UNIVERSITE MOHAMED KHIDER –BISKRA

FACULTE SESNV

DEPARTEMENT SNV

**Travaux Pratiques de l’anatomie pathologique**

**Les Coupes histologiques à la paraffine**

 **Généralités.**

Le microscope photonique ne peut fournir d'images que si la préparation à examiner est suffisamment fine pour se laisser traverser partiellement par la lumière. Dans le cas d'objets épais comme par exemple des tissus animaux ou végétaux, il est nécessaire de pratiquer des coupes en leur sein pour les rendre suffisamment transparents. L'épaisseur de ces coupes se situe aux alentours de 4 µ.

**Matériel.**

* MATERIEL
	+ Microscope.
	+ Microtome
	+ Cuves à coloration
	+ Lames dégraissées.
	+ Pinces à lames et lamelles
	+ Pissette d'eau neutre.
	+ Plateau inox
	+ Trousse de dissection
	+ Autoclave
* PRODUITS DIVERS
	+ Eau
	+ Formol
	+ Paraffine
	+ Alcool
	+ Toluène ou Xylène

**Protocole.**

1. **FIXATION.**
	* La fixation doit être réalisée le plus tôt possible et le plus rapidement possible.
	* Le choix du fixateur dépend de la nature du sujet à couper.
	* L'épaisseur de la pièce à fixer doit permettre l'action rapide du fixateur.
	* La durée d'action du fixateur est proportionnelle à la taille de la pièce.
	* La quantité du fixateur utilisée doit être proportionnée à la taille de la pièce.
	* Un colorant peut être incorporé au fixateur de manière à rendre plus visible la pièce au sein du bloc de paraffine.
2. **DÉSHYDRATATION.**
	* La paraffine n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine.
	* La paraffine n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation.
	* On procède donc à une **double substitution**.
		+ On remplace l'eau par de l'alcool (**DÉSHYDRATATION**)
		+ On remplace l'alcool par le toluène (**SUBSTITUTION**)
	* **DÉSHYDRATATION** 5 mn par bains
		+ Alcool 70°
		+ Alcool 90°
		+ Alcool Absolu. (Totalement anhydre)
	* **SUBSTITUTION** 5mn par bain
		+ 1/3 Toluène + 2/3 alcool premier bain
		+ 2/3Toluène + 1/3 alcool deuxième bain
		+ Toluène pur
3. **INCLUSION.**
	* L'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool).
	* Il existe différentes qualités de paraffines qui se différencient par leur point de fusion.
	* Régler la température du bain de paraffine en fonction de ce point de fusion (45-70°)
	* La durée de l'inclusion dépend de la taille de la pièce.
	* L'inclusion se fera dans des moules permettant la confection de blocs qui se montent ensuite sur le microtome.
4. **RÉALISATION DES COUPES.**
	* Monter le bloc dans le porte-bloc du microtome.
	* Régler le couteau de manière à dresser une face de coupe nette. (Coupes épaisses)
	* Régler l'épaisseur de coupe définitive.(3-5 µ)
	* Procéder à la confection du ruban de coupes.
5. **CONFECTiON DES LAMES.**
	* **ÉTALEMENT**
		+ Étaler en déplissant la coupe sur la lame côté brillant sur le verre en présence d'ovo-albumine..
		+ Ou bien déplisser la coupe par flottaison à la surface d'un bain chaud d'ovo-albumine puis la poser sur la lame.
	* **COLLAGE et SÉCHAGE**
		+ Le collage se fait par chauffage de la lame sur une platine chauffante.
		+ 10 mn sur une platine à 55°
		+ Égouttage de la lame
		+ 10 mn sur une platine à 65°
6. **DEPARAFFINATION.**
	* Première méthode
		+ Premier bain dans le toluène 5 mn
		+ Deuxième bain dans le toluène 5 mn
	* Deuxième méthode
7. **REHYDRATATION.** 5 mn par bain
	* Premier bain dans l'alcool à 95°
	* Deuxième bain dans l'alcool à 95 °
	* Premier bain dans l'alcool à 80 °
	* Deuxième bain dans l'alcool à 80 °

 Bain dans l'eau .