

Méthodes classiques de préparation histologique

Cette fiche est dans la continuité de celle d'intro à l'histo...

« 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=TymaG_b89dU&ab_channel=DoYouKnow

Voyons ensemble ces étapes !

I) Prélèvement

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**.

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) Fixation

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**.

Généralement il s'agit de **formol** ou de **paraformaldéhyde** 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 et de la putréfaction bactérienne post-mortem.

III) Inclusion

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 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 tissus 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) **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 (*logik*). C'est pourquoi on utilise en histologie des **colorants** qui permettent leur observation au microscope.

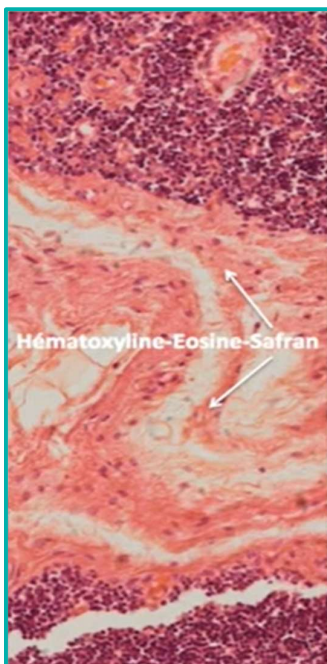
La plupart sont des composants **acides** ou **basiques** en milieu aqueux, qui **interagissent avec les radicaux ionisés des tissus**.

➔ 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.

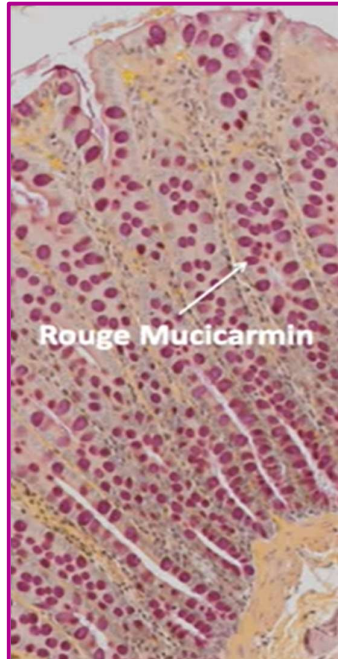


➔ La **coloration trichrome de Masson** est elle aussi classiquement utilisée en laboratoire, surtout pour identifier les **pathologies musculaires, cardiaques, hépatiques et rénales** car elle permet de bien différencier d'une part les **fibres musculaires** dont le **cytoplasme** prend une coloration **rouge** et d'autre part les **fibres de collagène** qui se colorent en **vert**. (*oui on dirait plus du bleu mais admettez que c'est du vert*)

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

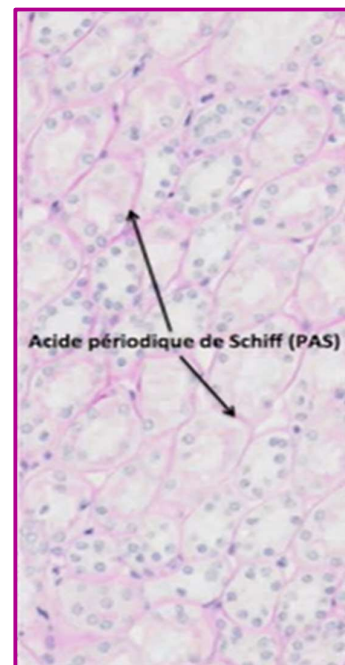
Des **réactions chimiques plus spécifiques** peuvent aussi parfois être utilisées pour mettre en évidence certaines structures.

Exemples :

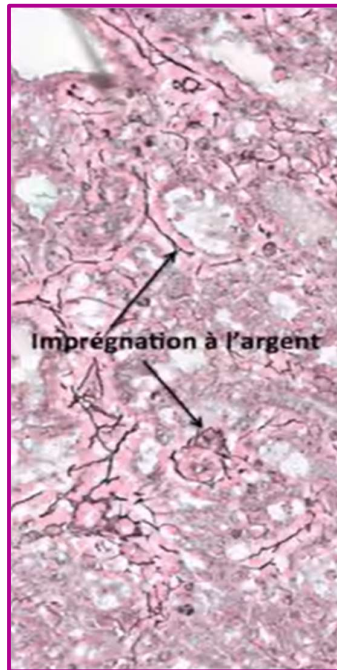


➡ Le **mucus** présent dans certains tissus peut être coloré à l'aide du **bleu Alcian** ou du **rouge Mucicarmin** qui colorent les **mucopolysaccharides acides** respectivement en **bleu** et en **rouge**.

➡ 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**.



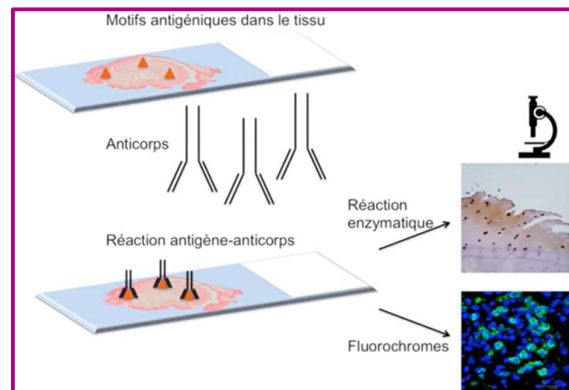
➡ **Mentions spéciales** : coloration à l'**orcéine** qui est une coloration spécifique des **fibres élastiques** que l'on trouve dans les **tissus conjonctifs**, mais aussi l'imprégnation à l'**argent** qui permet de visualiser les **fibres de collagène de type 3 (fibres réticulées)** et finalement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

La **réaction antigène-anticorps** est visualisée soit par une **réaction enzymatique**, soit à l'aide de **substances chimiques** appelées **fluorochrome**.

Pour la réalisation de cette technique la **congélation des tissus** est préférable car elle permet une meilleure conservation des **sites antigéniques** dans le tissu.





VI) Montage

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'abimer le tissu**.

On sait donc maintenant comment on réalise des lames histologiques à partir d'un prélèvement de 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 particulier** 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** tels que la netteté.

La **numérisation** à proprement dite peut alors avoir lieu. Des milliers d'image de la coupe histologique fournies par l'objectif du microscope réglé à **l'agrandissement maximum choisi** sont enregistrées **de manière sérielle**, puis **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.



Les lames scannées présentent de nombreux avantages comme notamment un accès partagé entre de nombreuses personnes, une consultation à distance et à tout moment.

Elles permettent également de pointer certaines structures d'intérêt et d'incorporer des commentaires sur l'image.

Dédiiiiis

Dédis courtes ajd (je suis en retard je dois me bouger)

Déjà dédis à vous pck vous êtes trop trop forts

Dédi au Tutorat, cette magnifique famille et aux merveilleux amis que j'ai dedans

Dédi aux Chefs Tuts qui font un boulot de fou souvent invisible et sans qui le Tut ne pourrait exister

Et dédi à mes incroyables co-tuts <3

Dédi au 4 et au 5

Courage à vouuuus plein de bisouuuus