

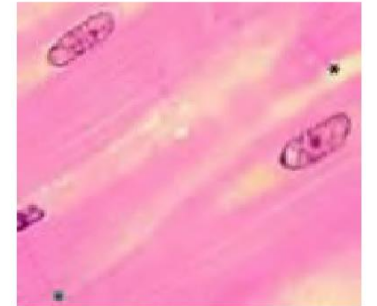
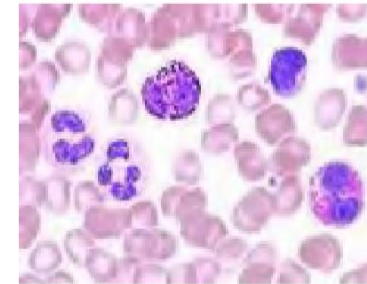
Technique histologique

coupe histologique

But la préparation d'une coupe histologique

- permet l'étude des tissus en y apportant aussi peu de changement que possible.
- Elle consiste à confectionner des coupes, c'est-à-dire des tranches très fines d'organes ou de tissus destinés à être observés par transparence

Analyse des coupes au M.



Etude structurale des tissus et des cellules

Objectif :

- Citer les étapes préparatoires d'un échantillon en vue d'une observation au microscope (la technique histologique).
 - Prélèvement de l'organe à étudié : sacrifices et dissection

Les étapes de la technique histologique:

1. Fixation chimique : conserver les structures cellulaires tel quelles étaient à l'état du vivant .
2. Déshydratation : enlever l'eau intracellulaire .
3. Inclusion : imprégner le tissu dans la paraffine
4. Microtomie : obtenir des coupes de l'ordre de 2- 10µm
5. Coloration chimique : augmenter les contrastes naturels faibles (images colorées)

**Étape primaire :
Prélèvement de l'organe à étudié : sacrifices et dissection**

Prélèvement des organes



dissection de l'animal

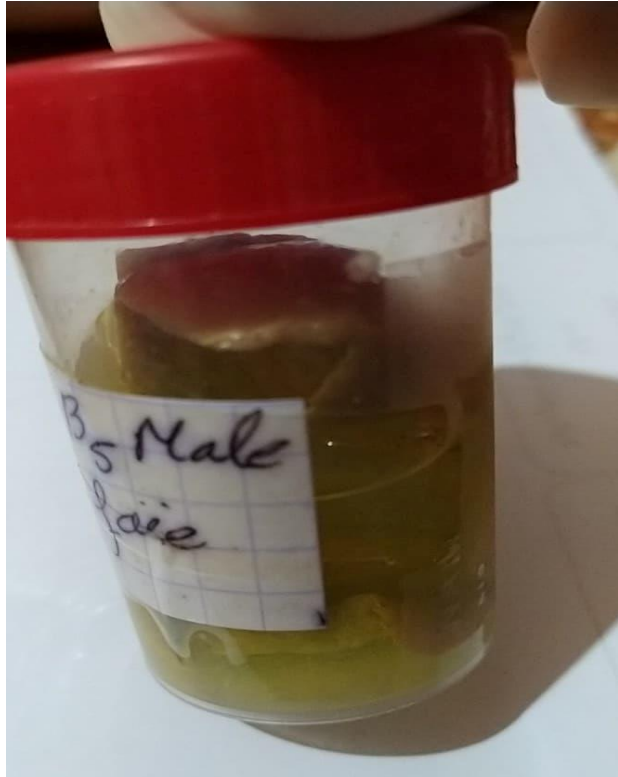


Technique histologique

coupe histologique

1. Fixation

But de La fixation la conservation des structures et le durcissement des pièces.



- Mettre la pièce dans un bain de formol à 10% entre 24h et 48h.

La durée

- Il faut que le bain représente 10 fois la masse de la pièce à fixer.

La volume de solvant

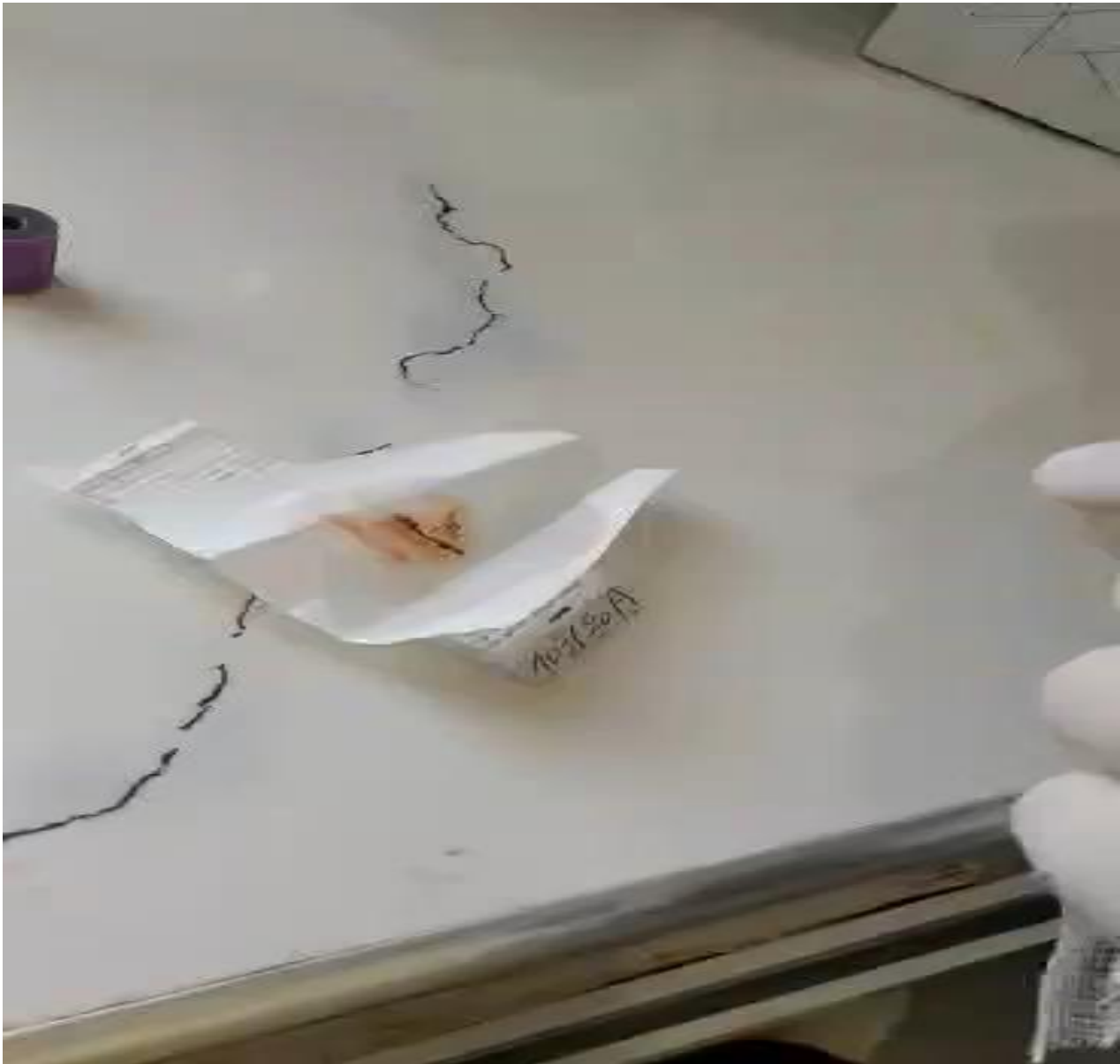
- Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement.

Conservation

➤ Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le **formol** ou le **liquide de Bouin**.

Attention

➤ La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements: de quelques heures pour un petit fragment (biopsie) à plusieurs semaines pour un cerveau humain entier



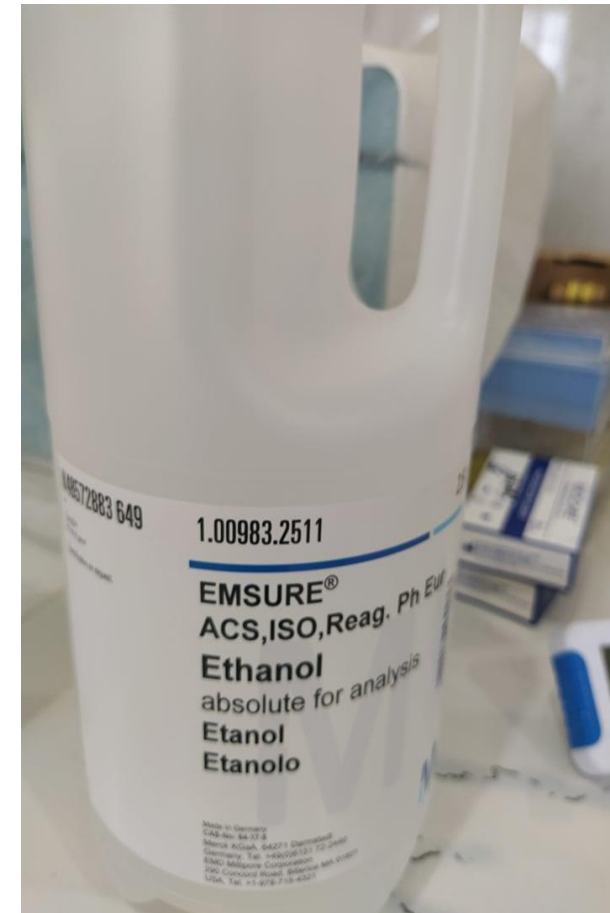
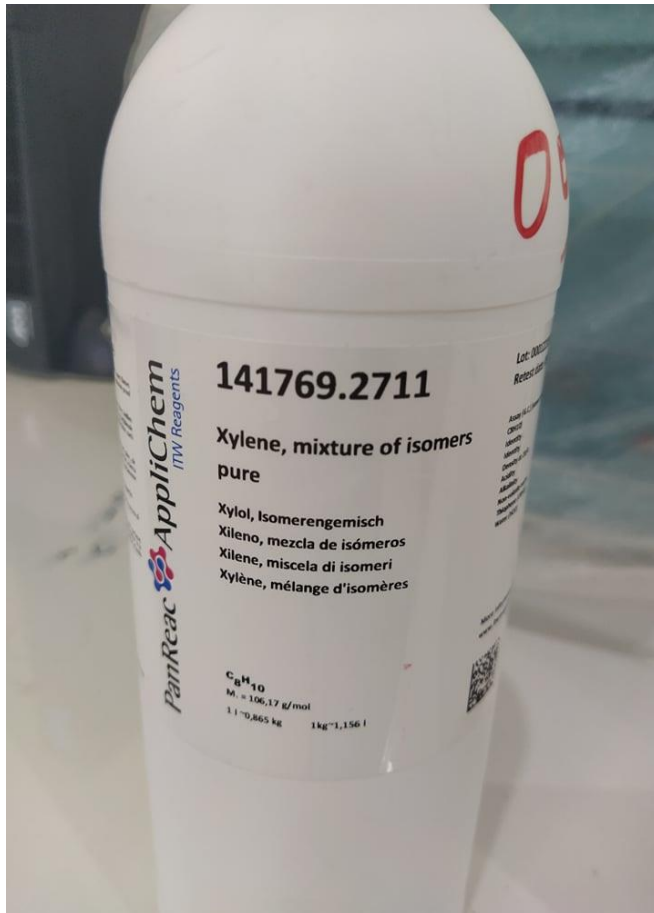
Préparation des cassettes :

- **Prélèvement de fragment** de l'organe.
- Le **positionner** dans la cassette que l'on ferme
- **Attention** à la coupe du fragment: Il y a un **sens** pour l'organe.

2. Déshydratation

But : puisque la paraffine est hydrophobe, il faut d'abord que les cellules subir une déshydratation pour permettre l'entrée de la paraffine

Matériels chimiques utilisé = Alcool (70°, 90°, 100°) + Xylène



Processeur automatique de tissus



Automate de déshydratation (Leica)

(Photo prise au service d'Anatomie pathologique, CHU)



Bains

Déshydratation

- Mettre dans des bains successifs d'alcools de concentration croissante pour déshydrater l'organe



 Grossing

1. Mettre dans des bains successifs d'alcools de concentration croissante (70°, 90° et 100°) pour déshydrater l'organe

Alcool	70°	85°	90°	100°
Temps	10 min	30 min	45 min	1h30

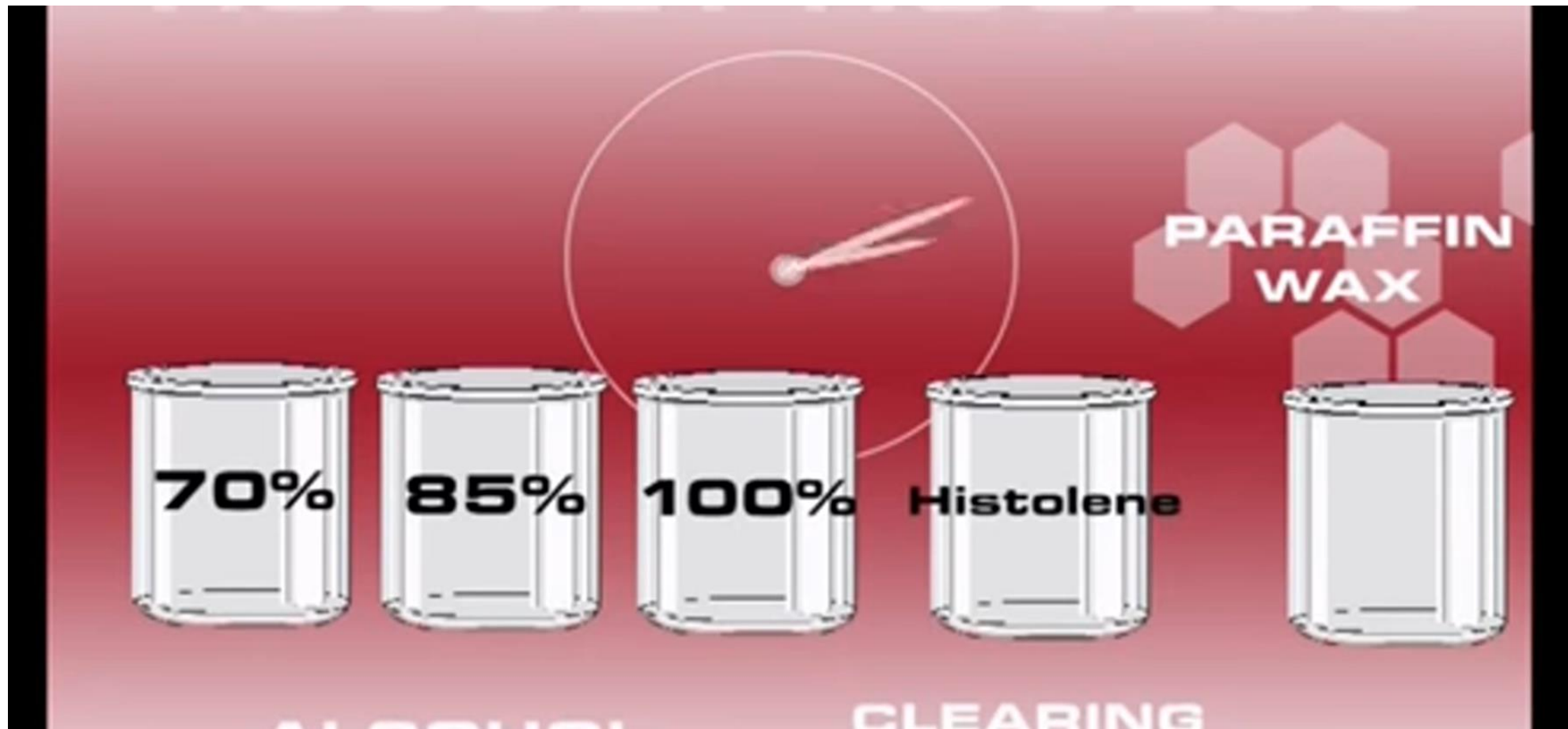
2. Ensuite mettre dans 3 bains successifs de **safsolvent** de concentration identique pour laver l'organe alcool pur (100°).

safsolvent	15 min	30 min	45 min
-------------------	--------	--------	--------

3. Mettre dans un bain moitié xylène et moitié alcool, qui est miscible à la paraffine, pour laver l'organe.

Etape 4 Inclusion (enrobage)

- Placer l'échantillon dans 2 bains de la paraffine liquide à 56°



Etape 5

Mise en bloc



L' inclusion

Centre d'incorporation de paraffine histologique machine à système de refroidissement



Fonctionnalités:

1. d'ordinateur entièrement programmable démarrage et arrêt automatique du système à tout moment dans une semaine
 - température prééglée sont automatiquement stockés
2. Chambre de paraffine
3. Distributeur de la paraffine
4. Plaque de Chauffage
5. la plaque : Zones de travail chauffée



cooling center



switch



operating center



display screen

**Distributeur de
la paraffine**

**la plaque :
Zones de travail
chauffée**



Chambre de paraffine
Récipient en cire

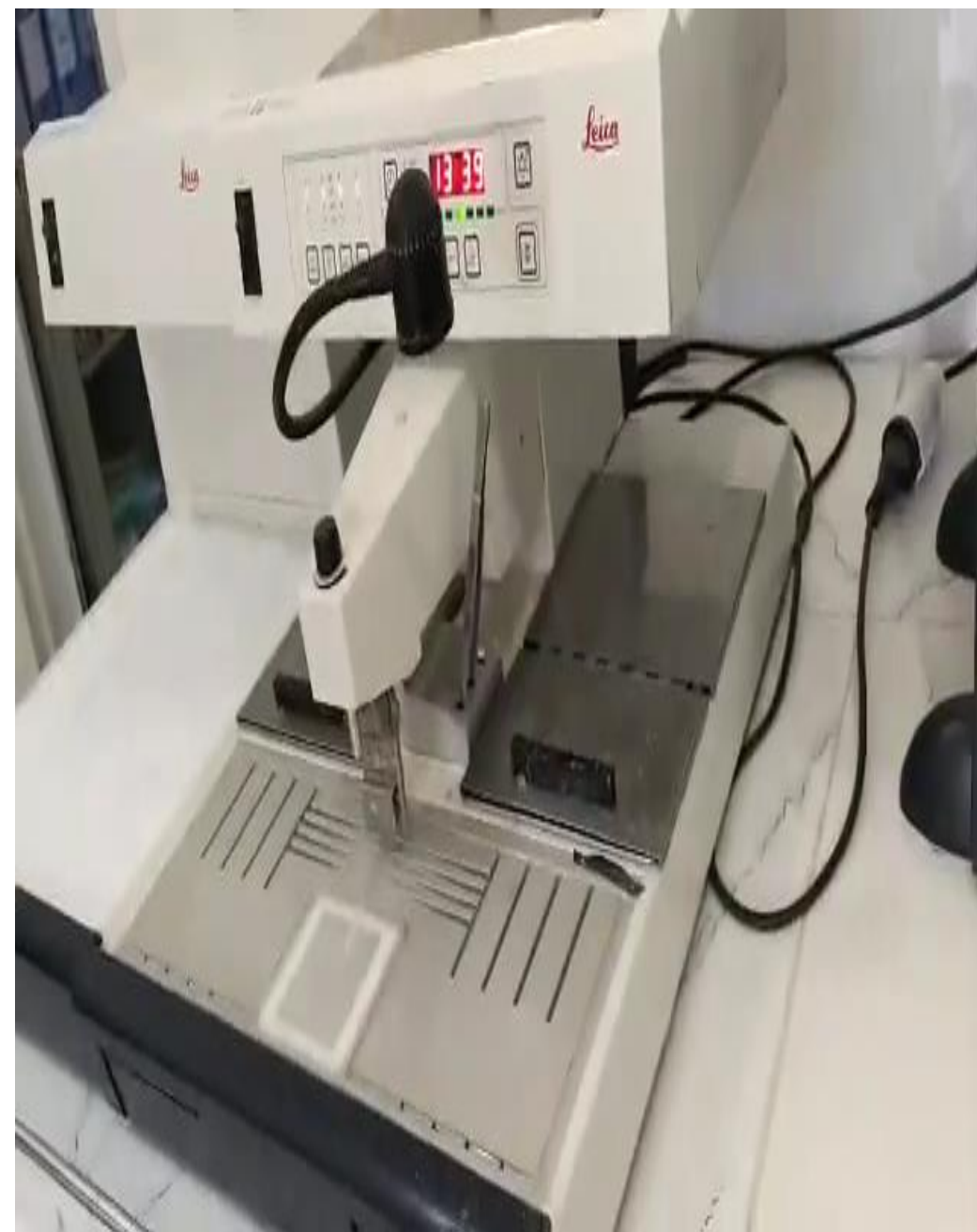
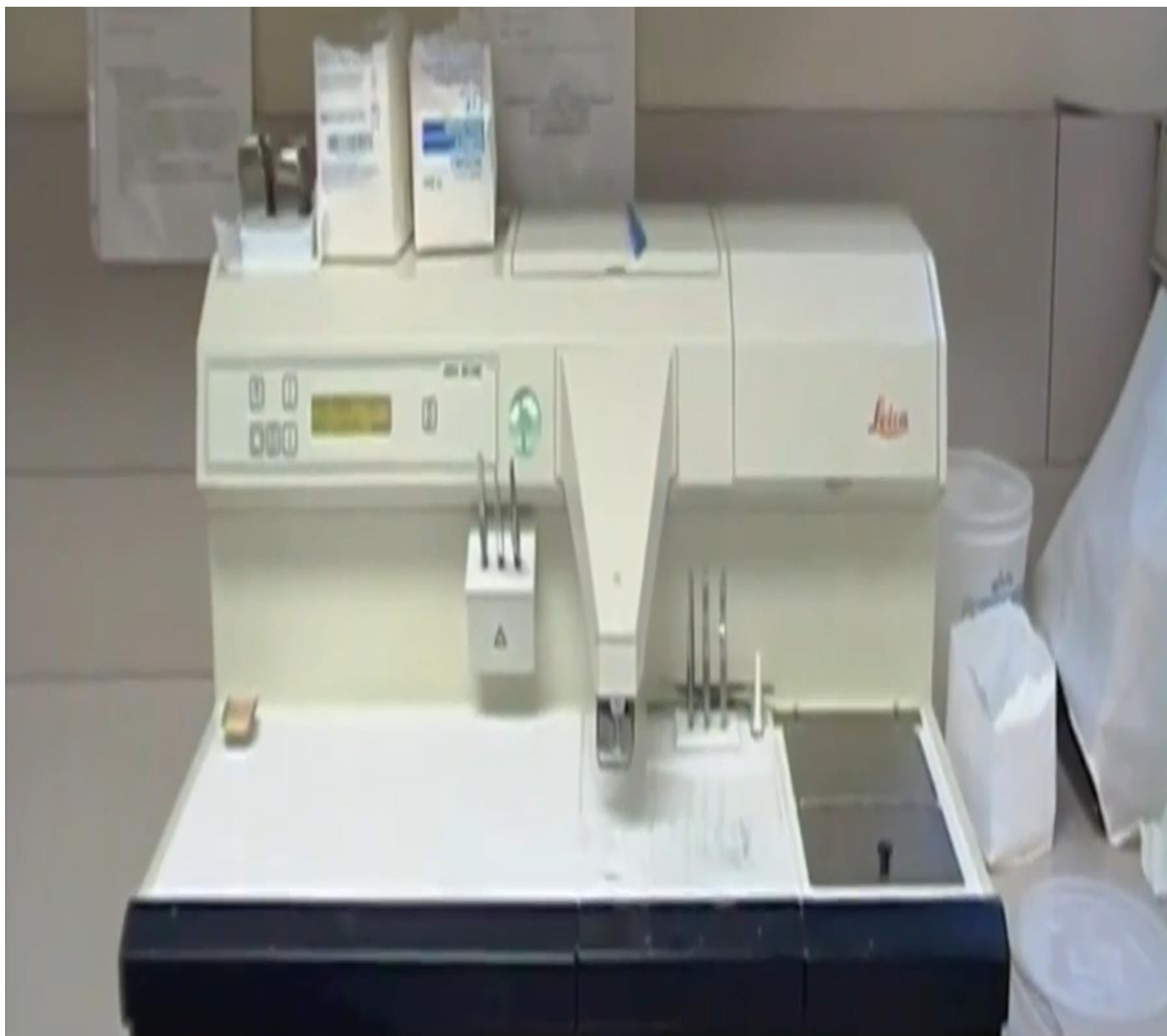


Plaque froide

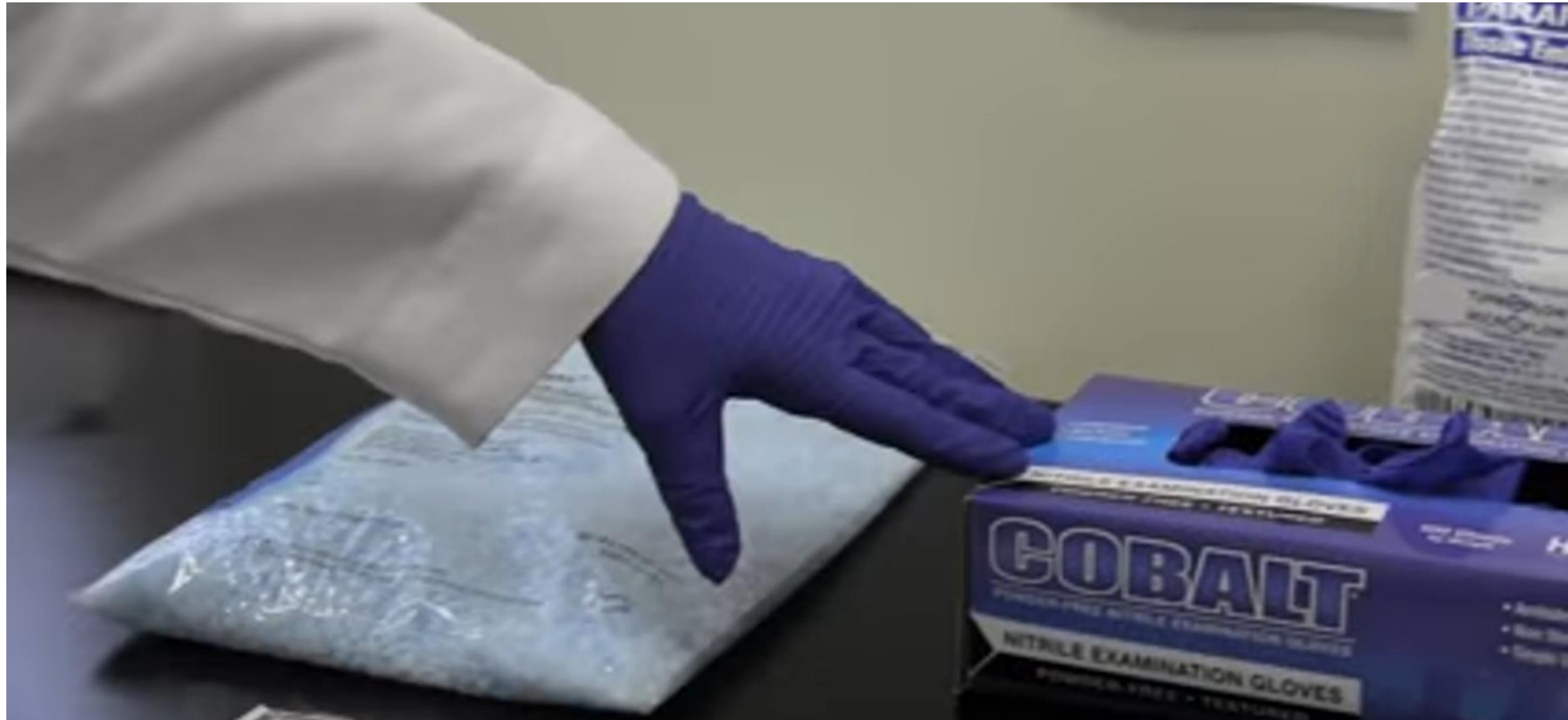


Conteneur des Cassette





Matériels



Mise en bloc

Mettre l'échantillon dans la paraffine liquide à 56°C
à 60 C dans des moules métalliques permettant la
confection de blocs.

échantillon



Cassette



Paraffine

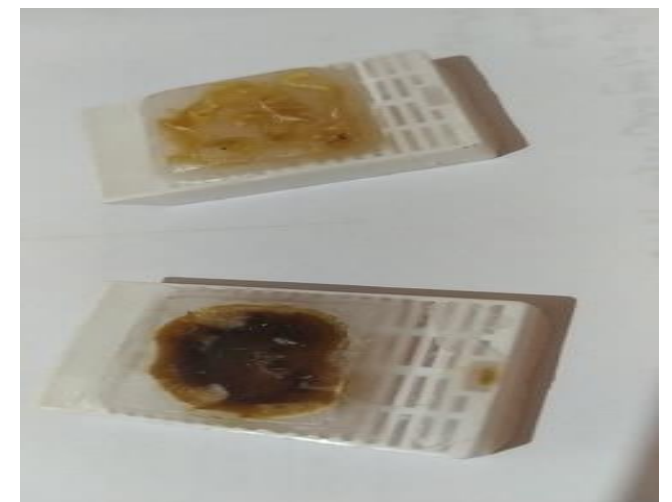


Bloc

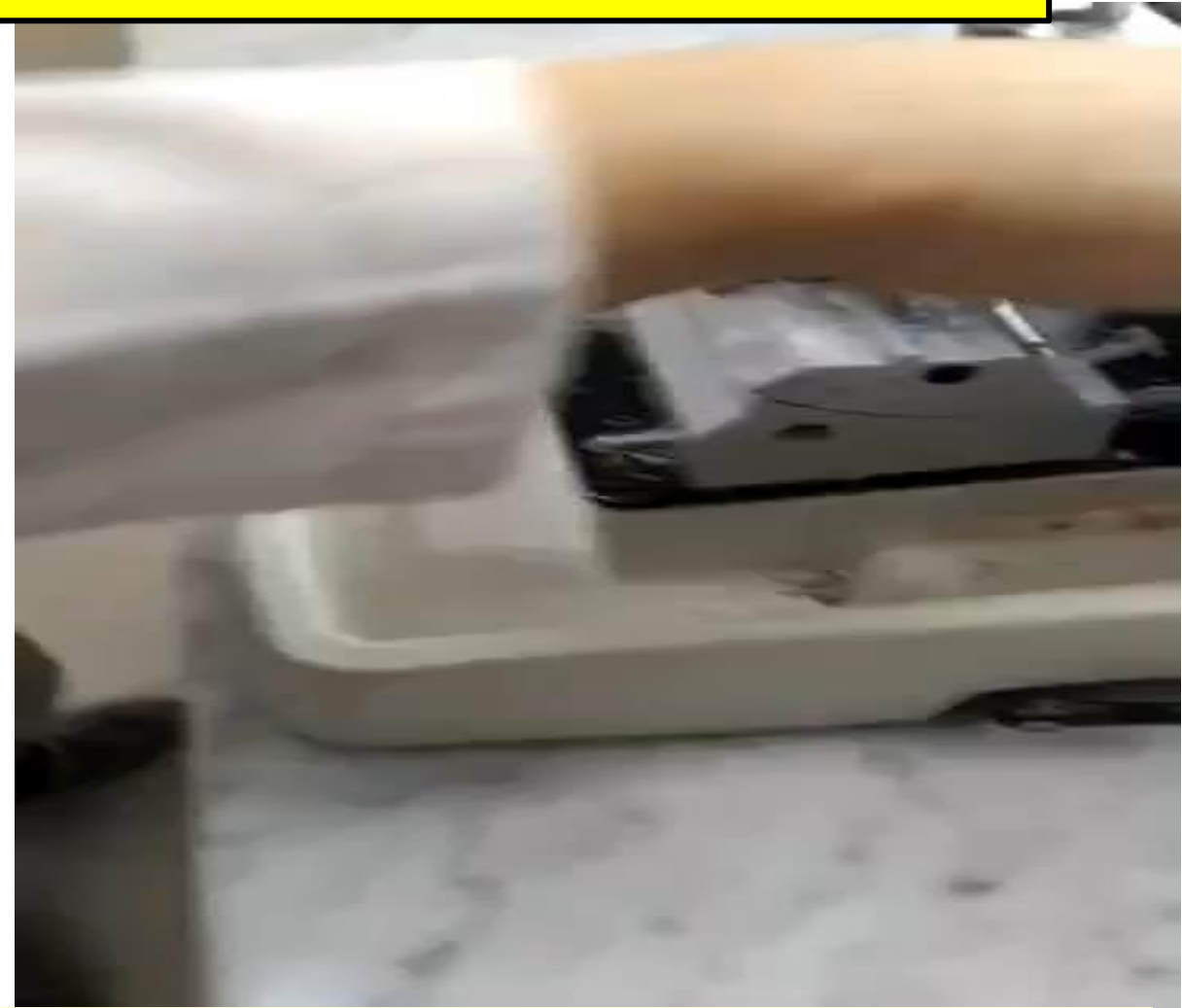
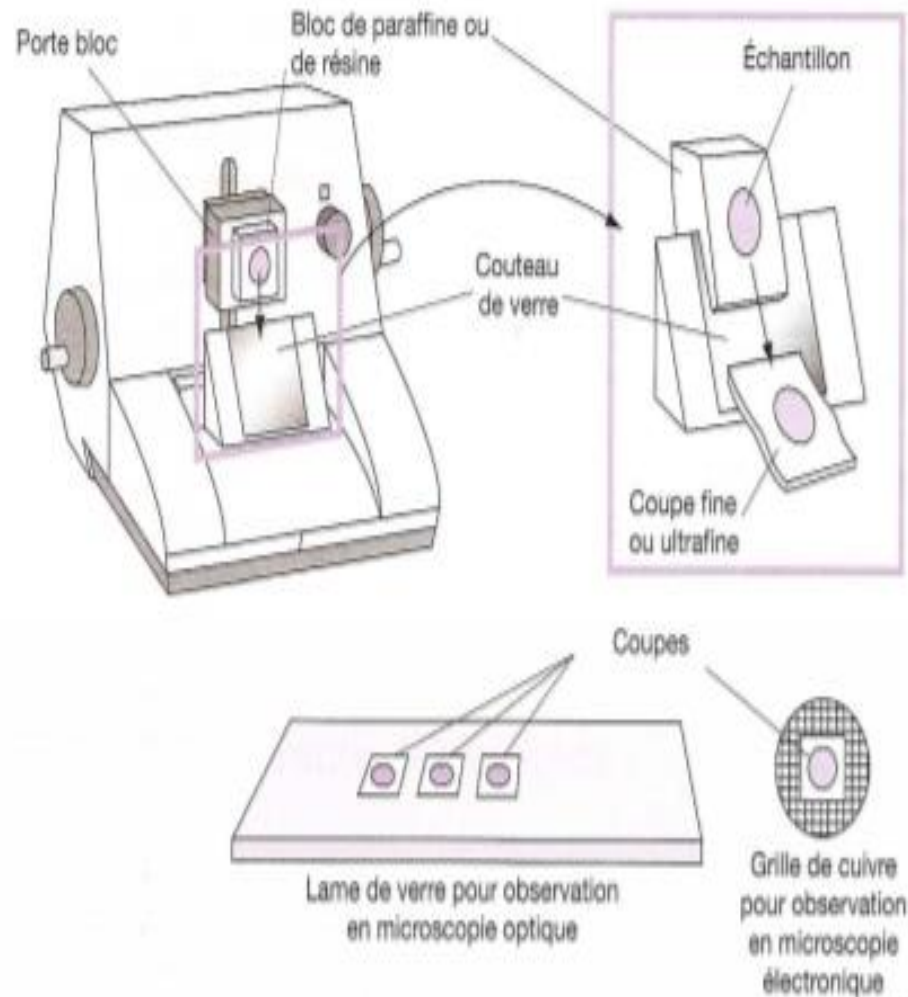
Embedding



- Démoulage



Coupes histologiques (microtomie)



- Régler l'épaisseur des coupes (5 microns).
- Mettre le cliquet et Couper.



Réalisation des rubans

La coupe





**Fixation de la coupe
sur la lame**

+

un bain marie



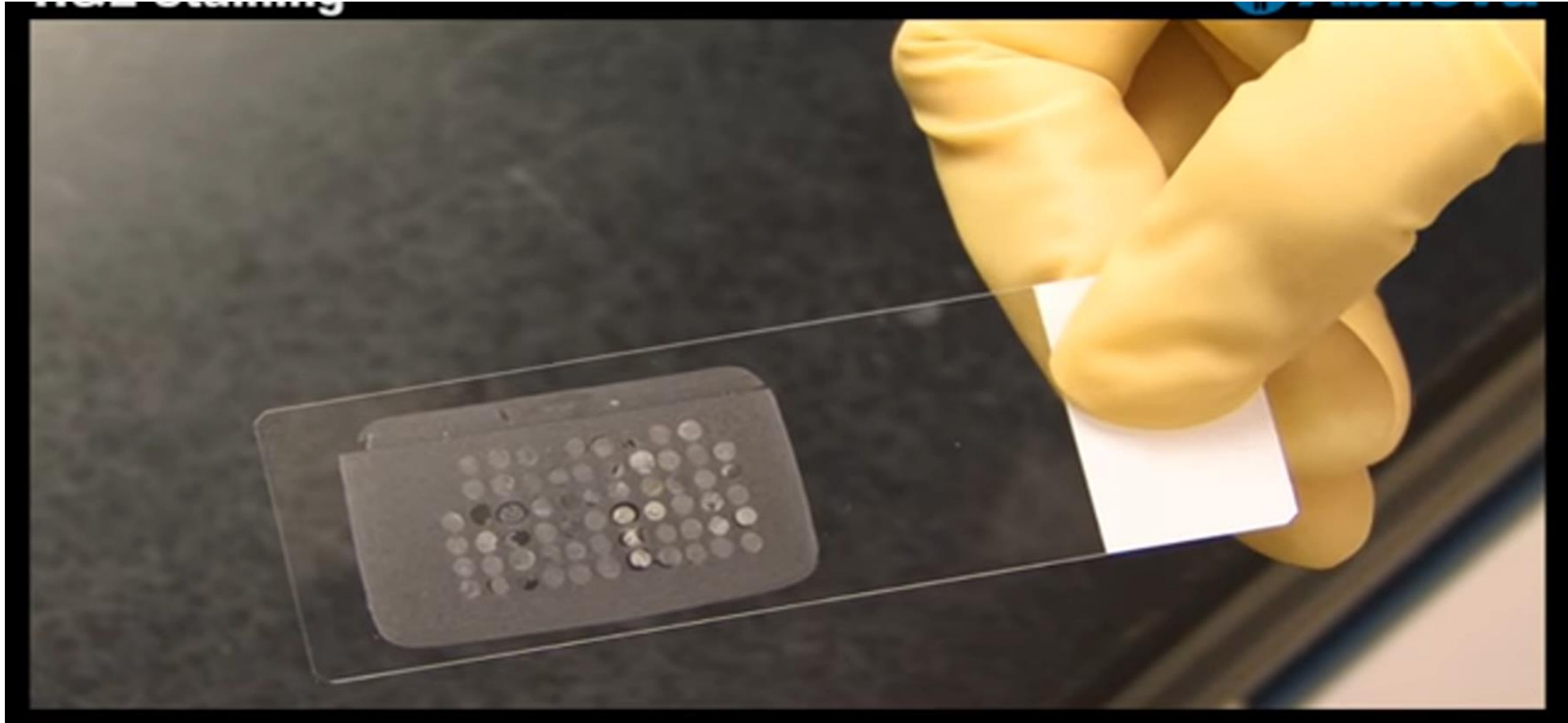


1. Fixation de la coupe sur la lame

- Sur un bain marie maintenant à une température de 50 °C.
- On place la lame au dessous de l'eau et la coupe (sur laquelle on dépose la coupe).
- L'eau permet à la coupe de bien glisser sur la lame.



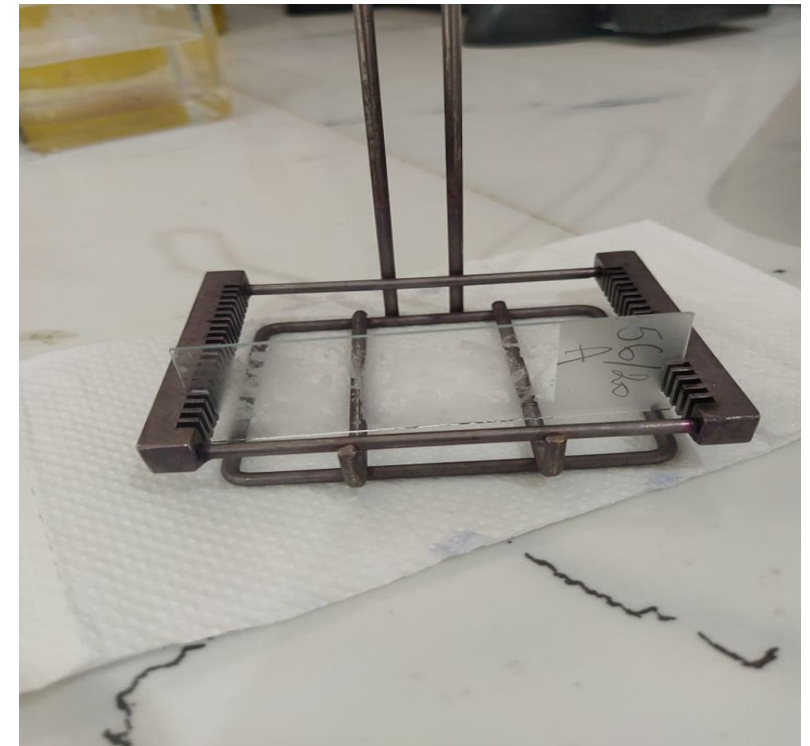
Collage



6. Déparaffinage

L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour réaliser les coupes): la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de **déparaffinage** et de **réhydratation**.

Matériels chimiques utilisé = Alcool (100°, 90°, 70°) + Eosine



Etape 7 Déparaffinage:

- Déparaffiner les coupes dans un bain de toluène ou xylène afin de dissoudre la paraffine: permettant l'élimination de la paraffine

safsolvent	2 min	2 min
------------	-------	-------

Etape 8 réhydratation :

- Par des alcools de concentration décroissant, de 100 % jusqu'à 70 %
 - un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale.

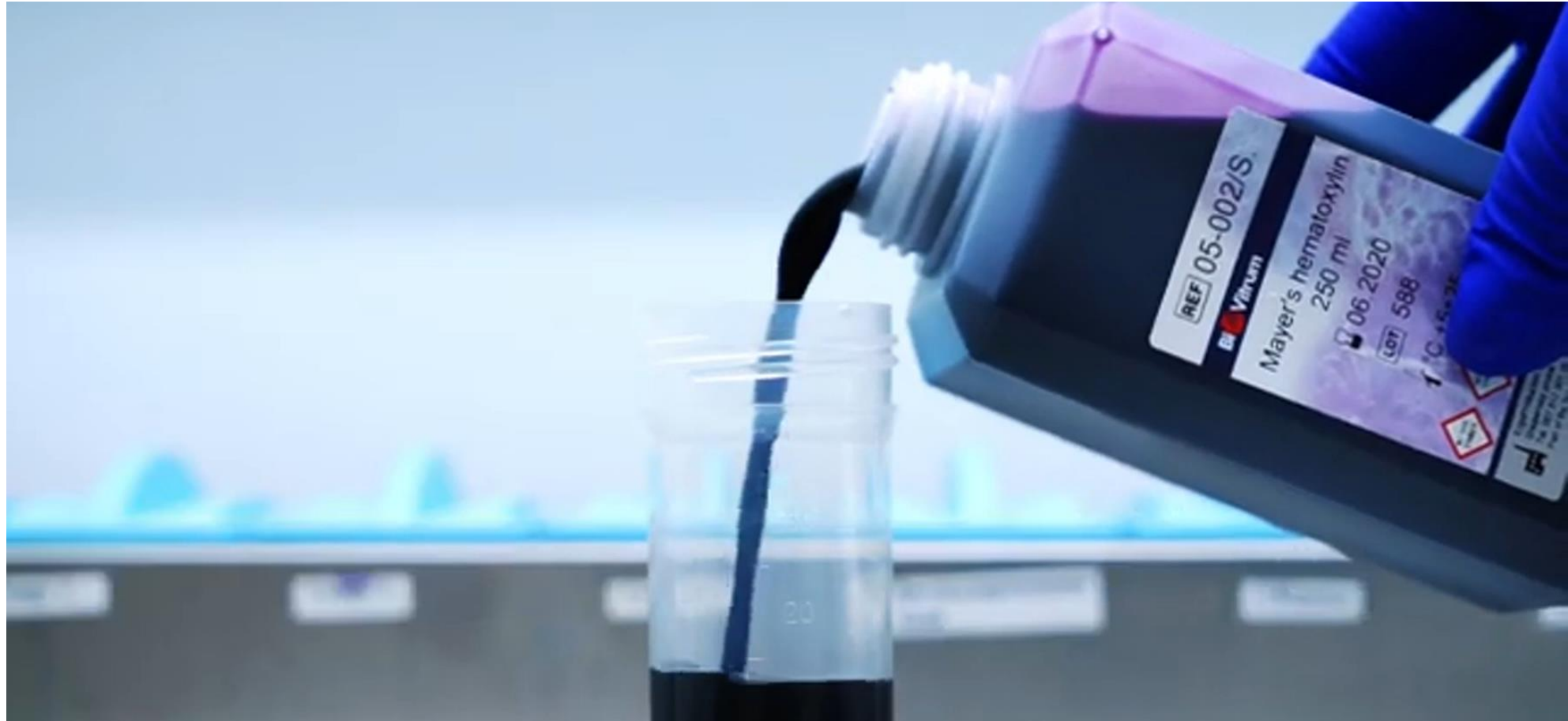
Alcool	100°	80°	50°
Temps	2 min	2 min	2 min

Etape 7 Déparaffinage et Etape 8 réhydratation :



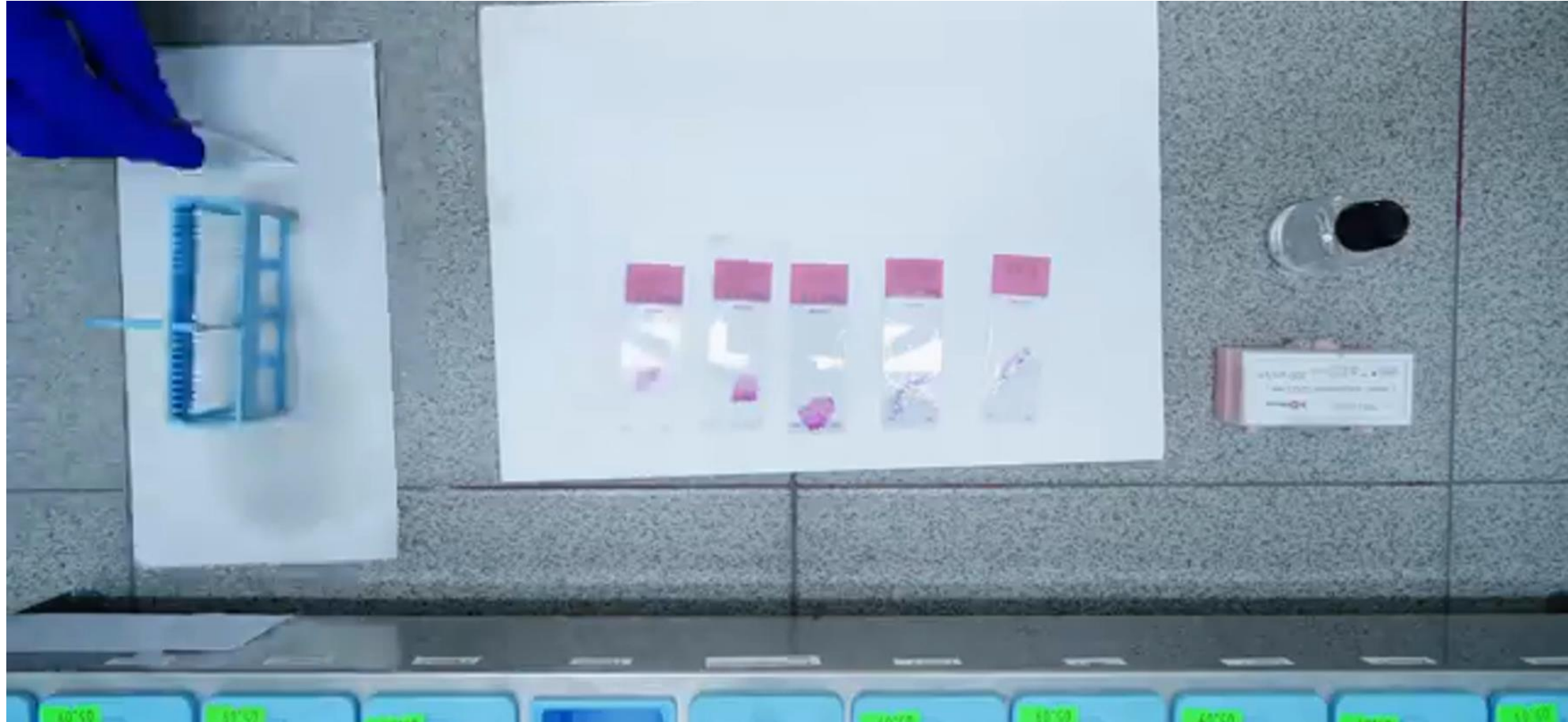
Etape 9

Coloration

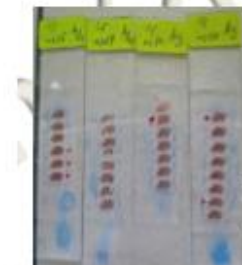
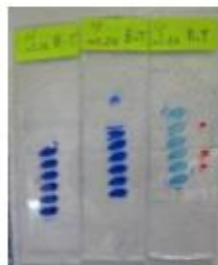
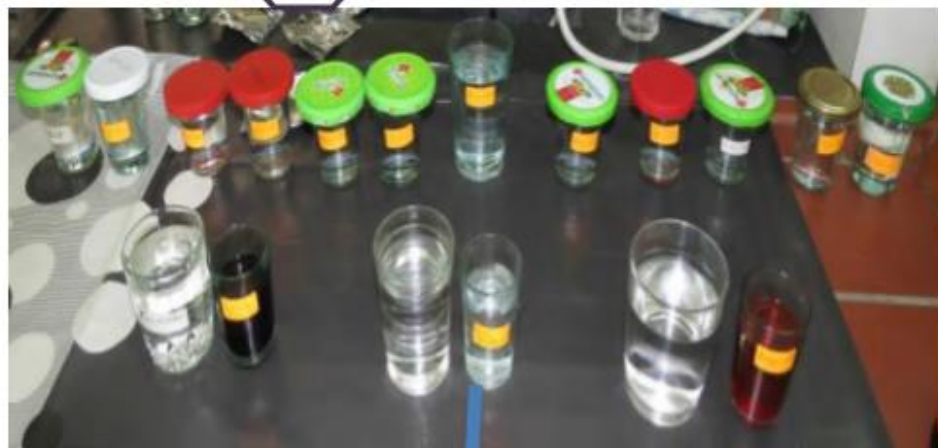


Montage

On place une goutte de E-KIT ou baume de Canada sur la lame, puis on dépose la lamelle que l'on fixe soigneusement avec une pince.



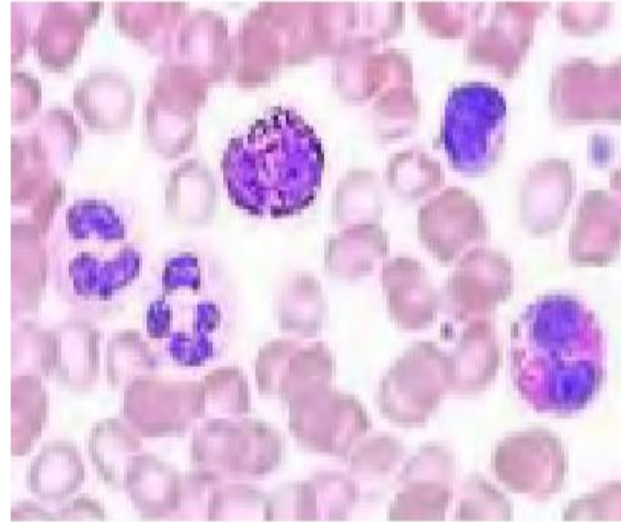
6



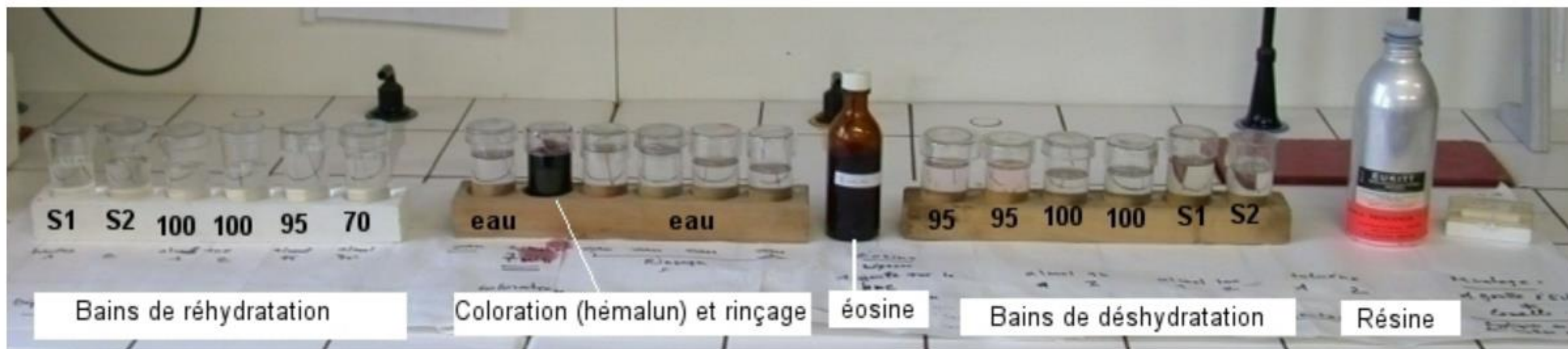
Observation de la préparation
au microscope photonique



Analyse des coupes au M.Ph.



Etude structurale des tissus et des cellules



Bains, colorants et résine de montage

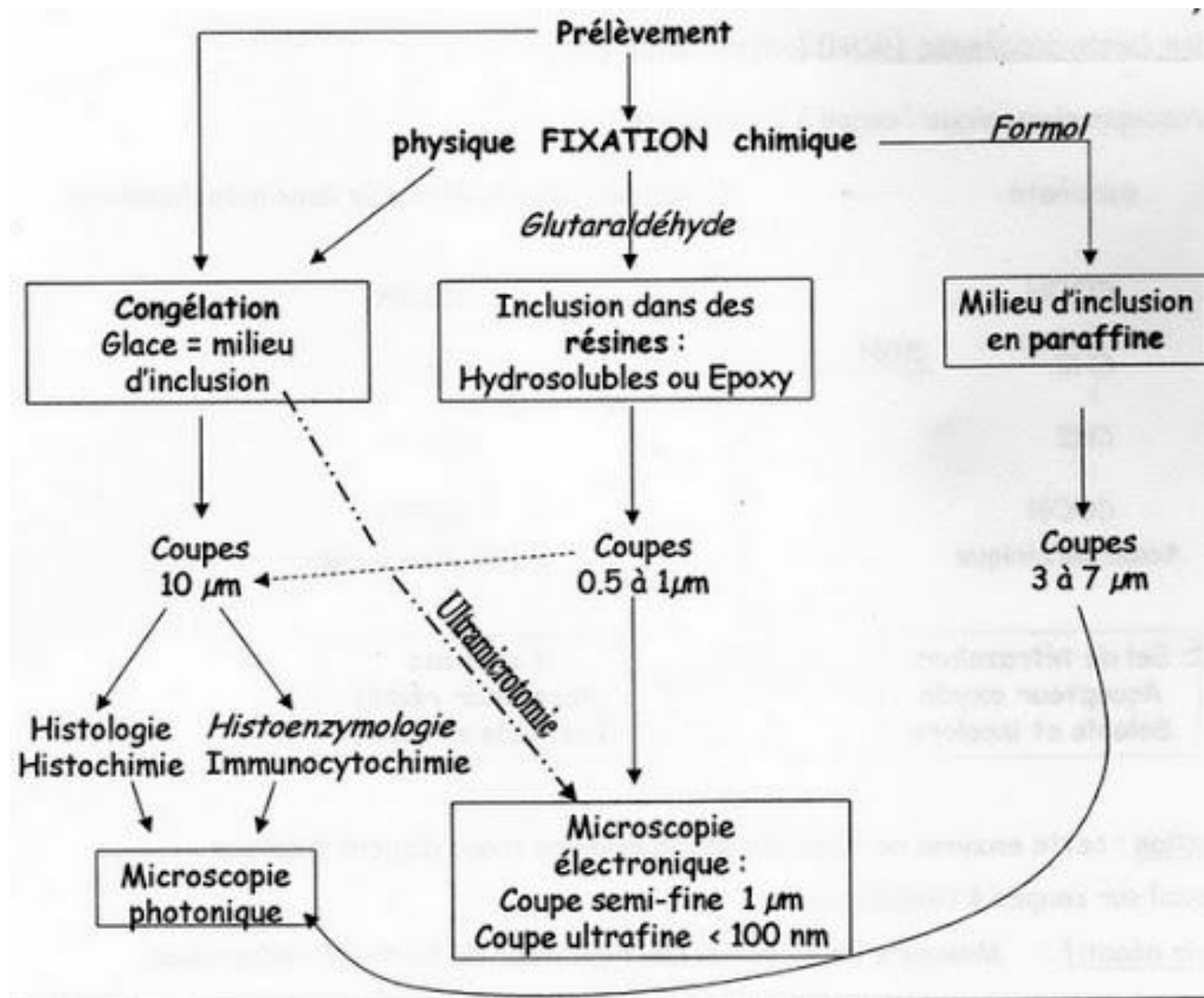
Tableau - Compatibilités des principaux agents fixateurs

	Méthanol	Ethanol	Acétone	Ac. trichloracétique	Ac. picrique	Ac. chloroplatinique	Chlorure mercurique	Trioxyde de chrome	Bichromate de potassium	Ac. acétique	Formaldéhyde	Tétroxyde d'osmium
Méthanol		C	C	C	C	C	C	I	I	C	C	I
Ethanol	C		C	C	C	C	C	I	I	C	C	I
Acétone	C	C		C	C	C	C	I	I	C	C	I
Ac. Trichloracétique	C	C	C		C	C	C	C	C	C	C	C
Ac. Picrique	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C	C
Ac. Chloroplatinique	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C	C
Chlorure mercurique	C	C	C	C	C	C		C	C	C	C	C
Trioxyde de chrome	I	I	I	C	C	C	C		C	C	PC	C
Bichromate de potassium	I	I	I	C	C	C	C	C		C	PC	C
Ac. Acétique	C	C	C	C	C	C	C	C	C		C	C
Formaldéhyde	C	C	C	C	C	C	C	PC	PC	C		I
Tétroxyde d'osmium	I	I	I	C	C	C	C	C	C	C	I	

(Baker, 1958 et GABE, Techniques histologiques. NASSON.1968)

C=compatibilité chimique ; I=incompatibilité chimique ;

PC=compatibilité partielle (instables, à préparer extemporanément).



Procédé de la technique histologique

