

STAGE EN HISTOLOGIE

Étude analytique, morphologique des tissus
du 08 Juillet 2019 au 26 Juillet 2019

Qu'est-ce qu'un tissu ?

► Définition :

Niveau d'organisation structural intermédiaire entre les cellules et les organes chez les eumétazoaires (Définition des tissus biologiques par Xavier Bichat, 1799). Il est pluricellulaire, avec une organisation structurée et une différenciation structurale liée à une spécialisation fonctionnelle. Les tissus composent le organes.

► Il existe 4 types majeurs de tissus :

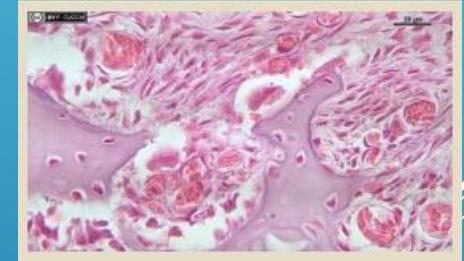
► Le tissu épithélial

Protection,
communication,
sécrétion



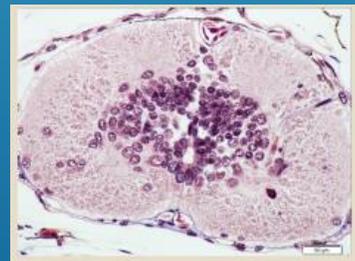
► Le tissu conjonctif

Soutien et
interface des
autres tissus



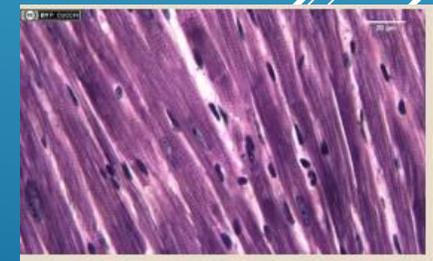
► Le tissu nerveux

Communication
par influx
(nerveux)



► Le tissu musculaire

Contraction



2

 Prélèvement des échantillons biologiques

 Fixation

 Inclusion

 Coupe

 Coloration

 Marquage ImmunoFluorescent

 Observations au microscope

 Analyse des données

LES PRINCIPALES ÉTAPES pour l'étude des tissus



Prélèvement des échantillons biologiques

- ▶ Les prélèvements doivent être pensés avant d'être réalisés :
 - ▶ Avec le matériel adapté
 - ▶ En respectant les normes légales
 - ▶ Dans le but de répondre à une problématique
 - ▶ En accord avec les analyses histologiques prévues



Fixation

- ▶ **But** : Permet de **conserver un échantillon biologique** dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.
- ▶ Elle permet :
 - ▶ de le **protéger** contre les attaques des microbes
 - ▶ de **s'opposer à l'hydrolyse** des constituants fondamentaux sous l'effet enzymatique
 - ▶ d'**insolubiliser** le constituants cellulaires
 - ▶ de **s'opposer aux distorsions** et rétractation des tissus
 - ▶ de **préparer** les structures aux traitements ultérieurs

Fixation

- ▶ Les fixateurs sont :
 - ▶ **L'alcool** : il contracte les cellules de la moitié de leur volume et rigidifie les tissus. Il n'a pas d'influence sur la plupart des colorants et n'empêche généralement pas leur diffusion. Son pH = 6 alors que celui de l'eau = 7.
 - ▶ **L'acide picrique** (solution saturée) : à la fois un fixateur et un colorant ; il est très acide. Peu pénétrant, il contracte moyennement les tissus et les durcit peu. C'est un bon fixateur pour la topographie histologique, moins bon pour les détails intracellulaires.
 - ▶ **L'acide acétique** (à 5% en solution aqueuse) est un acide moyen. Il peut être mélangé à l'alcool. Il a une vitesse moyenne de pénétration et gonfle les tissus : les tissus fixés sont extrêmement mous.
 - ▶ Le **formol** : très acide, il durcit fortement les tissus. Il permet la formation de liaisons entre les protéines à partir des acides aminés basiques (en particulier la lysine).
- ▶ Il existe différentes fixations dont : **le Paraformaldéhyde, le Gutaraldéhyde, le Liquide de Bouin, le Liquide de Hollande et le Fixateur de Davidson**



Fixation : Le paraformaldéhyde

- ▶ Monomères de formaldéhyde.

Inconvénients	Avantages
Fixation réversible	Fixation rapide
Fixation plus longue et moins stable qu'avec le glutaraldéhyde	Ne précipite pas les protéines
Durcie fortement	
Incompatible avec le tétr oxyde d'osmonium	Ne contracte pas les cellules

- ▶ Optimal entre 4% et 10%
- ▶ Non adapté aux observations morphologiques



Fixation : Glutaraldéhyde

- ▶ Dimères de formaldéhyde.

Inconvénients	Avantages
Nécessité d'une deuxième fixation au tétr oxyde d'osmonium	Fixation irréversible
Fixation au tétr oxyde d'osmonium incompatible avec l'extraction des lipides	Glycogène et matrice extra-cellulaire préservée
Pénétration lente	Ne précipite pas les protéines
Incompatible à la fixation en paraffine	Ne contracte pas les cellules
Incompatible avec les marquages immunologiques	Agent stérilisant et désinfectant



Fixation :

Liquide de Bouin

- ▶ Composé de d'acide picrique, de formol et d'acide acétique glacial

Inconvénients	Avantages
Détruit les lipides, l'appareil de Golgi, le chondriome	Conserve la chromatine
Dégrade les acides nucléiques (ADN utilisable pour les PCR)	Préserve le glycogène
Pas adapté pour les observations au microscope électronique	Bonne pénétration
Provoque de l'autofluorescence	Pas de Problème de sur-fixation
Acide picrique pur est explosif	Lavages aqueux non nécessaires

- ▶ Fixateur à utiliser avant une coloration pentachrome de MOVAT
- ▶ utilisé pour la décalcification des os lorsqu'il est supplémenté d'acide formique



Fixation : Le liquide de Hollande

- ▶ Composé de d'acide picrique, de formol, d'acide acétique glacial et d'acétate de cuivre. L'acétate de cuivre accroît la solubilité de l'acide picrique et permet d'en augmenter la concentration.

Inconvénients	Avantages
Détruit les lipides, l'appareil de Golgi, le chondriome	Diminue le gonflement des cellules (par rapport au liquide de Bouin)
Dégrade les acides nucléiques (ADN utilisable pour les PCR)	Conserve la chromatine
Pas adapté pour les observations au microscope électronique	Préserve le glycogène
Provoque de l'autofluorescence	Bonne pénétration
Acide picrique pur est explosif	Pas de Problème de sur-fixation
	Lavages aqueux non nécessaires



Fixation : Fixateur de Davidson

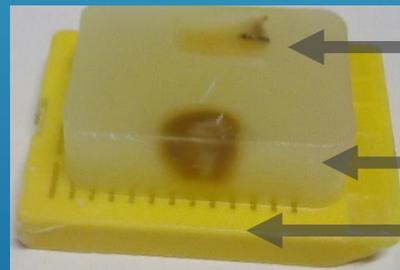
- ▶ Composé de formaldéhyde, alcool 70%, acide acétique glacial, éosine

Inconvénients	Avantages
Limite d'exposition au fixateur de 24h	Rapide
	Bons détails nucléaires
Opacifie les tissus au-delà de 24h	Adapté à la fixation des lipides

- ▶ Coloration par l'éosine
- ▶ Parfois appelé, fixation Hartmann.

Inclusion

- ▶ **5 étapes** sont nécessaires à l'inclusion en paraffine :
 - 1°/ **Déshydratation** de l'échantillon par des bains d'éthanol
 - 2°/ Pénétration de l'**agarose** dans les échantillons dans un moule (pour solidifier l'échantillon et permettre de mieux l'orienter dans la paraffine)
 - 3°/ Imprégnation par un **solvant** de la paraffine (ici, l'histochoice)
 - 4°/ Imprégnation de la **paraffine** dans 4 bains successifs
 - 5°/ Coulage des **blocs** et étiquetage des blocs dans des cassettes
- ▶ Les blocs sont ensuite conservés à 4°C



← échantillon

← paraffine

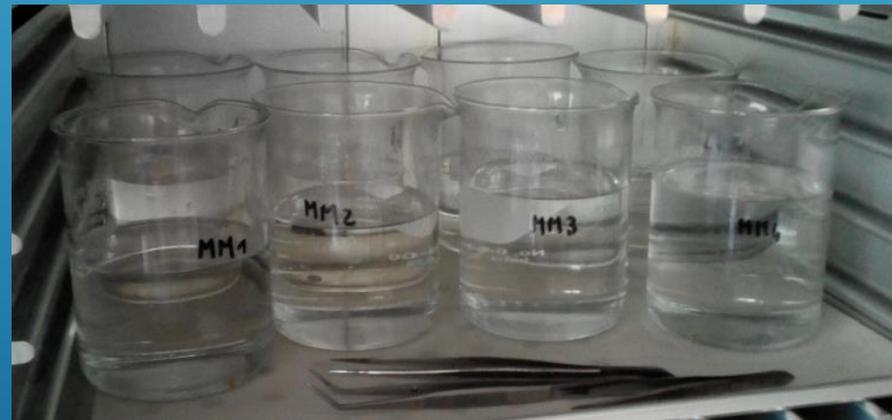
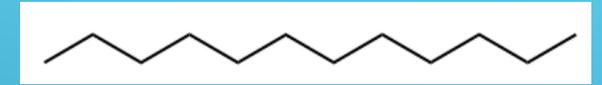
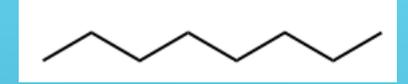
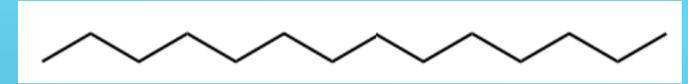
← cassette

Un bloc de paraffine durcie contenant un fragment du tube digestif de *Dicentrarchus labrax* (bar commun) en coupe transversale et longitudinale



Automate EC 350
d'enrobage en blocs des
échantillons déjà imprégné
en paraffine

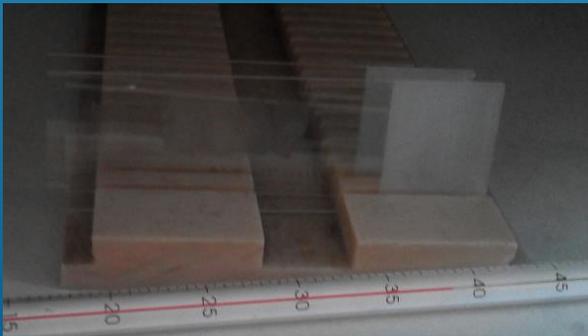
- ▶ C'est un mélange d'hydrocarbures à chaîne droite.
- ▶ Selon les mélanges le point de fusion de la paraffine peut varier entre 40 et 70°C, un indice de sa dureté finale (utilisation de la paraffine avec un point de fusion à 56°C dans ce stage).
- ▶ La paraffine a pour but de solidifier l'échantillon et de la rendre plus maniable pour les coupes histologiques au microtome.



Les 4 Bains de paraffine sont conservés à 56°C pour l'imprégnation

Coupe

- ▶ Entre 4 et 10 μm en paraffine
- ▶ Jusqu' à 1 μm en résine
- ▶ Réalisées avec le microtome LEICA RM 2235 à 5 μm .
- ▶ Le ruban formé doit être étiré dans un bain marie à 40°C puis récupéré avec une lame qui varie selon les traitements ultérieurs (lame chargé, lame coaté avec du poly-L-Lysine, lame coaté au glycérol, lame non traitée, ...).
- ▶ La lame est mise à sécher dans une étuve à 38°C pendant 12h.



Lames de coupes de tube digestif de *Dicentrarchus labrax* séchant dans une étuve à 38 °C. Elles sont notés au crayon à papier pour supporter les étapes suivantes.



Coloration

- ▶ **But** : Les colorations réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour pouvoir reconnaître différents éléments du tissu :
 - ▶ avec ses structures, coloration topologique :
 - ▶ Coloration bichrome hématoxiline-éosine, hémalun-éosine
 - ▶ Coloration trichrome de Masson
 - ▶ Coloration Pentachrome de Movat
 - ▶ avec la mise en évidence de structures spécifiques, coloration spécifique
 - ▶ Coloration PAS-AB

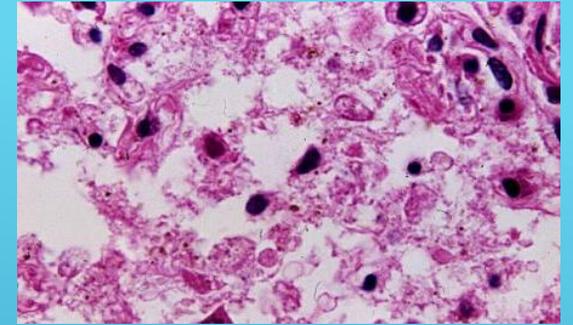


Automate de coloration MYREVA SS30 à utiliser sous une Sorbonne allumée.



Coloration : hématoxiline-éosine

- ▶ Coloration histologique topographique qui, en différenciant le noyau du cytoplasme, donne une vue d'ensemble d'un tissu
 - ▶ **L'hématoxyline** est un colorant basique, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement. Il colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques.
 - ▶ A contrario, **l'éosine** est un colorant acide, qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophilie



Hématoxyline- éosine
coloration du poumon
infecté par la peste Y. pestis



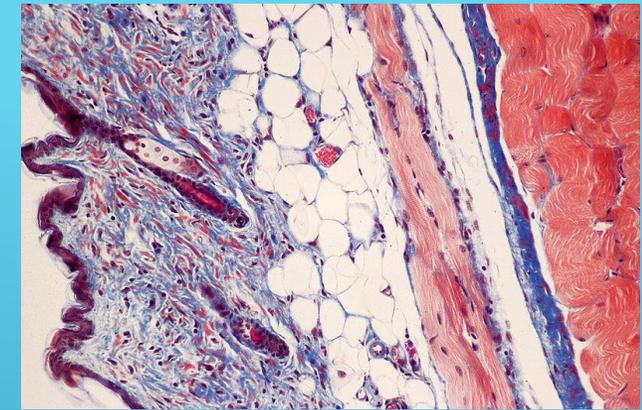
Coloration : hémalun-éosine

- ▶ Coloration histologique topographique qui, en différenciant le noyau du cytoplasme, donne une vue d'ensemble d'un tissu
 - ▶ un colorant nucléaire « basique » **hémateïne** (bleu)
 - ▶ un colorant cytoplasmique « acide » **éosine** (rose)



Coloration : trichrome de Masson

- ▶ Coloration histologique topographique qui associe **l'hématoxyline** (coloration nucléaire), la **fuchsine-Ponceau** (coloration cytoplasmique) et le **vert lumière** ou le bleu d'aniline (coloration sélective du collagène)
- ▶ La différenciation des fibres de collagène est basée sur leur perméabilité. Lors de l'incubation des coupes dans **l'acide phosphomolybdique**, les cellules les moins perméables vont rester colorer en rouge (pas d'accès possible par l'acide) alors que les fibres de collagène va se décolorer, laissant possible la fixation par le vert lumière.



Mouse skin stained with Masson's trichrome stain.
Wikipedia



Coloration : Pentachrome de Movat

- ▶ Coloration histologique topographique aussi appelée coloration de Russel-Movat modifiée. Sa grande capacité de différenciation permet de détecter les plus subtiles variations que l'on ne pourrait pas voir avec des colorations classiques (proportion entre les différents types de fibres, morphologie de structures complexes, ...).
- ▶ Le **bleu alcian** adhère aux macromolécules chargées négativement et colore les mucines en bleu
- ▶ **L'hématoxyline et le reactif de Ferri** colorent les noyaux chargé positivement
- ▶ Le **Nitrate de Fer** colore les fibres élastiques qui sont fortement acides (noir)
- ▶ Le **Thiosulfate de sodium** élimine les résidus de nitrates de Fer
- ▶ La **Fuchsine de Biebrich-Scarlet** colore en rouge les muscles, les fibrines et le cytoplasme
- ▶ L'**acide phosphotungstique** décolore les composés les plus perméables dont le cytoplasme, décolore le collagène en jaune et les fibres réticulaires
- ▶ L'**Orange G** composé azoïque se lie aux fibres cellulosiques et colore en rouge-rose



Coloration : PAS-AB

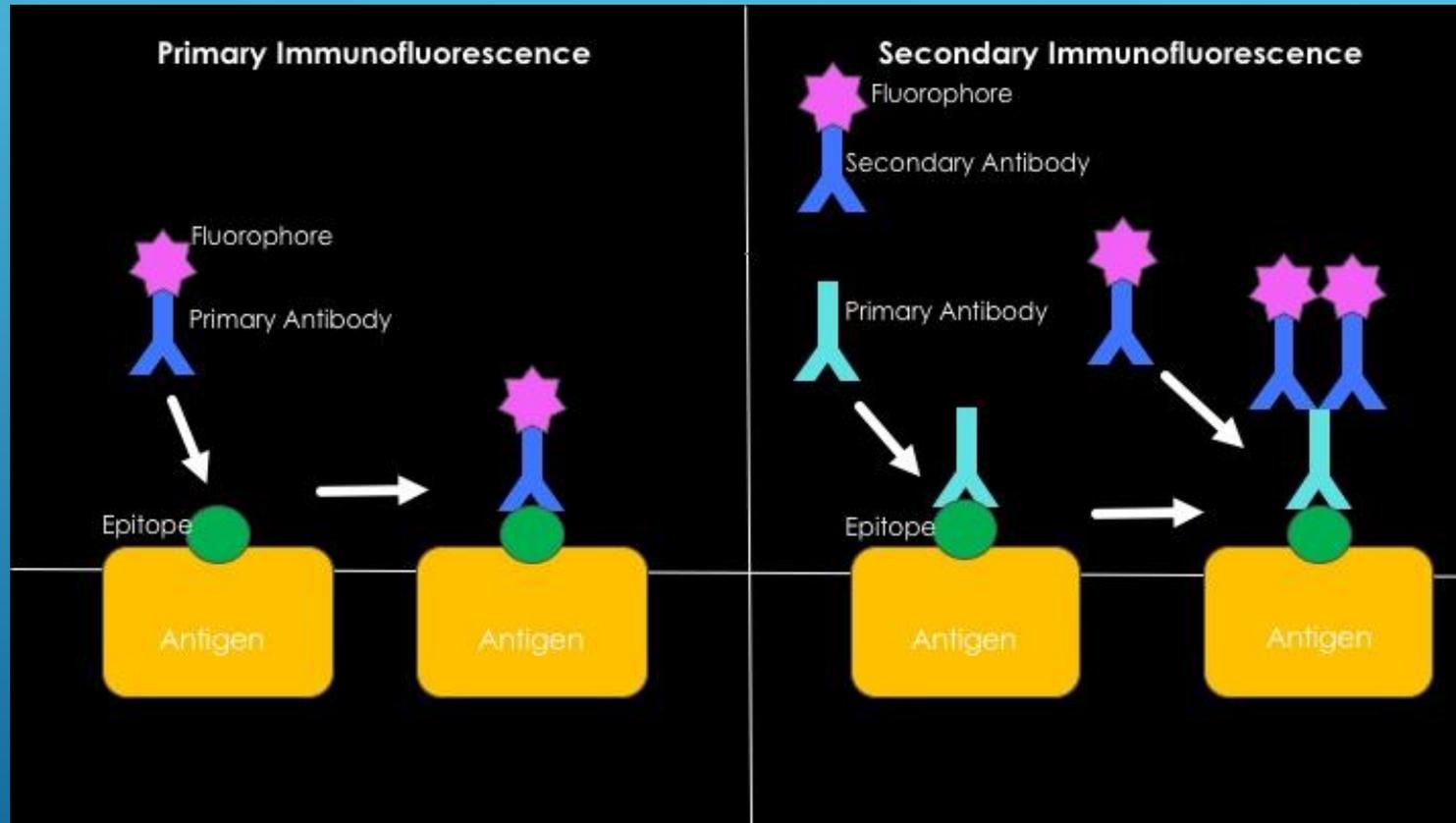
- ▶ Periodic Acid Schiff – Reaction et Bleu Alcian (pH 2,5)
- ▶ La coloration PAS met en évidence les mucines, les membranes basales, le glycogène.
 - ▶ Le **bleu alcian** adhère aux macromolécules chargées négativement et colore les mucines en bleu et en rose selon leur pH (acide en bleu)
 - ▶ **l'acide périodique** permet le **mordançage** soit la préparation de l'échantillon à la coloration suivante
 - ▶ **L'acide périodique** de Schiff permet l'oxydation de certains polysaccharides donnant une coloration rouge
 - ▶ **L'hématoxyline** colore les noyaux en rose foncé et les mucines (neutre en rose)



Tube digestif de *D. labrax* après coloration au PAS-AB

¥ Marquage ImmunoFluorescent

- ▶ Le marquage immunofluorescent a été abordé uniquement théoriquement durant mon stage



[Principe de l'Immunofluorescence, wikipedia](#)

Observations au microscope



<https://www.leica-microsystems.com/products/light-microscopes/p/leica-dm6-b/>



Analyse des données

- ▶ L'analyse des données n'a pas été abordé durant mon stage (manque de temps)

Sources

IHC world, <http://www.ihcworld.com/>

R. MARTOJA and M. MARTOJA-PIERSON, Initiation aux techniques de l'histologie animale, 1967, éditions MASSON ET C^{ie}.

John D. BANCROFT & Marilyn GAMBLE, Theory and Practice of Histological Techniques, fifth edition, 2002, Elsevier Science, ISBN : 0-443-064-35-0

M. CABE, Techniques histologiques, 1968, éditions MASSON ET C^{ie}.

Patricia Cucchi, HLBE101 Biologie Intégrative Cours Magistral N°4 : Les tissus animaux, 2018.

