

## CHAPITRE 3 : LES TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

Histologie → sciences des tissus

Objectif : observer et interpréter ce qui est vu

4 étapes :

- choix du matériel
- choix technique
- production des images
- interprétation des images

Observation au microscope → améliorer le pouvoir séparateur de l'œil (+ petite distance que l'œil est capable de distinguer lorsqu'il est placé à 25cm)

Pouvoir séparateur de l'œil humain normal : 200  $\mu\text{m}$   
(si plus petit que 200  $\mu\text{m}$  on ne voit qu'un point)

Pouvoir séparateur du MO x1000 : 0,2  $\mu\text{m}$  (ou 200 nm)  
Pouvoir séparateur du ME x 1 000 000 : 0,2 nm

### *I. Choix du matériel et modalités de prélèvement*

MATERIEL HISTOLOGIQUE = tissulaire

- biopsie : petits fragments de tissus ou d'organes
  - directe (ex : biopsie de peau)
  - par voie endoscopique (ex : biopsie de muqueuse digestive)
- Pièces opératoires : organes complets après opération (ex : ablation glande thyroïde)
- Autopsie

MATERIEL CYTOLOGIQUE = cellules isolées

- Frottis (ex : de la muqueuse linguale)
- Ponction à l'aiguille : pour récup un liquide (ex : liquide céphalo-rachidien, liquide d'épanchement), au sein d'un organe ou non
- Liquides spontanément émis (ex : urine)

### *II. Techniques de MO*

Les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui se déroulent en plusieurs étapes successives :

- 1- Fixation
- 2- Inclusion
- 3- Coupe
- 4- Coloration
- 5- Montage

## **(1) FIXATION :**

But : conserver les structures cellulaires dans l'état le plus proche de celui observé à l'état vivant  
Immédiatement après le prélèvement

Méthodes :

- immersion d'un grand volume de liquide fixateur pour une durée variable selon le volume de prélèvement  
→ **formaldéhyde ou formol** +++ (transparent)  
→ alcools : éthanol  
→ mélanges fixateurs : liquide de BOUIN (eau + formol + ac acétique + ac picrique → jaune à cause de l'ac picrique )
- Congélation à -20°C (lipides, cas particuliers)
- Dessiccation - Séchage à l'air (ex : frottis sanguins et médullaire)

Préparation des échantillons :

Recoupe des échantillons tissulaires fixés + choix des prélèvements + disposition dans les cassettes

## **(2) INCLUSION :**

But : durcir les prélèvements afin de réaliser des coupes fines et régulières de 5 à 7 µm d'épaisseur  
Inclusion en paraffine

Imprégnation des échantillons dans un milieu d'inclusion : PARAFFINE :

- liquide à 56 °C et solide à temps ambiante 20°C
- hydrophobe
- soluble dans les solvants (xylène )

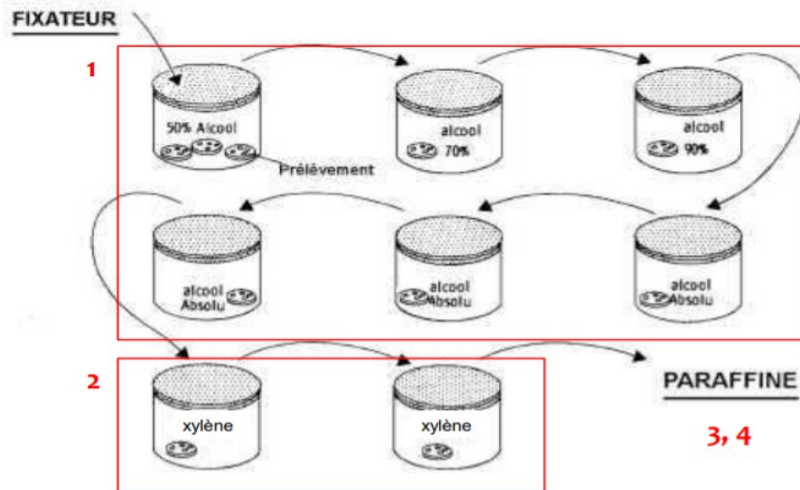
Différentes étapes à respecter avant inclusion :

1- DH: bains d'alcool de concentration croissante (50 °, 70 °, 90 °, 100 °)

2 – PASSAGE DANS UN SOLVANT DE PARAFFINE : bains de xylène pour permettre une imprégnation homogène

3- IMMERSION DANS DE LA PARAFFINE LIQUIDE (à 56°C) pendant plusieurs heures

4- INCLUSION ET REFFROIDISSEMENT: pour réaliser un bloc de paraffine durcie



### → COUPE DU BLOC DE PARAFFINE

- avec un microtome muni d'un rasoir
- obtention de coupes successives : rubans de 5 à 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur
- coupes étalées sur une lame de verre et collées à l'aide d'une goutte d'Albumine glycinée

### → COLORATION

Intérêt : accentuation des contrastes par fixation sélective des colorants

- colorants : sels en solution aqueuse
- différentes étapes à respecter avant coloration :

1- DEPARAFFINAGE : par chaleur + bain de xylène

2- REHYDRATATION DES COUPES : par des bains d'alcool de concentration décroissante (100° -90° -70° -50°)

3- COLORATIONS

- de routine : Hémalum-éosine, trichrome de Masson
- spéciales : coloration à l'ocréine

### 2 familles de colorants :

→ Colorants basiques (+)

- ex : Hémalum, Bleu de Toluidine
- affinité avec les groupements acides des ac nucléiques
- noyaux dits « basophiles »

→ colorants acides (-)

- ex : éosine
- affinité avec protéines cytoplasmiques
- constituants de cytoplasme dits « acidophiles » ou « éosinophiles »

Hémalum -éosine	Localisation	Trichrome de Masson
Bleu violet	Noyau	Violet
Rose	Cytoplasme	Rose
Rose	Fibres de collagène	Bleu vif

Colorations spéciales : permettent de mettre en évidence de façon sélective

→ fibres élastiques :

- ocréine : brun (ex : fibres élastiques paroi artérielle de l'aorte)

- fuschine résorcine: rose fuchsia (ex : fibres élastiques cartilage élastique)

→ fibres de réticuline : imprégnation argentique : brun (ex : fibres réticulées de la moelle osseuse hématopoïétique)

Propriété métachromatique/colorant métachromatique → capacité d'un colorant à donner à certaines structures une teinte différentes de celle de la solution mère

ex : bleu de toluidine : bleu, il va colorer en rose fushia les structures contenant des GAG

Orthochromatique → : teinte identique

### → MONTAGE DES LAMES

Intérêt : Protection de la coupe colorée par des lamelles de verre

- collage à l'aide d'une résine synthétique aux propriétés identiques à celles de la paraffine
- Différentes étapes :

1- DH : bains d'alcool de concentration croissante (50°C - 70°C - 90°C - 100°C)

2- PASSAGE DANS UN SOLVANT : bain de xylène

Ensuite, OBSERVATION AU MICROSCOPE :

Techniques spéciales

### HISTOCHIMIQUE

But : mettre en évidence et localiser un composant biochimique dans une cellule

- mise en évidence du glycogène et des GAG  
→ réaction du PAS (Periodic Acid Schiff) → précipité rose fushia
- Mise en évidence des lipides  
→ dissouts par les solvants (xylène) et l'alcool  
→ pour conserver les lipides :  
\* congélation à -20°C puis colorations électives des lipides : rouge Soudan et noir Soudan

### IMMUNOHISTOCHIMIQUE

But : mettre en évidence et localiser un antigène à l'aide d'un anti-corps spécifique

### **III. Techniques de microscopie électronique en transmission**

- faisceau d'électrons
- structures à l'échelon cellulaire (ultrastructure)
- importantes contraintes techniques
- indication spéciales

#### **→ FIXATION**

- Prélèvement de petite taille  $<1 \text{ mm}^3$
- Double fixation :
  - 1- dans glutaraldéhyde ou paraformaldéhyde
  - 2- Post fixation dans Tétroxyde d'Osmium (ac osmique) préservant les mb
- Fixation à  $4^\circ\text{C}$  pour éviter l'autolyse
- Durée adaptée au tissu

!!!! Les mélanges fixateurs utilisés en MO sont inutilisables en ME !!!

#### **→ INCLUSION**

- dans des résines
- propriétés comparables à celles de la paraffine
- solvant : oxyde de propylène
- différentes étapes à respecter avant inclusion
  - 1- DH : bains d'alcool de concentration croissante
  - 2- bain de solvant
  - 3- Enrobage en résine

#### **→ COUPE**

- Ultramicrotome
- éclats de verre ou de diamant
- coupe ultrafines de 50 nm (100 x plus fin qu'en MO)
- recueil des coupes sur des grilles porte objet (en cuivre)

#### **→ COLORATION**

- utilisation des sels de métaux lourds se déposant sur certaines structures → densité nécessaire pour diffracter le flux d'électron = contrastes
- colorants utilisés :
  - acétate d'uranyle : noyau, nucléoles, ribosomes
  - citrate de Plomb: membranes (mb plasmique et organites cytoplasmiques)
- coupes directement colorées : pas d'élimination de la résine ou de réhydratation