

Histologie et techniques de coloration

Introduction

Au même titre que la cytologie et l'anatomie,

l'histologie est une branche de la morphologie subdivisée en histologie générale et histologie spéciale.

L'histologie générale est l'étude des tissus,

associations de cellules de même type

et parfois de composants extracellulaires

formant les constituants élémentaires des organes.

L'histologie spéciale, encore appelée anatomie microscopique,

étudie l'architecture des organes formés par un ensemble de tissus.

En médecine, l'histologie est l'une des disciplines sur lesquelles

se fonde l'anatomie pathologique (ou histopathologie).

Celle-ci, en effet, étudie à l'œil nu et au microscope les modifications produites

dans les organes et les tissus par des maladies,

en partant des connaissances histologiques sur les tissus sains.

L'histologie est une discipline qui étudie les tissus
sur le plan morphologique et fonctionnel.

Elle a pour but d'établir le lien entre la structure et la fonction.

L'histologie est une science biologique et médicale essentielle.

Elle étudie la structure des organismes vivants et les rapports
structuraux et fonctionnels entre leurs éléments constitutifs.

Elle est l'interface des sciences biologique et médicale

puisque'elle se trouve à la croisée des chemins entre

la biochimie, la biologie moléculaire et la physiologie d'une part

et les processus pathologiques et leurs effets d'autre part.

La connaissance de l'aspect histologique normal des organes
est essentielle pour identifier leur altération par la maladie
et pour comprendre comment des processus biochimiques
et physiologiques anormaux en sont la cause.

L'étude de l'histologie a commencé avec le perfectionnement
des microscopes optiques simples et de techniques de préparation
des coupes minces pouvant être examinées.

De telles études ont conduit **Virchow** a proposé la théorie cellulaire
de la structure des organismes vivants qui faisait de la cellule
le constituant fondamental de la plupart des êtres vivants.

Chaque cellule était considérée comme une unité individuelle
entourée d'une membrane cellulaire et contenant
toute la machinerie nécessaire à sa fonction.

Il a été constitué à l'époque un vocabulaire histologique fondé sur l'étude
des cellules au microscope optique et reposant sur
une compréhension limitée de la physiologie et de la fonction cellulaire.

Les méthodes de recherche modernes ont révolutionné
notre compréhension des cellules.

Les techniques de microscopie électronique, de clonage de cellules en culture,
de séquençage des protéines et de génétique moléculaire ont aussi apporté
une lumière totalement nouvelle sur le fonctionnement des cellules.

Il est actuellement possible de regrouper les cellules
sur la base de leur fonction principale.

Parmi ces cellules, on note:

Les cellules épithéliales, les cellules de soutien,

Les cellules contractiles, les cellules nerveuses,

Les cellules germinales, les cellules sanguines

Les cellules immunologiques et les cellules secrétant des hormones.

Toutefois, il est important de savoir qu'une cellule peut remplir

plusieurs fonctions et appartenir à plus d'une classe cellulaire.

Par exemple:

- * De nombreuses cellules secrétant des hormones sont aussi des cellules de type épithéial, étroitement unies entre elles par des jonctions spécialisées pour constituer **une glande**,
- * De nombreuses cellules immunologiques sont également des cellules sanguines,

* Certaines cellules de soutien sont aussi contractiles.

Les cellules épithéliales sont spécialisées dans l'absorption et la sécrétion; elles peuvent aussi jouer un rôle de barrière.

- Les cellules épithéliales sont étroitement juxtaposées pour constituer des feuillets cohésifs, appelés **EPITHELIUMS**, qui ont pour fonctions principales:
 - Le revêtement des différentes surfaces de l'organisme, comme par exemple **la peau, le tube digestif ou les canaux excréteurs;**

- La constitution d'unités fonctionnelles de glandes sécrétaires comme **les glandes salivaires et le foie**

Les cellules de soutien et leur matrice extracellulaire (qu'elles élaborent) associées sont appelées communément **TISSU CONJONCTIF**

Les cellules de soutien produisent une matrice extracellulaire qui joue un rôle fondamental dans l'organisation spatiale et la stabilité mécanique des tissus.

Les cellules de soutien sont des **fibroblastes**,
des chondroblastes, **des ostéoblastes**,
des myofibroblastes, et **des adipocytes**.

Les **fibroblastes** sécrètent la matrice extracellulaire de la plupart
des tissus de soutien,
tandis que les **chondroblastes** sécrètent celle du cartilage
et les ostéoblastes celle de l'os

Les **myofibroblastes** sécrètent une matrice extracellulaire et possèdent

également une fonction contractile;

Les **adipocytes** sont des cellules de soutien spécialisées dans le stockage des lipides, non seulement

en tant que réserves d'énergie mais aussi dans un but d'amortissement.

Les **cellules contractiles** sont spécialement adaptées
à la production de forces motrices par l'interaction
de deux protéines, **l'actine et la myosine (protéines contractiles)**.

Il existe quatre groupes de cellules contractiles :

Les **cellules musculaires**, les **cellules myoépithéliales**
Les **myofibroblastes** et les **péricytes**.

- **Les cellules musculaires** sont le type principal et constitue le muscle strié, le muscle cardiaque et le muscle lisse
- **Les cellules myoépithéliales** représentent une composante importante de certaines glandes
- **Les myofibroblastes** jouent un rôle contractile en plus de leur capacité à sécréter du collagène.
- **Les péricytes** sont des cellules semblables aux cellules musculaires lisses qui entourent les vaisseaux sanguins

La disposition différente de l'actine et de la myosine

dans chaque type de cellules contractiles ainsi que des adaptations
importantes de structure modulent et contrôlent la contraction.

HISTOLOGIE , HISTOCHIMIE et IMMUNOHISTOCHIMIE

PREAMBULE

Cytologie = étude des cellules.

Histologie = discipline qui étudie la structure fine des tissus. C'est donc l'étude des tissus à l'échelle microscopique

Histo chimie = méthodologies de marquage différentiel de coupes tissulaires (colorants ou autres procédures chimiques) en vue de révéler ces structures fines.

Immunohistochimie =

L'immunohistochimie (IHC) est une technique d'histologie visant

à localiser une protéine donnée dans un tissu,

par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps.

Il est possible de localiser une seule protéine (simple marquage)

ou plusieurs protéines sur une même coupe de tissu (marquage multiple).

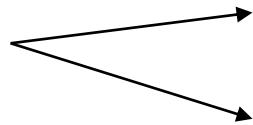
1 - NOTION DE TISSU

Un tissu est un ensemble de cellules disposées en un assemblage identifiable sur des caractéristiques architecturales et topographiques.

Plus précisément :

Un tissu = union de cellules différenciées de façon identique, et pouvant être complétées par l'adjonction de structures spécifiques non cellulaires.

Il est classique de distinguer :



1/ les tissus simples

2/ les tissus composés, ou spécialisés

**1/ Ils correspondent à 4 entités facilement identifiables,
necessaires mais suffisantes,
pour constituer l'ensemble des êtres vivants. Il s'agit :**

**Du tissu épithélial, du tissu conjonctif,
du tissu musculaire et du tissu nerveux**

Ils représentent les grands types tissulaires (histologiques)

2/ L'identification du tissu composé tient donc compte

de sa localisation topographique et de sa spécificité fonctionnelle.

Exemple :

Cortex rénal, rétine visuelle,

Muqueuse intestinale, tube séminifère, etc, ...

Les tissus de l'organisme se développent à partir des **trois feuillets embryonnaires primitifs**

qui s'individualisent au cours de la 3^{ième} semaine de la vie intra-utérine chez l'homme :

Il s'agit de l'ectoblaste primaire (ou épiblaste), de l'endoblaste et du mésoblaste

→ **Chaque feuillet embryonnaire aboutit à des fonctions spécifiques**

Par exemple:

- l'ectoblaste fournit les téguments et le système nerveux.
- L'entoblaste ou endoblaste fournit le tube digestif, l'appareil pulmonaire.
- .- Le mésoblaste fournit les muscles et le squelette, une grande partie de l'appareil génito-urinaire, etc. (liste incomplète).

Ainsi, les trois feuillets donnent naissance à du tissu épithélial.

Le tissu nerveux provient presque exclusivement de l'épiblaste par neurulation.

Les tissus conjonctif et musculaire dérivent presque exclusivement du mésoderme.

Le tissu épithélial est subdivisé en deux groupes principaux :

- **Les épithéliums de surface :**

ils forment un revêtement sur la totalité des surfaces

externes et internes de l'organisme.

- **Les épithéliums glandulaires :**

ils sont constitués par des cellules spécialisées dans les sécrétions
externe et interne.

Le tissu conjonctif :

Il remplit d'importantes fonctions métaboliques et de défense de l'organisme, tandis que le tissu de soutien a surtout un rôle mécanique. (Le sang est considéré comme un tissu conjonctif liquide).

Le tissu musculaire :

Par la contraction de ses cellules ou fibres, il assure la mobilité du corps et des viscères.

Le tissu nerveux :

Hautement différencié, il est responsable de la réception, de la transmission et du traitement de l'information en provenance de l'environnement et/ou de l'organisme lui-même.

LES ÉPITHÉLIUMS DE REVÊTEMENT

Le tissu épithélial de revêtement est formé de cellules

étroitement juxtaposées et jointives recouvrant

l'extérieur du corps et les cavités de l'organisme.

Par définition, ces épithéliums sont des feuillets avasculaires.

L'organisme est entièrement limité par le **revêtement cutané** (peau)

qui constitue une interface entre le monde extérieur et le milieu intérieur.

Cet épithélium de revêtement est l'épiderme.

La cellule épithéliale constitue à la fois une barrière et un lieu d'échanges.

C'est une cellule polarisée avec une répartition particulière des organites,

un pôle apical tourné vers la lumière de la cavité

et **un pôle basal** dirigé vers le tissu conjonctif sous jacent

et reposant sur une lame basale.

Elle possède généralement un noyau unique qui peut être

aplati (dans les cellules pavimenteuses),

sphérique (dans les cellules cubiques)

ou ovale (dans les cellules cylindriques).

le nombre des assises cellulaires

- Epith. Simple
- Epith. Stratifié
- Epith. Pseudostratifié

la forme des cellules de surface

- Pavimenteuses
- Aplaties
- Cubiques
- Prismatiques
- Cylindriques

différenciation des structures apicales

- Cils vibratiles
- Stériocils
- Microvilloosités
- Bordures en brosse
- Accumulation de Kératine dans les cell. épidermiques

Par exemple l'**ENDOTHELIUM** qui forme le revêtement interne du cœur et des vaisseaux est un épithélium pavimenteux.

Classification:

les **E.R** ont une organisation générale qui se prête à une classification morphologique simple,

reposant sur des critères de nombre, de forme et de différenciation

Les critères utilisés pour dresser une classification des épithéliums sont :

nombre des assises cellulaires,

la forme des cellules de surface,

la différenciation de certaines structures apicales.

* Classification en fonction de la forme des cellules

Les cellules pavimenteuses :

Les cellules peuvent être aplatis, plus larges que hautes,

le noyau bombant dans la lumière



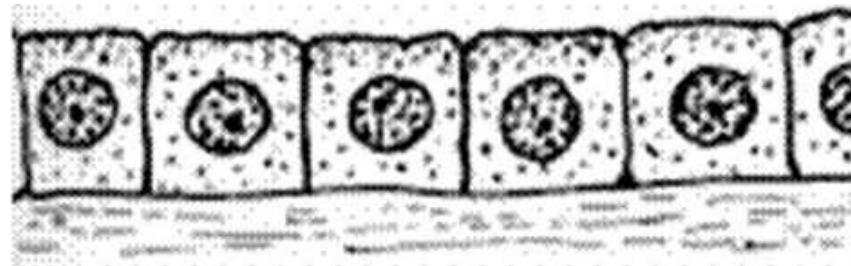
Cellules pavimenteuses

Les cellules cubiques

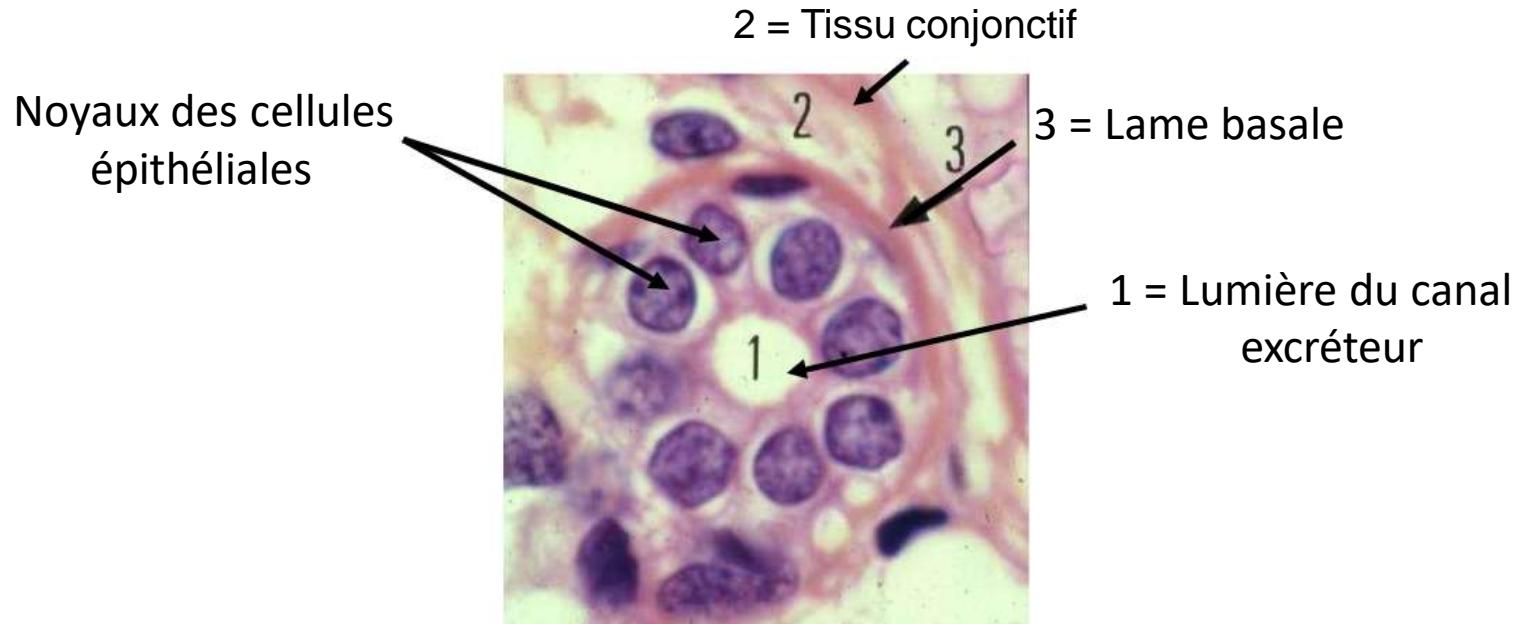
Elles apparaissent en coupe aussi hautes que larges.

Elles ont un aspect quadrangulaire.

Leurs noyaux sont généralement ronds.



Cellules cubiques



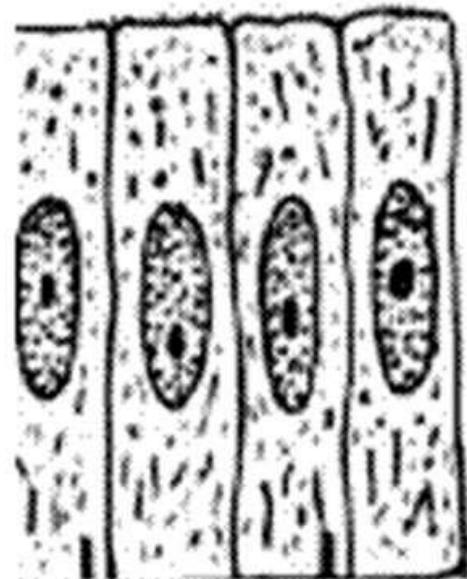
Epithélium cubique simple

- Noyau arrondi, central
- Au niveau des Reins, glandes salivaires, pancréas

Les cellules prismatiques ou cylindriques

Ces cellules apparaissent, en coupe, plus hautes que larges.

Leurs noyaux sont habituellement ovoïdes.



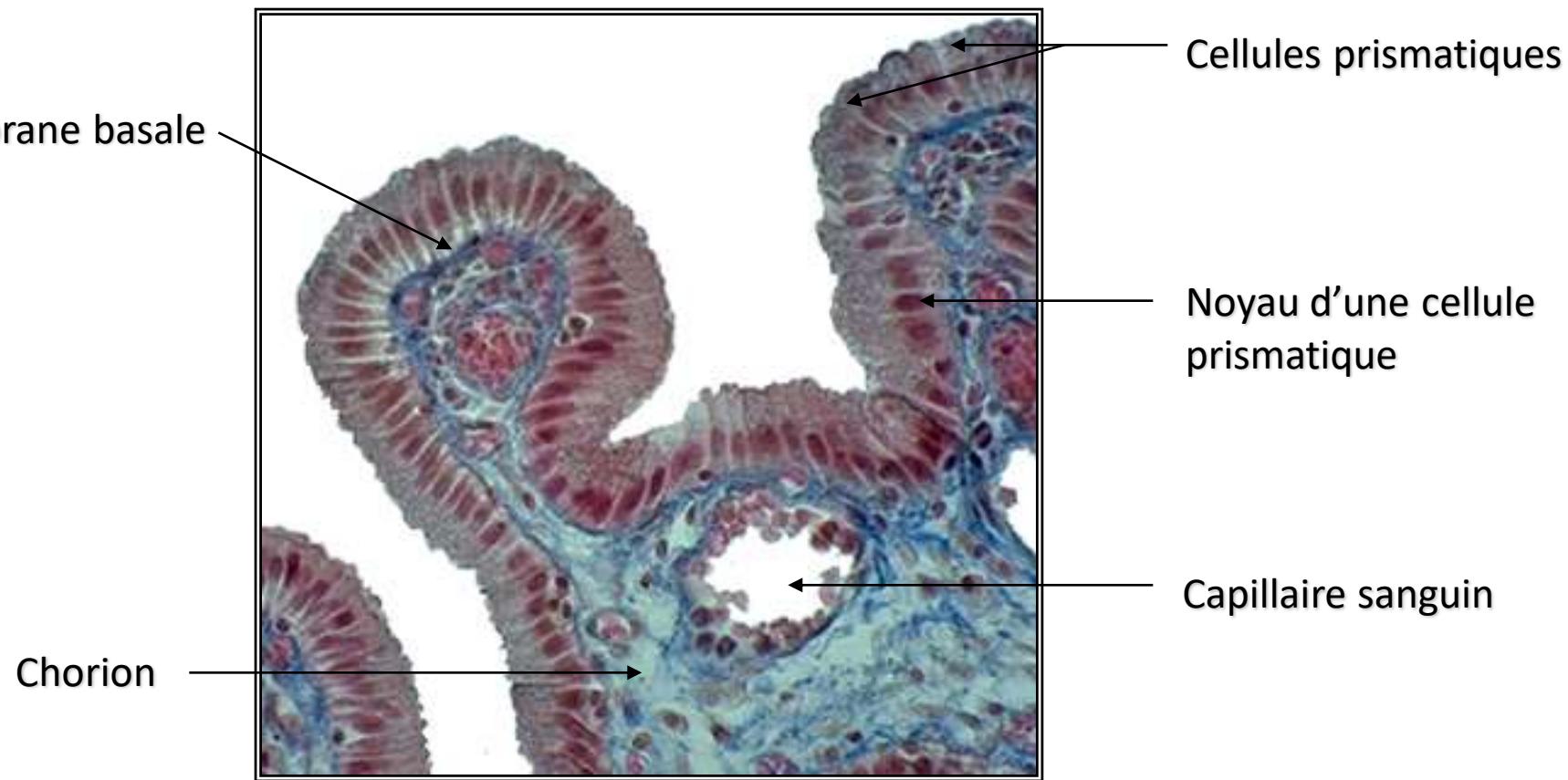
Cellules prismatiques ou cylindriques



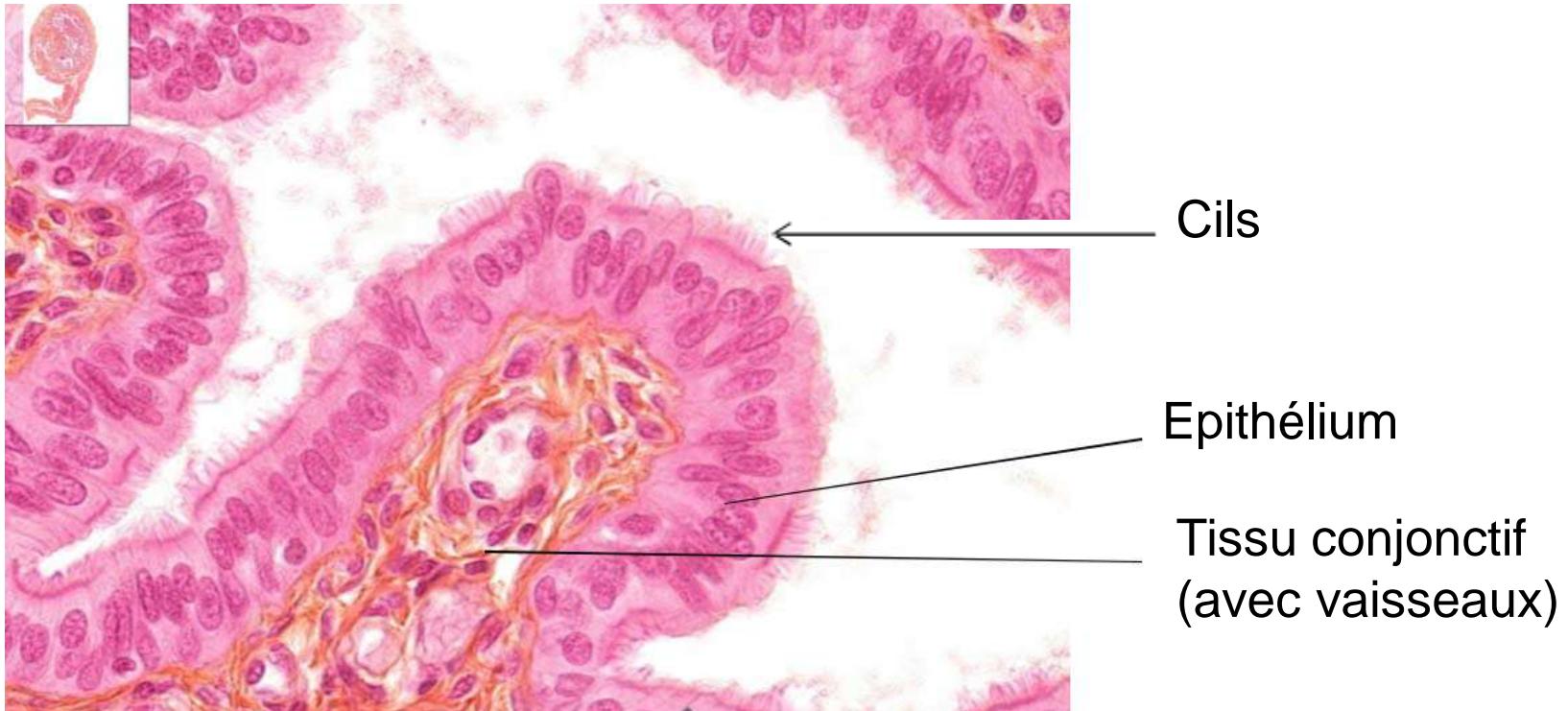
1 = épithélium
2 = tissu conjonctif

Epithélium cylindrique simple

- Noyau allongé, position variable
- Au niveau de l'intestin grêle, de l'estomac



ÉPITHÉLIUM PRISMATIQUE SIMPLE
(portion de vésicule biliaire humaine X 400)



Epithélium cylindrique simple cilié

- Au niveau du tractus génital féminin (trompes de Fallope)

** Classification des différents épithéliums de revêtement

en fonction du **nombre de couches cellulaires**, on note

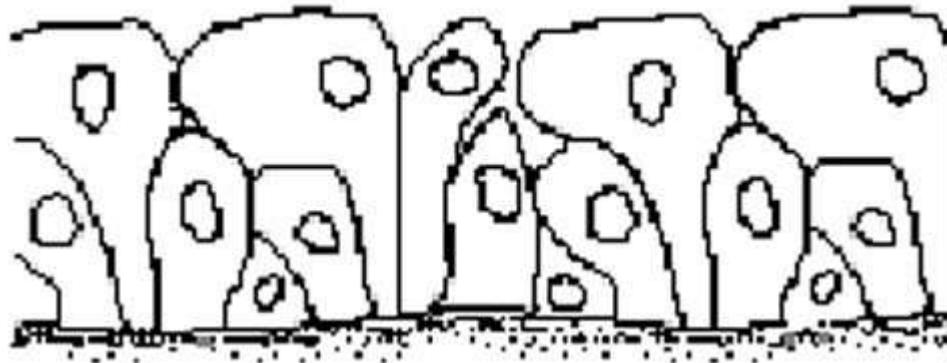


Epithélium simple

Une seule couche de cellules.

Le pôle apical de chaque cellule est en contact avec la lumière de la cavité

Le pôle basal repose sur la lame basale.



Epithéliums pseudostratifiés

paraissent posséder plusieurs couches de cellules
mais en réalité, un prolongement de chaque cellule
repose sur la lame basale.

Par contre, le pôle apical n'atteint pas toujours la surface de l'épithélium.



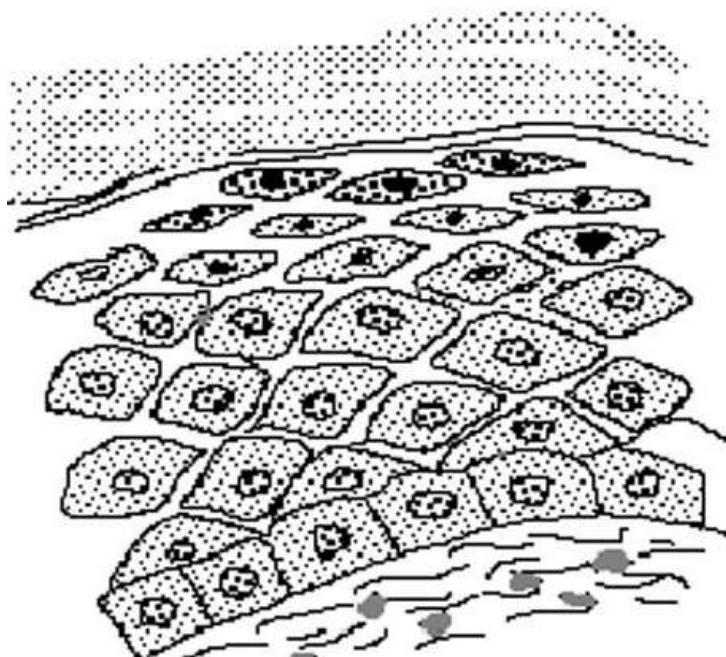
- Majorité des cellules sont ciliées

Epithélium cylindrique pseudostratifié cilié

- Noyaux situés à des hauteurs variables
- Toutes les cellules reposent sur la lame basale
- Certaines cellules n'atteignent pas la surface

pseudostratifié

Au niveau des voies aériennes supérieures
(cavité nasale, trachée, bronches)



Epithéliums stratifiés

comportent plusieurs assises cellulaires superposées.

Une seule couche repose sur la lame basale.

*** Classification en fonction de la différenciation de certaines cellules

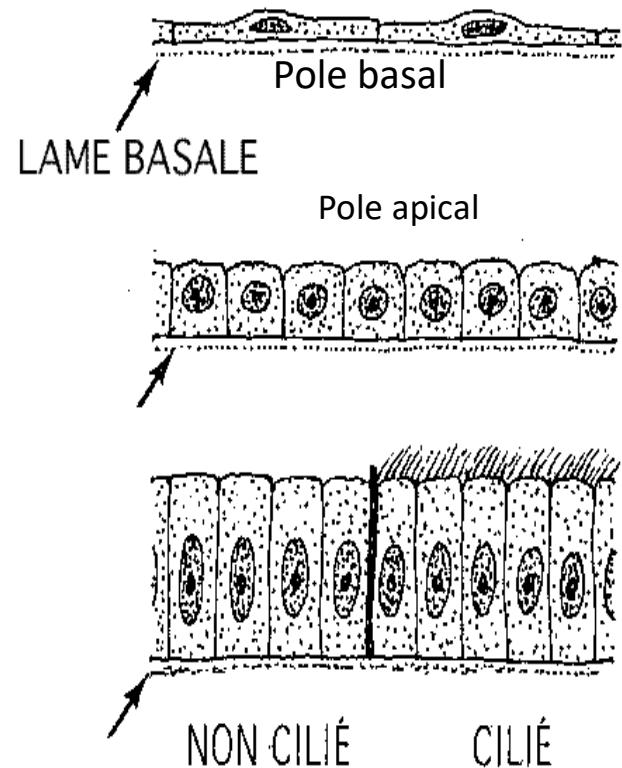
Les différenciations sont de **deux types** :

EPITHELIUMS SIMPLES

1. EPITHELIUM PAVIMENTEUX
UNISTRATIFIÉ
(Y COMPRIS ENDOTHÉLIUM)

2. EPITHELIUM CUBIQUE
UNISTRATIFIÉ

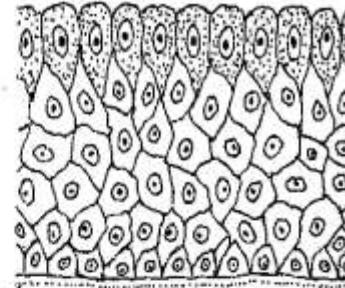
3. EPITHELIUM PRISMATIQUE
UNISTRATIFIÉ



EPITHELIUMS STRATIFIÉS

6. EPITHELIUM PRISMATIQUE PLURISTRATIFIÉ

LAME BASALE

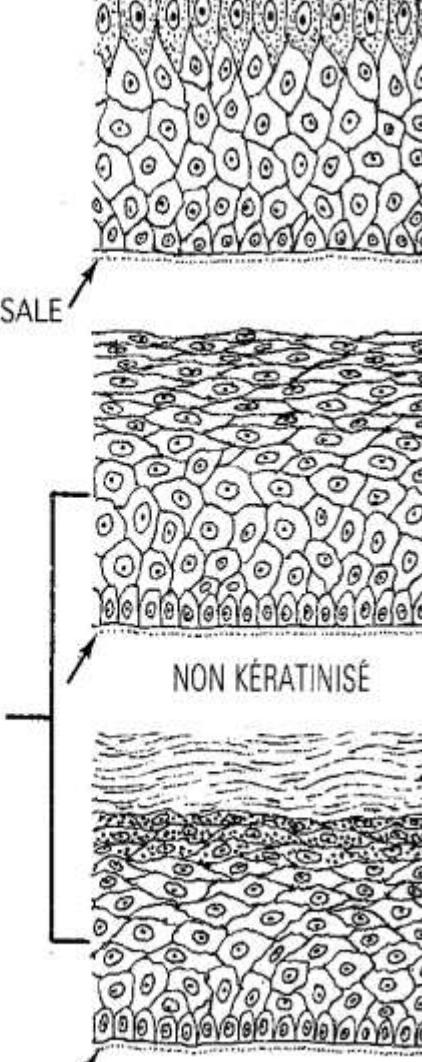


7. EPITHELIUM PAVIMENTEUX STRATIFIÉ

NON KÉRATINISÉ

LAME BASALE

KÉRATINISÉ



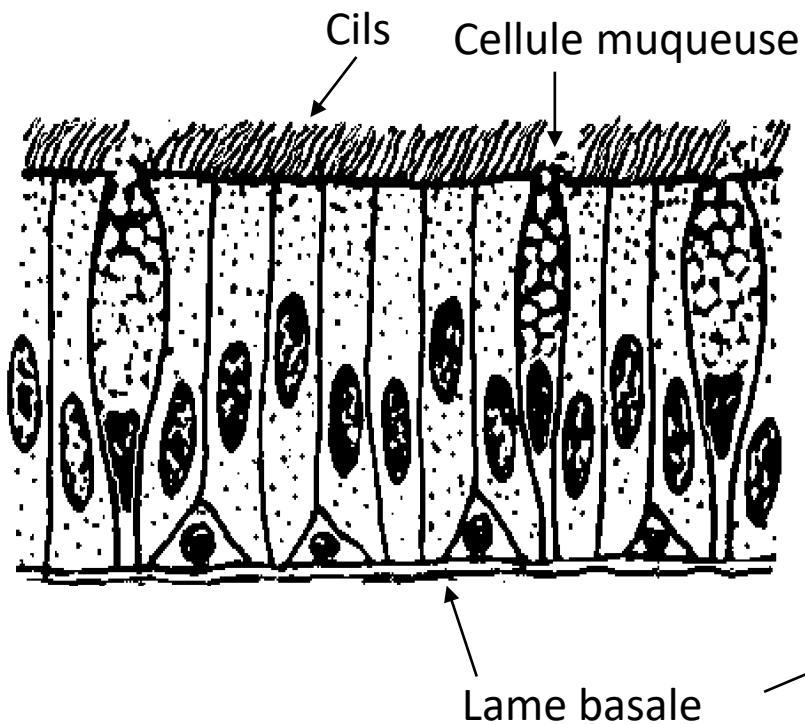
Dans les épithéliums pluristratifiés seules les cellules basales (cellules de renouvellement pour la plupart) sont au contact de la membrane basale.

Les autres couches cellulaires n'entrent jamais en contact avec la membrane basale.

Dans le cas des épithéliums pseudostratifiés, toutes les cellules se trouvent en contact avec la membrane basale, même si toutes n'affleurent pas obligatoirement la surface, et même si les noyaux cellulaires, non disposés au même niveau, donnent l'impression qu'il existe plusieurs couches cellulaires.

Cela est particulièrement vrai pour l'épithélium de transition vésical : c'est la microscopie électronique qui a clairement montré que les volumineuses cellules superficielles (1), souvent binucléées, sont toutes reliées à la basale par un très mince prolongement cytoplasmique (*) traversant la couche plus profonde (2).

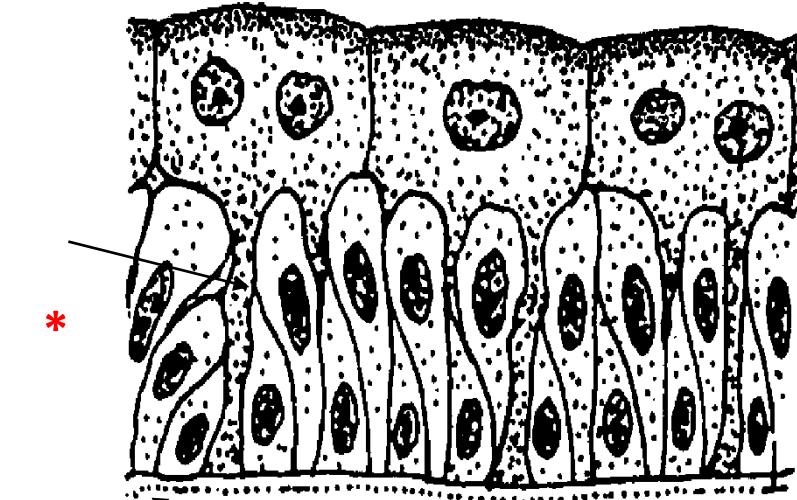
Voir figures suivantes:



EPITHELIUM PSEUDOSTRATIFIÉ A CELLULES CILIEES ET A CELLULES MUQUEUSES

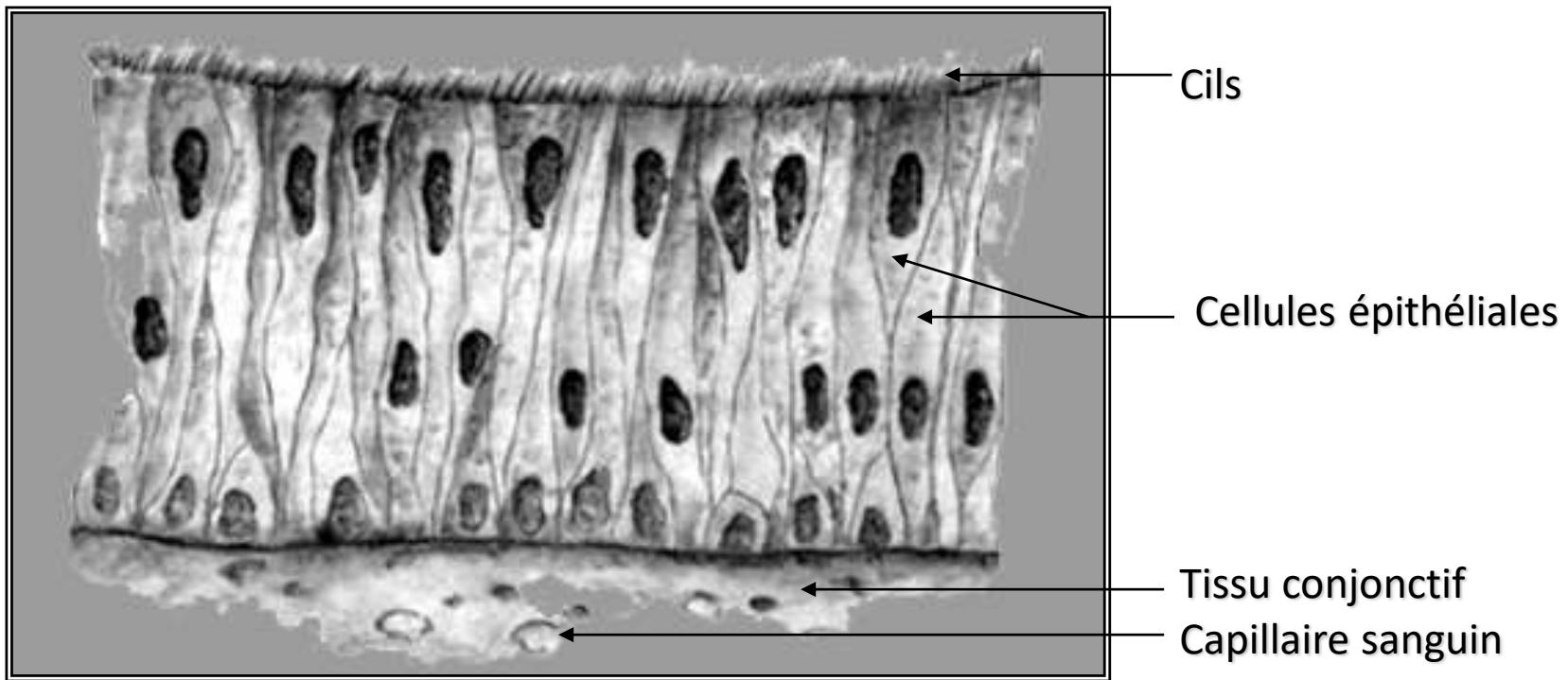
Cellule à muqueuse ou **C. caliciforme** à pôle apical ouvert

se trouvent entre les **cellules** des épithéliums de revêtement simple ou pseudostratifié



EPITHELIUM PSEUDOSTRATIFIÉ DE TRANSITION

Au niveau **E. revêtement de l'intestin**
E. respiratoire



ÉPITHÉLIUM PSEUDOSTRATIFIÉ CILIÉ

• Epithéliums glandulaires

Introduction

Les épithéliums glandulaires **sont** des tissus composés de cellules élaborant des substances au profit de l'organisme.

Ces cellules n'utilisent pas elles-mêmes ce produit de sécrétion mais le mettent à disposition d'autres éléments de l'organisme par excrétion.

• Donc : tissu épithélial formé de cellules manifestant une **activité sécrétoire**

Le produit de sécrétion est excrété soit:

- à la surface du corps (épiderme), soit à la surface d'une cavité du corps en communication avec l'extérieur (muqueuse)
par l'intermédiaire d'un canal excréteur

==> glande exocrine

- dans la circulation sanguine

==> glande endocrine

Les cellules glandulaires peuvent être :

- **isolées** dans un épithélium
(cellules muqueuses caliciformes, cellules neuroendocrines),
- **regroupées** en amas (cellules de Leydig dans le testicule)
- formant des **glandes** bien individualisées
(glandes salivaires principales, thyroïde, pancréas)

Histogenèse des glandes exocrines et endocrines

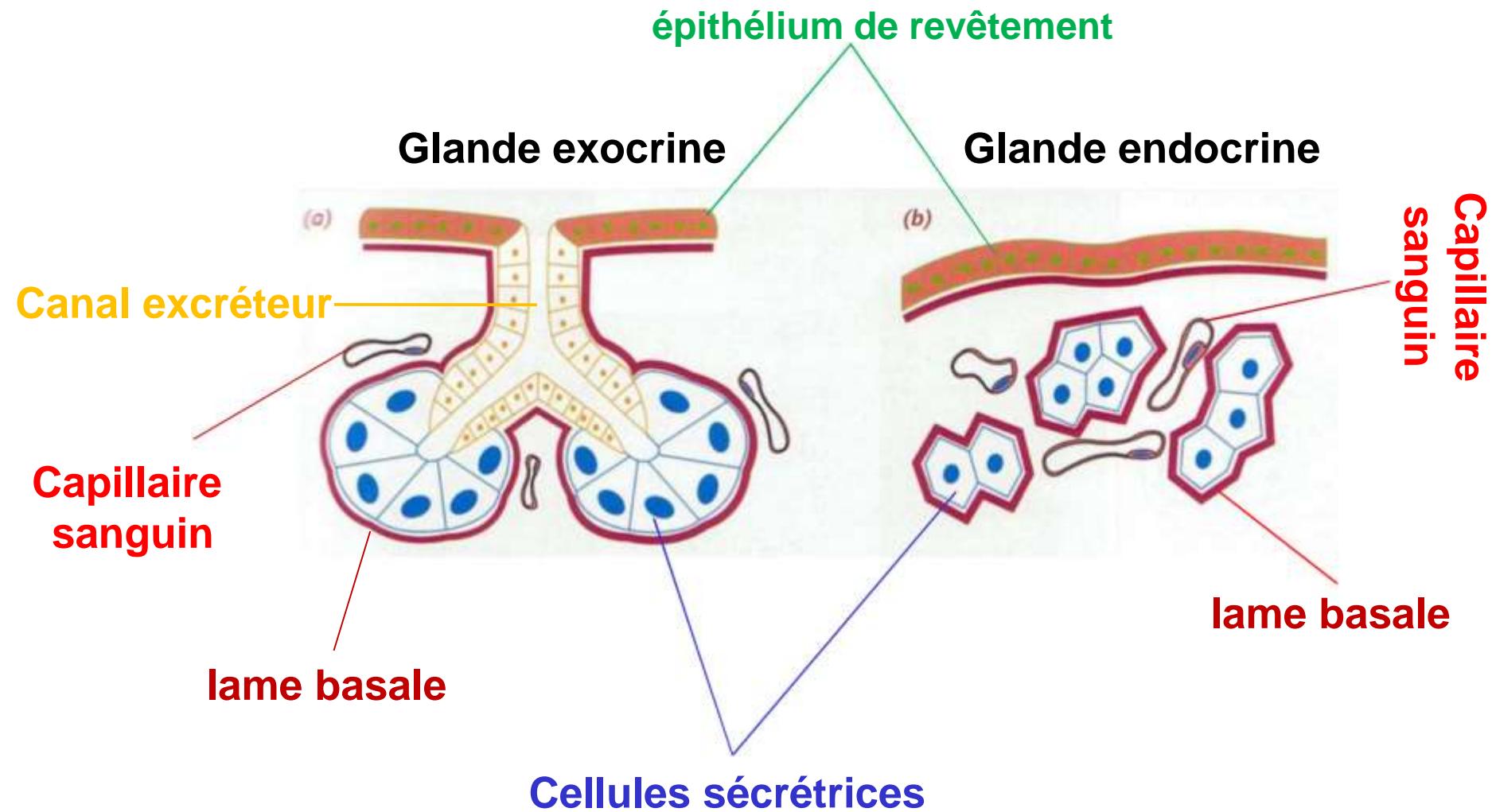
- Pour la glande **endocrine** :

- pas de contact avec l'épithélium de surface
- Le produit de sécrétion est libéré
dans la **circulation sanguine**.

- Pour la glande **exocrine** :

- contact avec la surface
- produits d'élaboration évacués par un **canal excréteur**
vers la lumière ou la surface

•• **Le tissu conjonctif assure la nutrition des tissus glandulaires**



Il existe des glandes avec les deux modalités de sécrétion qu'on appelle

glandes amphicrines (exemple le pancréas).

Pour les glandes endocrines, on observe

- Groupements de cellules sécrétoires
dépourvus de canal excréteur
- Produits de sécrétion = **hormones**, déversées
directement dans la circulation sanguine
- Glandes individualisées en organes, îlots, ou cellules isolées

- Lame basale entre cellules et TC environnant
- Vascularisation très importante

Parmi les produits synthétisés par le pancréas endocrine sont principalement les hormones suivantes :

l'insuline (seule hormone hypoglycémiant) ;

le glucagon (hormone hyperglycémiant)

Pour les glandes exocrines, on observe

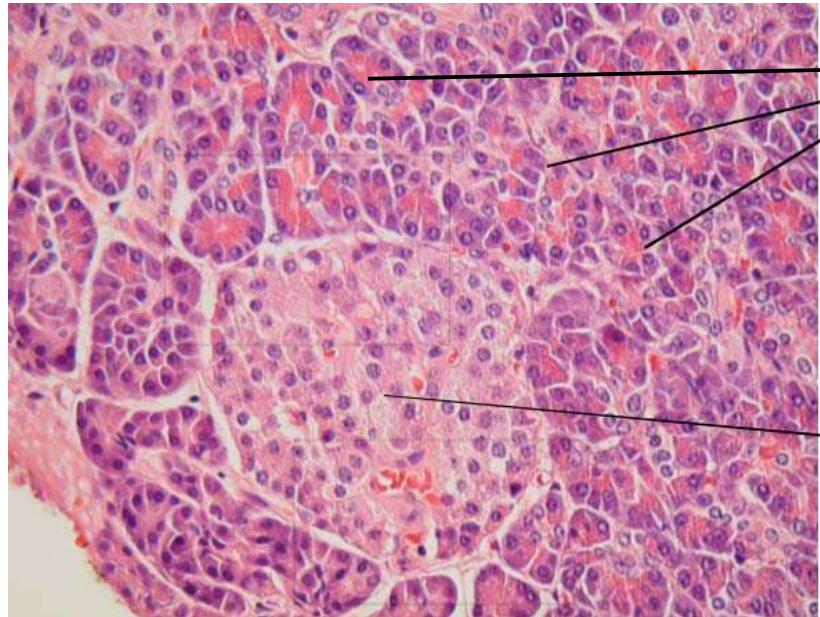
2 composants épithéliaux principaux :

- Les unités sécrétoires

- Les canaux excréteurs

Pour les glandes amphicrines (Glandes exocrines et endocrines)

- **foie** : l'hépatocyte exerce les deux fonctions
- **pancréas** : **acini séreux** exocrines
et **îlots de Langherans** endocrines



Pancréas

En effet, le pancréas est une **glande exocrine** élaborant le suc pancréatique déversé dans la lumière du tube digestif par des canaux excréteurs.

A côté de cette fonction, il contient également

des formations **glandulaires endocrines**, responsables de l'excrétion dans le sang circulant d'hormones comme l'insuline et le glucagon.

Techniques d'Etude en Microscopie Photonique

I - FIXATION

1 - GENERALITES

La fixation est essentielle car elle permet

la stabilisation des structures cellulaires et tissulaires.

"un défaut de fixation est irrémédiable;

il est inutile d'entreprendre l'étude histologique d'une pièce mal fixée".

R. et M. MARTOJA (1967)

Les fixateurs peuvent être physique ou chimiques,

simples (éthanol ou formol)

ou encore **composés** (mélanges de fixateurs comme le liquide de Bouin).

Pour une étude morphologique d'ensemble,

la plupart des fixateurs usuels conviennent,
même les plus simples.

Par contre, lorsque **des réactions histochimiques** sont mises en jeu,
il faut tenir compte des interactions entre le fixateur
et les structures ou composés chimiques à mettre en évidence :
éviter d'utiliser un **fixateur oxydant**
pour les réactions nécessitant une oxydation;
ne pas utiliser de **fixateurs alcooliques pour les lipides**.

La fixation doit suivre immédiatement la dissection et le prélèvement.

Le volume du fixateur doit théoriquement être

au moins 15 à 20 fois celui de la pièce.

La durée de fixation est variable selon le fixateur et le tissu à fixer.

2 - FIXATEURS CLASSIQUES

Composition de différents fixateurs utilisés

- Alcool-formol :

**éthanol absolu
formol du commerce**

- Baker :

**formol neutre
chlorure de calcium anhydre à 10%
eau distillée**

- Bouin

solution aqueuse saturée d'acide picrique

formol du commerce

acide acétique

- Bouin - Hollande

**eau distillée
acétate de cuivre
formol du commerce
acide acétique
acide picrique**

- Carnoy (extemporané)

**éthanol absolu
chloroforme
acide acétique**

- Zenker

Solution mère :

bichromate de potassium : x g

chlorure mercurique : x g

sulfate de sodium : x g

eau distillée : x ml

Au moment de l'emploi, ajouter :

acide acétique : x ml

- Halmi

solution aqueuse saturée d'acide picrique : x ml
susa de Heidenhain : x ml

- Susa de Heidenhain

chlorure mercurique (sublimé) : x g
chlorure de sodium : x g
eau distillée : x ml
acide trichloracétique : x g
acide acétique : x ml
formol : x ml

Quelques temps de fixation :

- Bouin = 24 à 48 h
- Carnoy = 4 h
- Formol = indéfiniment

Ces temps sont à adapter selon l'épaisseur des pièces

(5 à 7 mm pour la microscopie photonique).

Dans certains laboratoires d'**anatomie pathologique humaine**,

on effectue une pré-fixation des pièces

de 24 à 48 heures dans le formol,

suivi d'un post-mordançage dans le liquide de Bouin de 1 à 24 heures.

II - INCLUSIONS ET COUPES

1 - INCLUSIONS

Les pièces seront traitées par différents solvants

qui permettront de remplacer l'eau intratissulaire par le milieu d'inclusion.

a) Inclusion à la paraffine.

C'est le milieu le plus couramment utilisé.

- Les liquides d'attente

Suivant le fixateur employé, les pièces peuvent être mises en attente dans :

- **l'alcool éthylique à 70° après le liquide de Bouin**
- **l'alcool butylique après le Carnoy**
- **l'alcool éthylique à 100°**

ou laissées dans les différents **fixateurs à base de formol**.

- La déshydratation

La fixation au Bouin, est suivie d'un lavage rapide à l'eau;

la déshydratation est réalisée par un passage du tissu

dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes.

Le volume du liquide doit être, au minimum,

10 fois supérieur à celui de la pièce.

Les pièces incolores ou très petites peuvent être colorées

par un colorant aqueux (éosine ou bleu de méthylène)

Pour des pièces de 5 à 7 mm d'épaisseur, on effectuera :

1 bain d'éthanol à 70°

2 bains d'éthanol à 96°

2 bains d'éthanol à 100°

2 bains de butanol

Les pièces fixées au Carnoy sont directement immergées

dans les bains d'éthanol absolu ou de butanol.

- *L'éclaircissement ou clarification*

Il consiste à remplacer l'éthanol dans le tissu

par un solvant de la paraffine au cours de

2 bains de butanol.
ou 3 bains de cyclohexane



Chaque bain avec un timing correspondant selon le protocole et l'objectif du travail.

Un séjour prolongé dans le butanol favorise l'inclusion,

sauf pour certains tissus (ex : hypophyse).

- *L'inclusion*

Ce procédé s'effectue au cours de deux étapes successives:

l'imprégnation et l'enrobage.

● L'imprégnation :

la paraffine pénètre dans le tissu au cours d'un bain à l'étuve à 60°C

d'une durée de 4 h pour le foie, le rein, la rate, le poumon

et de 12 h pour les autres pièces.

● L'enrobage :

Le tissu imprégné de paraffine est inclus dans un bloc de paraffine confectionné à l'aide d'un moule (barres de Leukhart, cassettes, etc...).

* La réinclusion:

après une erreur de manipulation,

il est parfois nécessaire de réinclure les pièces.

Remettre à l'étuve, dans de la paraffine fondu,
le bloc taillé au plus près de la pièce.

Lorsque l'objet est dégagé, refaire le bloc.

- COUPES

- Coupes à la paraffine

On utilisera un microtome (exemple microtome de Minot)

où l'objet subit un mouvement vertical.

- Les coupes sont couramment débitées à **7µm d'épaisseur**.
- Avant de couper, rechercher la **bonne inclinaison du rasoir**.
- Recueillir le **ruban formé** à l'aide de pinces ou d'un pinceau.

- Coupes au cryotome (appelé communément **cryostat**)

Le cryotome en cabinet est un microtome inséré

dans une **enceinte réfrigérée**.

Le rasoir utilisé est conservé à l'intérieur du cabinet

et se trouve à la température désirée pour la coupe.

Les coupes s'effectuent le plus souvent à -20°C ;

les pièces adhèrent au porte-objet **par inclusion**

dans une résine qui durcit au froid.

Les coupes obtenues peuvent être très minces (5µm).

Elles sont recueillies directement sur le rasoir avec une lame de verre tiède.

Elles y adhèrent spontanément.

Les microtomes-cryostats sont équipés d'une plaque

qui s'ajuste au tranchant du rasoir empêchant ainsi les coupes

de s'enrouler sur elles-mêmes pendant leur confection.

- COLLAGE

1 - COLLAGE DES COUPES

Collage à l'albumine:

- Albumine glycérinée (à conserver à +4°C).

* **préparation :**

ovalbumine en poudre (casser dans un mortier) : 1g

eau distillée : 100 ml

après dissolution, ajouter :

glycérine : 100 ml

filtrer et ajouter :

salicylate de sodium ou du thymol : 1g

* **préparation au blanc d'œuf**

- Mélanger un poids égal de blanc d'œuf et de glycérine
(utiliser un mixer pour casser les molécules d'albumine)
- Ajouter 0,5% de salicylate de sodium, ou du thymol
- Filtrer (la filtration est longue).

- Eau albumineuse

Au moment de l'emploi, préparer :

eau distillée : x ml

albumine glycérinée : x ml

Technique :

Disposer les lames propres (sèches) sur une platine chauffée à 40°C-50°C.

Mettre quelques gouttes d'eau albumineuse sur les lames.

Déposer les coupes sur la colle.

Attendre que les coupes soient parfaitement étalées.

Eliminer l'excédent de liquide.

Mettre les lames à sécher comme précédemment.

DEPARAFFINAGE - HYDRATATION

Les coupes doivent être **déparaffinées** avant coloration.

- Passer les lames à la flamme (facultatif) :

Cette opération permet une meilleure adhérence des coupes

et chasse les bulles d'air qui ont pu être emprisonnées entre la lame et la coupe

Cyclohexane : x mn

Ethanol à 95° : x mn

Ethanol à 70° : x mn

Eau courante : passage jusqu'à disparition du trouble.

MONTAGE DES COUPES COLOREES

Une fois colorées, les coupes sont montées.

Selon les réactions mises en œuvre,

le milieu de montage nécessitera une déshydratation ou sera aqueux.

1 - MONTAGE A L'EUKITT OU AU BAUME DU CANADA

- Déshydrater les coupes par passages dans des bains successifs de :

éthanol à 70° :	2 mn
éthanol à 95° :	5 mn
éthanol à 100° :	5 à 10 mn
butanol :	5 mn
cyclohexane :	10 mn

Attention :

Au cours de la déshydratation , les coupes ne doivent pas sécher.

On peut les laisser dans le dernier bain de cyclohexane
plusieurs heures voire éventuellement une nuit !

- Mettre une goutte d'Eukitt ou de baume du Canada sur une lamelle.
- Sans laisser sécher, poser la lamelle sur les coupes
 - en évitant d'emprisonner des bulles d'air.

- Laisser sécher:**

Quelques heures à température ambiante pour l'Eukitt.

24 à 48h à l'étuve à 60°C pour le baume du Canada.

COLORATIONS HISTOLOGIQUES GENERALES

Les colorations doivent permettre de reconnaître
immédiatement les différents tissus.

Des colorations bien tranchées faciliteront cette reconnaissance,
elles doivent donner de bonnes images cytologiques.

De manière générale, on utilisera un colorant nucléaire
et un colorant cytoplasmique.

On pourra adjoindre un colorant des fibres collagènes ou élastiques.

Les sécrétions pourront également mises en évidence,

les colorations histochimiques permettront d'en déterminer la nature.

Certains colorants sont acides, ils se fixeront **sur les structures basiques**,

d'autres sont basiques et se fixeront **sur les structures acides**.

Le mordançage facilitera la fixation de certains colorants.

Enfin, pour la plupart des colorations, on pourra remplacer

un des colorants par un autre possédant des qualités voisines

(hématoxyline et rouge nucléaire par exemple).

Les colorations qui suivent sont parmi celles qui sont les plus employées,

la référence à des ouvrages spécialisés permettra

de les modifier ou de trouver d'autres techniques.

HEMALUN – EOSINE :

Cette coloration utilise un colorant nucléaire

(l'hémalun ou l'hématoxyline de Groat)

et un colorant cytoplasmique, l'éosine (colorant acide)
qui peut être remplacée par la phloxine.

Fixateurs :

Tous les fixateurs conviennent.

Réactifs :

Hématoxyline de Groat ; éosine (Y, J ou G) à 1% ou phloxine à 1%.

Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater
- Hématoxyline de Groat: 5mn
- Eau courante: 5mn
- Eosine ou phloxine: 30 s
- Eau: rincer
- Déshydrater, monter.

Résultats :

Les noyaux sont colorés en bleu-noir **en raison de la présence des acides nucléiques**;
(en marron si l'hématoxyline est épuisée),

les cytoplasmes acidophiles en rose. Certaines sécrétions restent incolores.

LES COLORATIONS A L'AZAN ET VARIANTES :

Ce sont des colorations à base d'**azocarmine** et d'**aniline**

qui permettent une mise en évidence fine de nombreuses structures histologiques.

Remarque:

Il faut éviter de colorer ensemble des coupes de tissus différents.

Fixateurs :

Tous les fixateurs conviennent.

Eviter le bichromate et le tétr oxyde d'osmium.

a) Azan de Heidenhain :

Réactifs :

- Azocarmin G ou azocarmin B ; bleu de Heidenhain dilué.

- Aniline à 1% dans l'éthanol à 70°;

acide acétique à 1% dans l'éthanol à 95° ;

acide phosphotungstique à 5%.

Mode opératoire :

- Déparaffiner, hydrater
- Si les coupes proviennent de matériel fixé
 - avec un fixateur à base **d'acide picrique**,
 - on peut éliminer celui-ci par un séjour de 30 mn
 - dans l'alcool aniline (facultatif)
- Azocarmin G à 60°C : 1 heure
 - ou Azocarmin B à température ambiante : 1 heure

- Eau distillée à 60°C : rincer
 - ou Eau distillée à température ambiante: rincer
- Différencier par l'alcool aniline, sous le microscope,
 - jusqu'à la coloration nucléaire presque pure
- Arrêter la différenciation par un rinçage de 30 secondes à l'alcool acétique.

Le séjour des coupes peut être fortement prolongé

- Eau distillée : rincer

- Acide phosphotungstique : 30 mn,
(mordançage permettant la coloration par le bleu de Heidenhain et poursuite de la différenciation de l'azocarmine)
- Eau distillée : rincer
- Bleu de Heidenhain : 1 h
- Différencier le bleu par l'éthanol à 95°
- Déshydrater directement à l'éthanol absolu, monter.

Résultats :

Les noyaux et certains cytoplasmes sont rouges, d'autres cytoplasmes sont jaunes ou gris.

Le collagène est bleu.

Les sécrétions peuvent être de différentes couleurs selon leur nature.

Les mucopolysaccharides acides sont bleus.

b) Azan de Romeis :

Réactifs :

- Azocarmine G ou azocarmine B ; bleu d'aniline ; orange G molybdique.
- Aniline à 1% dans l'éthanol à 70° ; acide acétique à 1% dans l'éthanol à 95°.

Mode opératoire :

- Déparaffiner, hydrater

- Eliminer l'acide picrique du fixateur par l'alcool aniline (facultatif).: 10 mn
 - **Azocarmine G** à 60° C : 1 heure
ou **Azocarmine B** à température ambiante : 1 heure
 - Eau distillée à 60° C : rincer
ou Eau distillée à température ambiante: rincer
 - Différencier par l'alcool aniline, sous le microscope,
jusqu'à la coloration nucléaire presque pure
 - Arrêter la différenciation par un rinçage de 30 secondes à l'alcool acétique.
- Le séjour des coupes peut être fortement prolongé.

- Eau distillée : rincer
- Orange G - molybdique : 5 mn
- Eau : rincer
- Bleu d'aniline : 10 mn
- Eau distillée (elle élimine du bleu) : rincer
- Ethanol à 95°
- Poursuivre la déshydratation, monter.

Résultats :

Même résultats que l'azan de Heidenhain.

c) Azan modifié

Réactifs

- Rouge nucléaire solide ; bleu d'aniline ; orange G molybdique.

Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater
- Rouge nucléaire : 15 mn
- Eau : rincer
- Orange G molybdique : 5 mn
- Eau : rincer
- Bleu d'aniline : 2 à 5 mn
- Eau distillée (elle élimine du bleu) : rincer
- Ethanol à 95°
- Poursuivre la déshydratation, monter.

Résultats

Ils sont identiques à ceux de l'azan de Heidenhain ou de Romeis.

LES COLORATIONS HISTOCHIMIQUES

Les colorations histochimiques permettent de caractériser

les composés chimiques présents dans les tissus.

Ces techniques peuvent être appliquées sur des tissus fixés,

le fixateur doit alors permettre leur bonne conservation

sans dénaturer leur structure chimique.

Certains composés ne supportent pas l'action du fixateur

ou des procédés de déshydratation

(exemple : les lipides sont solubles dans l'éthanol).

On aura alors recours à la confection de
Coupes à congélation de matériel frais ou fixé.

L'utilisation de l'histochimie peut s'appliquer aussi bien pour :

- la détection des glucides.
- la détection des protéines comme la kératine, la mélanine...
- la détection des lipides.
- la détection des acides nucléiques.

A - HISTOCHIMIE DES GLUCIDES

La détection des sucres simples (monosaccharides) est difficile.

Les méthodes qui suivent concernent uniquement les polysaccharides.

1 - DETECTION DES POLYSACCHARIDES SIMPLES

- **Méthode à l'A.P.S. (Acide Périodique-Schiff.)**

La méthode consiste à oxyder par l'acide périodique

les glucides qui libèrent alors un groupement aldéhyde -CHO.

Ces groupements ont la propriété de se combiner

avec le réactif de Schiff (fuchsine décolorée)

qui prend alors une teinte rouge vif.

Fixateurs

Il faut tenir compte, dans certains cas, du pouvoir oxydant du fixateur.

Pour les mucopolysaccharides, les fixateurs courants conviennent.

Réactifs

- Réactif de Schiff, hématoxylene de Groat .
- Acide périodique à 1%.

Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater
- Acide périodique : 10 mn
- Eau courante: 10 mn
- Eau distillée : rincer

- Réactif de Schiff: 10 mn
- Eau courante : 5 mn
- Hématoxyline de Groat : 5 mn
- Eau courante : 5 mn
- Déshydrater, monter.

Résultats

Les composés A.P.S. - positifs (mucopolysaccharides) sont rouges.

Les grains de glycogène sont rouges, le collagène violet.

2 - DETECTION DES MUCOPOLYSACCHARIDES ACIDES

Ce sont des mucopolysaccharides azotés
(la molécule présente une hexoamine).

Ils possèdent des groupes acides (-COOH et -OSO₃H).

a) Méthode au bleu alcian

Les colorants de la famille du bleu alcian sont des **colorants basiques**.

Leur sélectivité est accrue par abaissement du pH.

Fixateurs :

Tous les fixateurs usuels conviennent.

Réactifs :

Bleu alcian pH 0,5; 2,5 et 4,5 ; hématoxyline de Groat.

Mode opératoire

- Déparaffiner, hydrater
 - Bleu alcian : x mn
 - Eau : rincer
- Hématoxyline de Groat : x mn (ou Rouge nucléaire : 5 mn)
- Eau courante :x mn
 - Déshydrater, monter.

Résultats

Les mucopolysaccharides acides sont bleus, les noyaux brun-bleus.

3 - COLORATIONS COMBINEES

Bleu alcian-A.P.S.

Cette coloration permet de mettre en évidence
les mucopolysaccharides simples et acides.

Fixateurs :

Tous les fixateurs usuels conviennent.

Réactifs :

- Bleu alcian à pH 2,5 ; réactif de Schiff ;

Hématoxyline de Groat ; orange G molybdique.

- Acide périodique à 1 %.

Mode opératoire :

- Déparaffiner, hydrater
- Bleu alcian : x mn
- Eau : rincer
- Acide périodique : x mn
- Eau courante : x mn
- Eau distillée : rincer
- Réactif de Schiff : x mn
- Eau courante : x mn
- Hématoxyline de Groat :x mn
- Eau courante : x mn
- Orange G - molybdique : x mn
- Eau : rincer
- Déshydrater, monter.

Résultats :

Les mucopolysaccharides sont colorés du rouge au bleu

en passant par toute une gamme de violets;

les noyaux sont brun-bleus,

les cytoplasmes acidophiles jaunes, le collagène violet.

Coloration de Ravetto :

A pH 0,5 le bleu alcian ne colore que les sulfomucopolysaccharides (R-SO₃H).

A pH 2,5 le jaune alcian colore les mucopolysaccharides carboxylés (R-COOH).

Réactifs

- tampon à pH 0,5. On peut utiliser l'acide chlorhydrique 0,5 N
- bleu alcian à pH 0,5 ; solution aqueuse de jaune alcian à 0,5%, tamponnée à pH 2,5.

Mode opératoire :

- Déparaffiner, hydrater
- Bleu alcian : x mn
- Tampon à pH 0,5 : 10 s

- Eau : rincer
- Jaune alcian : x mn peut atteindre 1 heure
- Eau : rincer
- Rouge nucléaire : x mn
- Eau : rincer
- Déshydrater, monter.

Résultats

Les **mucopolysaccharides carboxylés** sont colorés en jaune,

Les **sulfomucopolysaccharides** en bleu,

les mélanges de mucopolysaccharides divers en vert.

