u>AVANTAGES</u>	<u>INCONVENIENTS</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Etudes d'échantillons distincts de très petite taille sans contraste : les macromolécules - Conformation spatiale : Structure fibrillaire ou en réseau - Reconstruction d'image 3D - Mesurer l'épaisseur/hauteur des particules 	<ul style="list-style-type: none"> - Lié au risque d'agglomération des particules métalliques car la résolution dépend de leur taille et/ou de leur répartition

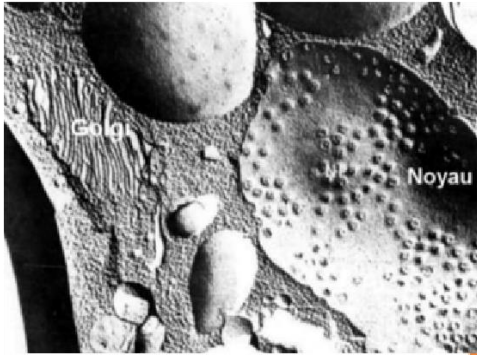
→ On vaporise du métal sur la résine en époxy. Le métal peut être de **l'or ou du platine ou des atomes de carbone**.

/!\ On dissout le tissu et on conserve uniquement la réplique donc c'est une visualisation indirecte.



Cryofracture

- Elle évite la fixation chimique et donc évite les **risques de dénaturation de l'échantillon**. C'est la technique de choix pour visualiser les organites et les membranes sans altération.
- On congèle l'échantillon dans **l'azote liquide** pour préserver l'organisation interne du tissu, puis il y a l'étape de sublimation (le tissu est fracturé sous vide et décapé). On vaporise alors une fine couche de platine (augmente le contraste) et de carbone (apporte la résistance). On obtient **alors une réplique de la surface** qui sera observée au microscope après dissolution du tissu. **Les zones riches en platine apparaîtront noires, celles sans relief seront grises et celles sans platines seront blanches.**



Ici une cellule végétale en cryofracture. On peut voir les organites de la cellule.

La microscopie à balayage

L'objet que l'on veut étudier est **balayé par le faisceau d'électrons qui ne traverse pas le tissu** mais excite la surface ce qui va entraîner la production d'**électrons secondaires** par le tissu, qui sont alors recueillis par un détecteur. L'échantillon est **fixé et recouvert de métaux lourds** (parfois vivant). Ça permet d'étudier **la surface des cellules en 3D**. la résolution est plus faible que pour la ME (**10 nm**).

Cette technique est très utilisée en histologie car elle permet la description de l'architecture et de l'agencement des cellules. Mais elle est peu utilisée en pathologie.

Fibres de collagène dans un tendon

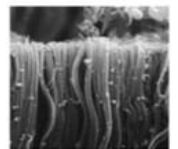
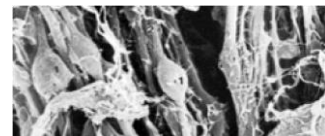


Tableau récap

