

FICHE TECHNIQUE TP HISTOLOGIE
- PREPARATION D'UNE LAME HISTOLOGIQUE -

OBJECTIFS SPECIFIQUES :

- Décrire les étapes de prise en charge d'un prélèvement histologique humain
- Connaître en détail les techniques histologiques de routine et comprendre le rôle de chaque réactif utilisé
- Comprendre la confection d'une lame histologique à partir d'un fragment de peau

MATERIELS

VERRERIES

Lame & Lamelle

cuve de coloration en verre (type Coplin & type Hellendhal)

Cuve de rinçage en verre
Cristallisoir

Bécher

Entonnoir

Erlenmeyer

Compte-goutte

Pipette Pasteur



MATERIELS



Microtome



Etuve



Plaque chauffante



Barres de Leuckart



Microscope photonique

REACTIFS

Formol

Liquide de Bouin

(mélange d'eau 5%, acide acétique 10%, formol 25% et d'acide picrique 75%)

Alcool absolu à 100°

Eau distillée

Xylène

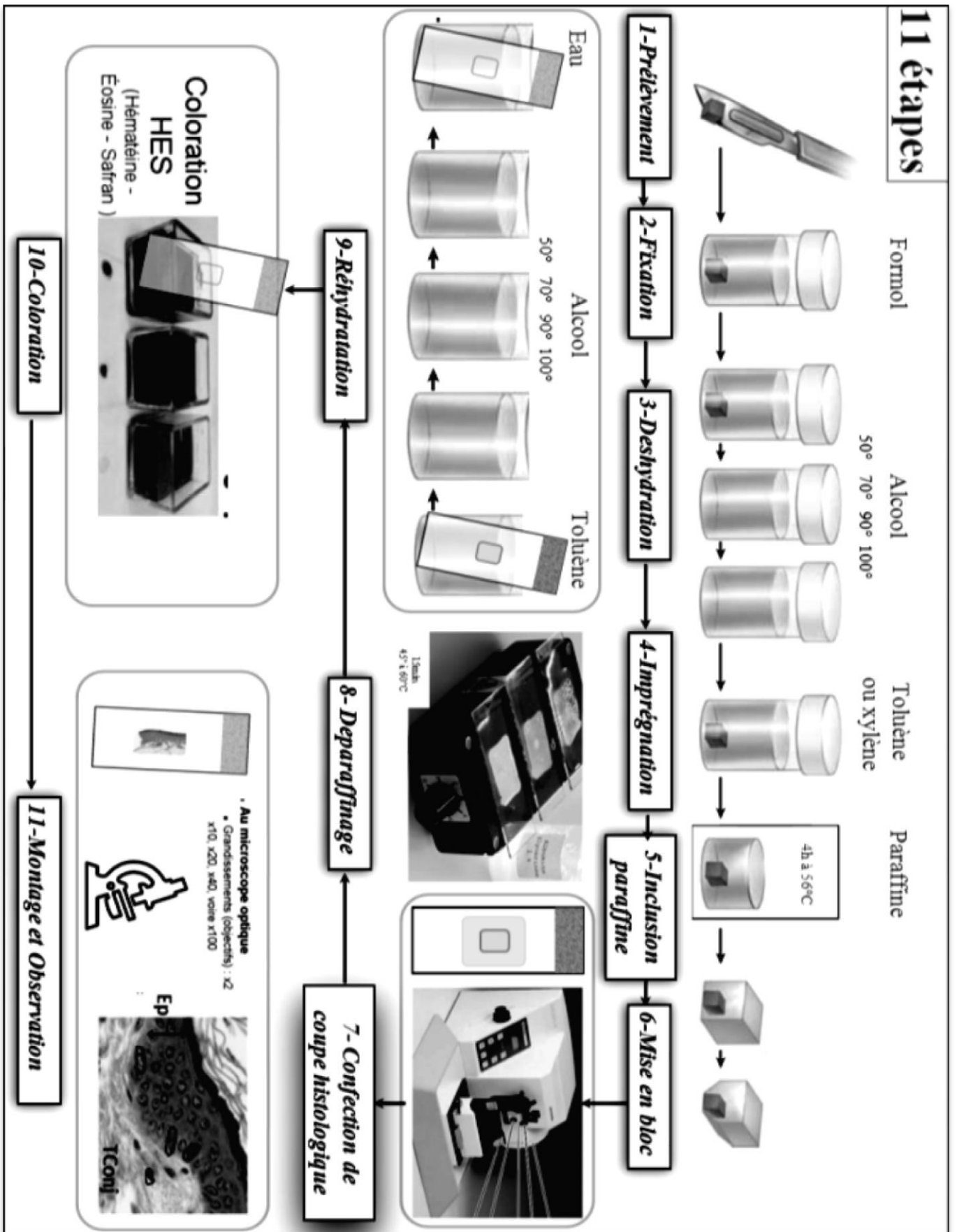
Toluène

Paraffine

Colorants (Hématéine –éosine –Safran -vert lumière- Bleu d'aniline)

Baume de Canada

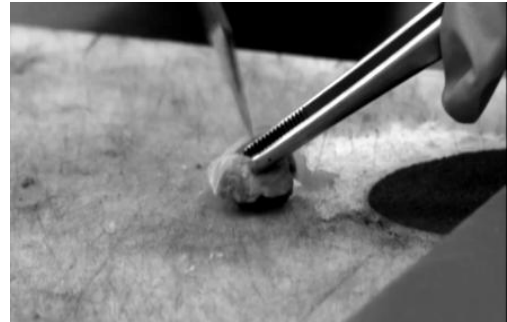
Nombre de postes : 15 postes par binôme



11 ETAPES

1. Prélèvement

Le prélèvement doit se faire aussi délicatement que possible afin de ne pas dégrader l'organisation tissulaire. Une fois obtenu, ce prélèvement doit immédiatement être immergé dans un grand volume de liquide fixateur.



2. Fixation

La fixation a pour but la conservation des structures dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toutes activités mitotique et enzymatique. Ainsi que le durcissement de la pièce anatomique.

Les liquides fixateurs les plus utilisés en pratique courante sont le **formol** ou le **liquide de Bouin** (mélange d'eau 5%, acide acétique 10%, formol 25% et d'acide picrique 75%).

La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements.

3. Déshydratation

Le but de cette étape est d'éliminer l'eau intracellulaire, pour pouvoir réaliser une coupe fine par la suite sans perdre la structure cellulaire initiale au moment de la rupture de la membrane plasmique (sortie d'eau brutale)

Ceci par passage du prélèvement dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (**de l'alcool à dilué 50° jusqu'à l'alcool absolu à 100°**).

Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe.

4. Imprégnation

Par le passage du prélèvement dans un liquide intermédiaire afin d'en éliminer les traces d'alcool absolu.

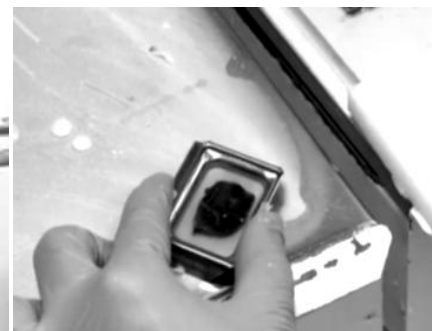
On utilise dans cette étape d'imprégnation le **xylène** ou le **toluène**, solvant intermédiaire favorable aux échanges membranaires entre l'alcool↔toluène d'une part et toluène↔paraffine d'autre part.

5. Inclusion

Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines (d'une épaisseur de 2 à 5 µm) et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la **paraffine** (résine blanche opaque).

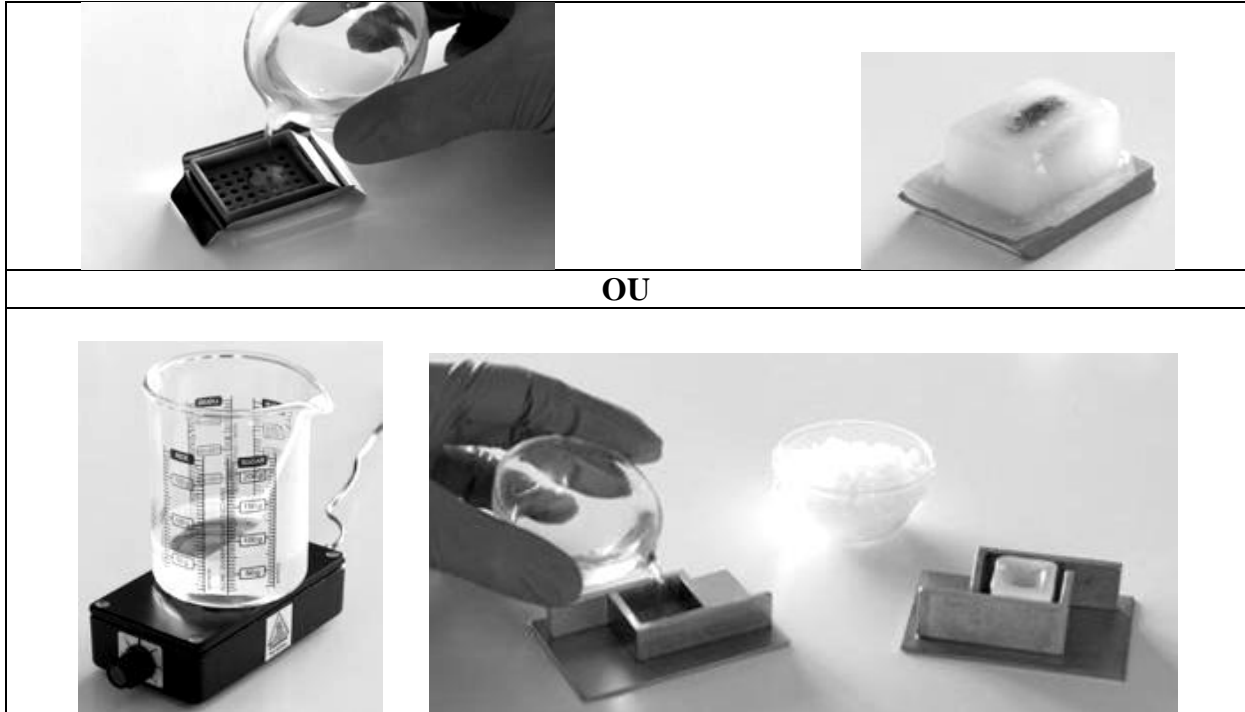
Le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (**chauffée à 56°C pendant 4h dans une étuve**) et qui infiltre alors toutes les cellules.

Remarque : L'inclusion peut être réalisée au niveau d'un automate de paraffine fondue d'usage dans les laboratoires de routine



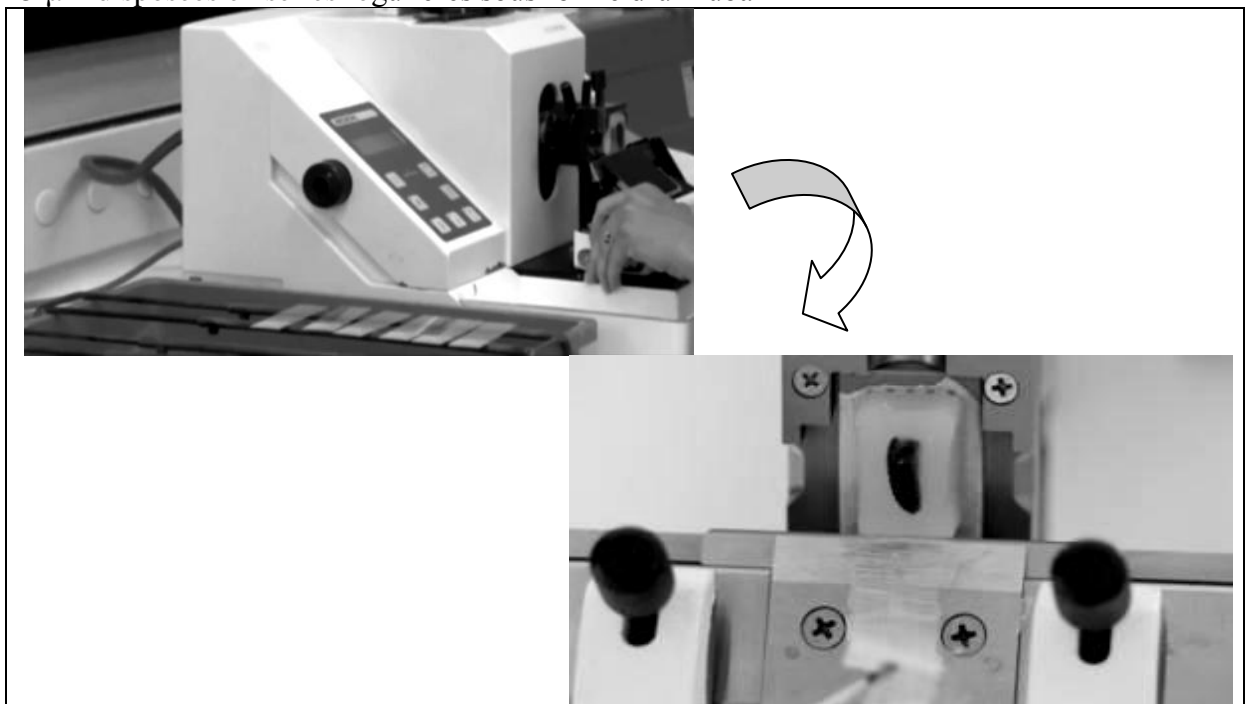
6. *Mise en bloc*

Après 4 heures d'inclusion, la paraffine liquide est coulée dans un petit moule en métal « **Barres de Leuckart** ». Après refroidissement (dans un congélateur pendant toute une nuit), on se trouve alors en présence d'un bloc de **paraffine dur**, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est rigide en présence de paraffine solide dans l'espace intracellulaire de chaque cellule composant le tissu.



7. *Confection des coupes histologiques*

Le passage du bloc de paraffine dans un **microtome** permet de réaliser des sections de 2 à 5 μm disposées en séries régulières sous forme d'un ruban



la confection des coupes histologiques comporte alors 3 étapes :

- **L'étalement** : de segments de ruban de paraffine sur une lame de verre contenant un liquide d'étalement tel que l'**eau albumineuse**.
- **Le collage** : les lames de verre sont placées sur une plaque chauffante, réglée à une température de 40°C, pendant 15 min.
- **Le séchage** de la préparation : en inclinant les lames et en les séchant au moyen de papier buvard absorbant.

8. Déparaffinage

Le déparaffinage consiste, comme son nom l'indique, à éliminer la paraffine, c'est-à-dire le milieu d'inclusion. Les lames sont placées sur une **plaque chauffante (de 45 à 60°C)** pendant 15 min. afin d'obtenir la liquéfaction et donc l'élimination de la paraffine périphérique.



9. Réhydratation

La réhydratation permet l'élimination de la paraffine intracellulaire, en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (**de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool à 50°**), puis dans de l'**eau distillée**.

10. Coloration

Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires (noyau, membrane plasmique et cytoplasme).

10-1 Par histochimie :

La coloration se base sur des réactions chimiques connues entre des réactifs de laboratoire (colorants) et des composants des tissus étudiés.

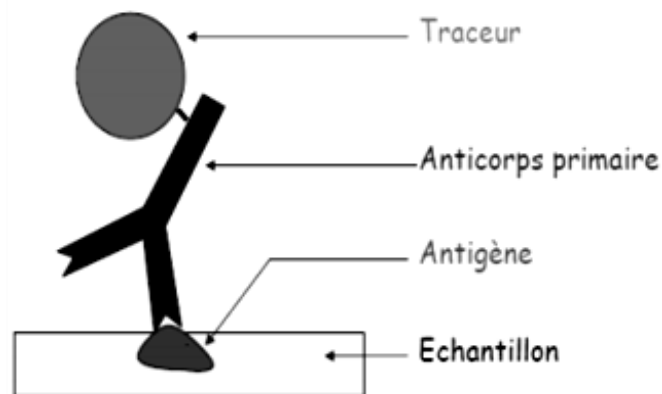
Ex1 : coloration hématoxyline-éosine-safran (HES), l'hématoxyline est un colorant basique se fixe par affinité aux molécules acides (ADN) permettant de colorer le noyau, l'éosine est un colorant acide se fixe par affinité aux molécules basiques permettant de colorer le cytoplasme et le safran se fixe par affinité entre les fibres de collagène.

Ex 2 : coloration Bleu Alcian ou du Rouge Mucicarmin : Le mucus présent dans certains tissus peut être coloré par la révélation des mucopolysaccharides acides respectivement en bleu ou en rouge.

Ex 3 : coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) met en évidence les glucides par un colorant rouge à pourpre. Permettant de mieux visualiser le glycogène ou les mucines contenus dans certaines cellules ou encore les lames basales des épithéliums qui sont riches en glycoprotéines

10-2 Par histochimie enzymatique : la distribution tissulaire de certaines enzymes spécifiques peut être étudiée sur des coupes fraîches en y ajoutant un substrat spécifique de cet enzyme. L'enzyme réagit alors avec ce substrat pour former un produit de réaction primaire, insoluble et pouvant être mis en évidence par une coloration. La plupart des systèmes enzymatiques sont détruits lors de la fixation, les méthodes d'histochimie enzymatique sont le plus souvent réalisées sur coupes en congélation. Ces techniques permettent de détecter un grand nombre d'enzymes s'exprimant de façon pathologique dans certains tissus (ex : infarctus du myocarde)

10-3 Par Immunohistochimie : Des anticorps spécifiques sont utilisés pour venir se fixer à une molécule (antigène) de la coupe histologique.



Ces anticorps, produits chez l'animal à partir de la protéine purifiée est couplé à :

- ✓ une enzyme (peroxydase) qui catalyse une réaction avec production de couleur
- ✓ un marqueur (fluorophore), le plus souvent fluorescent. On parle alors d'immunofluorescence. Les échantillons sont alors examinés sous microscope à fluorescence.

11. Montage & Observation microscopique

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique 'Baume de Canada' dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre.

On obtient, ainsi, une **préparation histologique** (ou par abus de langage : une lame histologique) prête à être observée au microscope optique.