الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
—
Université
Yahia FARES de MEDEA

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
—
جامعة يحي فارس بالمدية

Faculté des Sciences

كليـة العلـوم

N°:……/CSF/2020

POLYCOPIE DE COURS

Initiation aux techniques d'histopathologie et de cytopathologie

Auteur :

Bachene Mohamed Sadek

Destiné aux étudiants de

Discipline : Biologie

Spécialité : Biologie et pathologie cellulaire

Niveau : Master 1

Année : 2019/2020

Approuvé par le Conseil Scientifique de la Faculté en date du :

Techniques Histo-cyto-path

I. Méthodes d'études en histologie 01

A. Généralités et définitions 01

B. Les préparations tissulaires 02

1. Microscopie optique 02

a. Le prélèvement 02

b. La fixation 04

c. La déshydratation 06

d. L'inclusion 08

e. La microtomie 11

f. La coloration 16

2. Microscopie électronique 20

a. Le prélèvement 21

b. La fixation 21

c. La déshydratation 24

d. L'inclusion 25

e. L'ultra-microtomie 26

f. Contraste 27

II. Les différents types de coloration 28

a. Hématoxyline éosine safran (HES) 28

b. May-Grünwald-Giemsa (MGG) 29

c. Coloration Papanicolaou 31

d. Autres colorations d'utilisation fréquente 33

III. L'immunohistochimie IHC et l'immunocytochimie ICC 42

a. Interêts et définitions 42

b. Principes de l'immunohistochimie et retour sur les définitions 43

c. Technique de l'immunohistochimie 51

Références

I. Méthodes d'études en histologie

A. Généralités et définitions :

L'Histologie signifie étymologiquement science des tissus. Le concept de tissu, de derme, a été inauguré à la fin du XVIIème / début XVIIIème siècle par Xavier Bichat, sans microscope ; ce concept a été élaboré grâce à ses travaux de dissection anatomique.

L'histologie s'est constituée vers le milieu du XIXème siècle à partir de la conjonction de deux évènements, en particulier grâce à l'avènement de la théorie cellulaire (1838), établie à partir des travaux de Théodore Schwann et de Schleiden.Cette théorie postule que tout organisme est constitué de cellules, et est complétée par Virchow en 1858, lorsque ce dernier affirme que toute cellule provient d'une autre cellule : l'unité élémentaire de la vie est donc la cellule.

D'autre part, les protozoaires sont constitués d'une seule cellule ; d'autres organismes sont au contraire constitués de plusieurs cellules : ce sont les métazoaires.

A partir du début du XIXème siècle, et surtout vers 1840, le microscope optique est perfectionné et l'optique bénéficie de grandes améliorations. Des lentilles beaucoup plus performantes sont en effet fabriquées, ce qui permet d'obtenir des images beaucoup plus proches de la réalité. C'est à cette époque que les techniques histologiques se mettent en place.

Un tissu est constitué de cellules et des substances qu'elles synthétisent ; ces substances constituent la matrice extracellulaire ou MEC. Bien que plus complexe, l'examen histologique est aujourd'hui souvent assimilé à l'examen microscopique.

L'histologie s'est rapidement intéressée à la morphologie des cellules (l'histochimie), mais aussi à leur fonctionnement et à la conception des tissus (histophysiologie). Au début des années 1960, la création du microscope électronique permet d'améliorer le grandissement et introduit une nouvelle façon de voir les cellules et les tissus. Aujourd'hui, l'histologie a pour but de mettre en évidence au sein de la cellule, in situ (contrairement à la biochimie), les protéines, l'ADN et l'ARNm.

On distingue quatre familles de tissus, qui sont étudiés dans le cadre de l'histologie générale :

- Les épithéliums.
- Les tissus conjonctifs.
- Les tissus musculaires.
- Les tissus nerveux.

Ces tissus sont caractérisés par la composition moléculaire de leur MEC, la nature de leur cellule et la proportion de celles-ci par rapport à la MEC.

L'histologie spéciale s'intéresse à l'étude de la structure des organes en étudiant l'anatomie microscopique d'une part et l'histophysiologie d'autre part. Les organes sont regroupés en systèmes ou en appareils ; ceux-ci ont chacun une ou plusieurs fonctions bien définies et assurent le fonctionnement de l'organisme.

L'anatomie pathologique, quant à elle, étudie les tissus pathologiques. Le diagnostic de nombreuses pathologies repose sur l'examen microscopique de petits échantillons tissulaires appelés biopsies.

B. Les préparations tissulaires :

1. Microscopie optique :

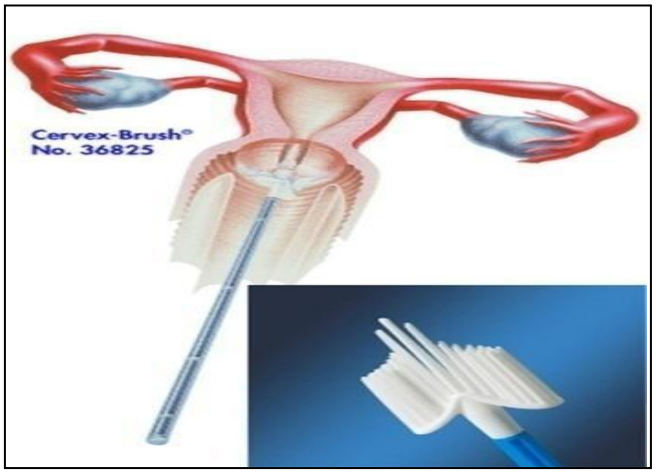
a. Le prélèvement :

En histologie humaine, le prélèvement peut se faire sur un cadavre (le plus rapidement possible après le décès), sur pièces opératoires (rapidement ou bien les pièces doivent être fixées rapidement)ou encore de façon globale, sans recoupes, cas des biopsies.

On utilise des instruments bien tranchants comme le Scalpel, afin de ne pas écraser les tissus et donc d'éviter la formation d'artefacts. Il faut découper des tranches peu épaisses en tenant compte de l'orientation générale de l'organe.

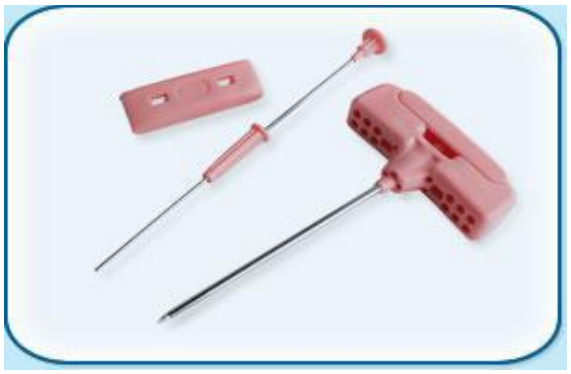
Il existe différents types de prélèvements tissulaires :

- Frottis : Prélèvement médical au moyen d'un écouvillon stérile, d'une petite brosse ou d'une petite spatule (par exemple au niveau du col de l'utérus), permettant de prélever des cellules.

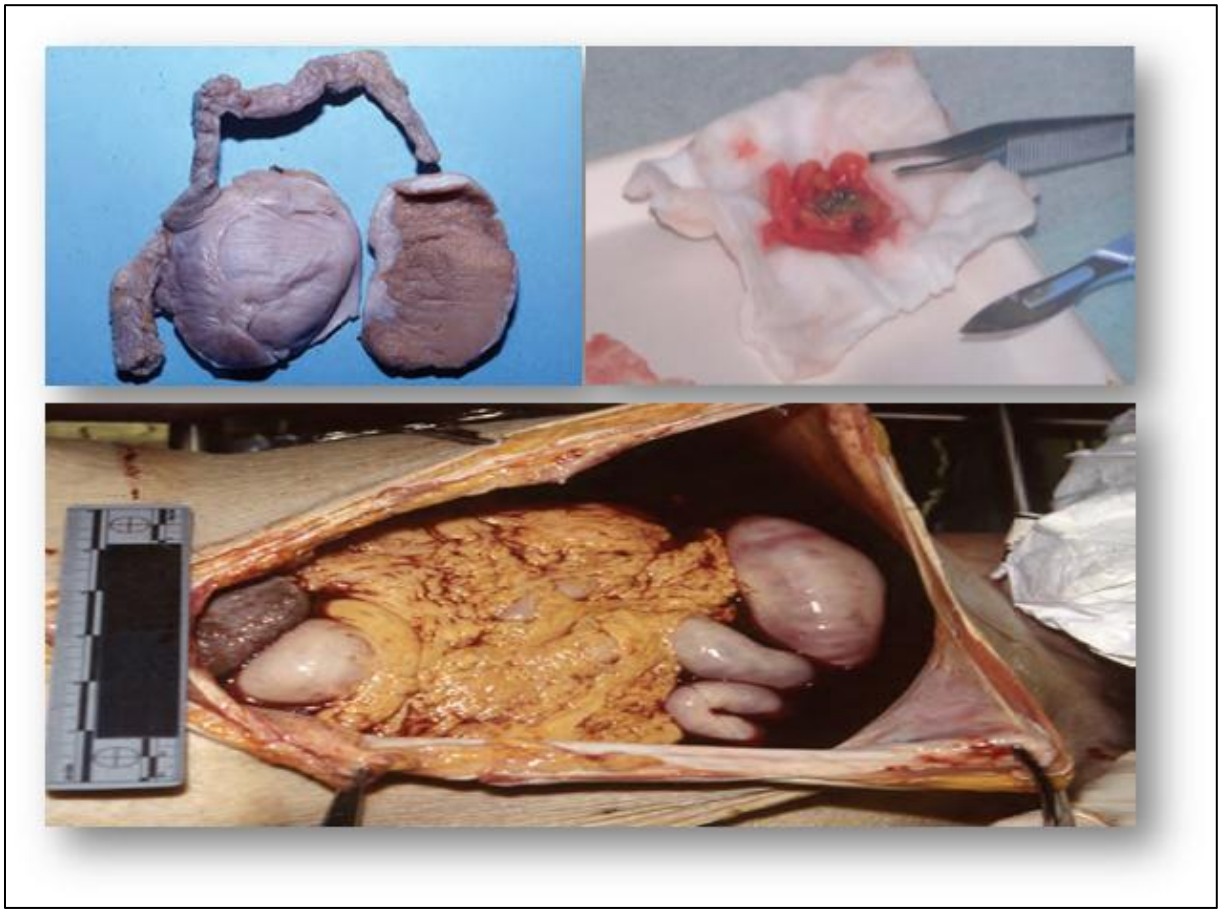


Brosse pour frottis cervico-vaginal

- Biopsies : prélèvements de très petite taille d'un tissus.

- L’exérèse partielle ou complète : Ablation chirurgicale d’un organe ou partie, d’une lésion, d’un corps étranger (tumeur). Elle est réalisée en bloc opératoire ou pour une autopsie.



b. La fixation :

Le but de la fixation est de conserver les structures. En effet, le prélèvement des tissus provoque leur mort : les cellules déversent leurs enzymes, ce qui provoque une autodigestion du tissu. Deplus, à l'air ambiant, les prélèvements peuvent être contaminés par des bactéries, ce qui entraîne une putréfaction des tissus.

La fixation consiste à immobiliser les tissus in-situ, en particulier les antigènes, tout en préservant l'aspect structural du tissu. Cependant elle possède des effets pervers sur l'étude histologique car fréquemment, on observe :

- une modification des antigènes pouvant réduire l'affinité des anticorps pour ceux-ci;
- une réticulation du tissu pouvant nuire à la diffusion des réactifs à l'intérieur des tissus.

Interêts de la fixation :

- Immobilisation des constituants tissulaires/cellulaires ;
- Prévient l'autolyse cellulaire ;
- Prévient la putréfaction bactérienne post-mortem ;
- Permet la technique histologique et les colorations ultérieures.

Choix du fixateur :

Le choix d'un fixateur ou d'une combinaison de fixateur va être orienté par :

- le type d'observation envisagée; en effet la fixation doit préserver des détails d'autant plus fins que le pouvoir de résolution du microscope utilisé est élevé
- les structures à préserver
- les molécules à immobiliser; en effet les glucides, lipides, et protéines ne vont pas interagir de manière identique vis-à-vis d'un fixateur

Il existe deux types de fixateurs :

- ceux qui pénètrent rapidement et fixent lentement, comme le Formol.
- ceux qui pénètrent lentement et fixent rapidement comme le Bouin

Fixateurs physiques :

- **La congélation** : abaissement brutal de la température (-20° C, -50 °C). Elle empêche l'autolyse et le prélèvement durci peut être coupé. Technique rapide pour besoin de diagnostic en bloc opératoire.
- **La Lyophilisation** associe à la congélation (cryodessiccation) l'évaporation complète et sous vide de l'échantillon ; l'élimination de l'eau empêche l'hydrolyse et le maintien de petites molécules difficiles à conserver autrement.

Ces méthodes physiques exigeant un matériel couteux sont réservées à des cas particuliers ou en recherche.

Fixateurs chimiques simples :

- **Ethanol :** fixe bien les glucides, mais il a l'inconvénient de durcir les tissus et est un solvant des graisses. Il est utilisé à la concentration de 70 à 100 %. Il entre également dans la composition de nombreux mélanges fixateurs.
- **Formaldéhyde :** gaz en solution aqueuse à 40%, vendue dans le commerce sous la dénomination de « formol ». La solution à utiliser doit être encore diluée à 10%. Ce produit est très toxique.

N.B. : il existe un polymère du formol (**ParaFormAldéhyde P.F.A.**) qui permet une fixation plus fine des structures et ne contient pas de méthanol mais a l'inconvénient de déshydrater les tissus et la morphologie est moins bien préservée.

Fixateurs chimiques mélangés :

- **Liquide de Carnoy :** alcool + chloroforme + acide acétique.
- **Liquide de Bouin** : formol + acide picrique
- **Liquide de Zenker** : bichromate de K, Bichlorure de Hg, sulfate de sodium, acide acétique.

N.B. : - L'Acide acétique (0,3 à 10 %) est un bon fixateur nucléaire, mais le collagène gonfle et les mitochondries sont altérées. Pénétration rapide et les graisses ne sont pas altérées

- L'Acide picrique en solution dans l'eau ou l'éthanol donne une coloration jaune.
- L'histologie utlise beaucoup de produits toxiques, il est donc important de s'informer sur ces produits avant manipulation et de se protéger.



Il existe différents pictogrammes sur les réactifs d'histologie exprimant la toxicité par contact avec la peau et par ingestion, effet carcinogènes ou par inhalation.

Pour se protéger il faut porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux et du visage. Utiliser ces réactifs seulement dans des zones bien ventilées (sorbonnes , hottes chimiques adaptées..).

La durée de fixation est variable selon la vitesse de diffusion de l'agent fixateur, de la consistance et de l'épaisseur de l'échantillon et la quantité de fixateur utilisée doit être au moins dix fois plus importante que le volume de tissu à fixer :

- 5 minutes : pour des cellules isolées sur frottis.
- 1 à 2 heures: pour des petits fragments de l'ordre du mm.
- 1 à 2 jours: pour des blocs épais de 0,5 à 1 cm.
- 1 à 2 semaines: pour des fragments d'organe.

N.B. : Toute fixation défectueuse rend une étude difficile, voire impossible

Le rôle du fixateur est :

- précipitation, polymérisation, coagulation des protéines ;
- mise en place des liaisons covalentes ;
- tue les cellules ;
- blocage des réactions enzymatiques.

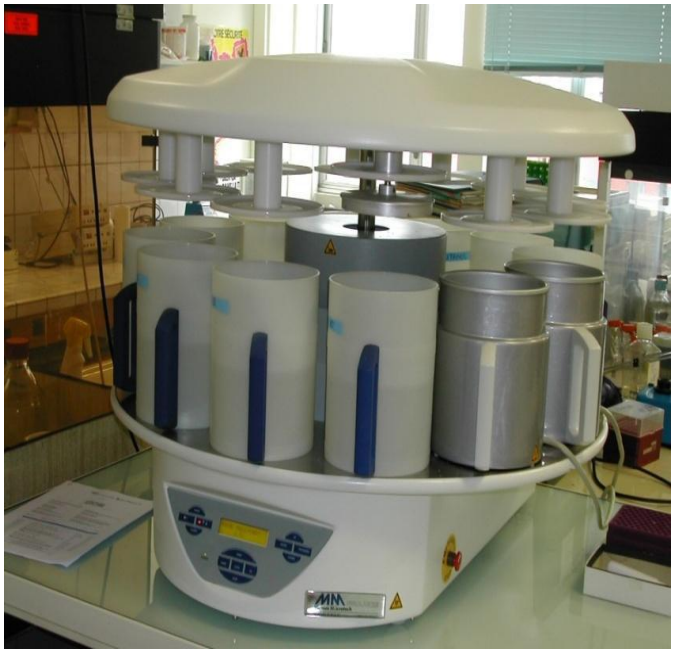
c. La déshydratation :

La déshydratation consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Elle se fait par le passage dans des bains d'éthanol de concentration croissante jusqu'à l'éthanol absolu (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, puis enfin 100°). Les tissus ne doivent séjourner dans les bains que le temps nécessaire pour équilibrer les proportions relatives d'eau et d'éthanol. Les tissus fibreux et denses sont plus difficiles à déshydrater que les autres. Une mauvaise déshydratation peut être le résultat d'un séjour trop long ou trop court dans l'éthanol. Un séjour prolongé durcit le tissu de façon excessive. Une déshydratation insuffisante empêche la paraffine de pénétrer complètement le tissu; ainsi des zones où la paraffine n'a pas pénétré ne deviennent pas suffisamment rigides pour supporter la coupe.

La substitution consiste à remplacer l'éthanol qui n'est pas miscible à la paraffine par un solvant : toluène ou xylène. Ces deux solvants sont miscibles à la fois au déshydratant et à l'agent d'inclusion, on parle d'agents «éclaircissants» (car ils ont la propriété de rendre translucides les tissus qu'ils imprégnent). Le toluène (très toxique et inflammable) est plus lent et plus tolérant que le xylène. Il faut tenir compte des propriétés pénétrantes de l'agent

utilisé au moment de déterminer la durée des bains. Les principaux effets d'une mauvaise substitution sont la production de blocs de consistance hétérogène ou inadéquate, une rétraction ou une distorsion excessive des tissus si le bain est trop prolongé.

L'imprégnation correspond à la substitution du solvant par la paraffine. Cette étape terminale est relativement agressive car la paraffine n'est liquide qu'à partir de 58°C et à cette température les protéines sont altérées. Une imprégnation trop longue peut provoquer une rétraction importante de toutes les structures et un durcissement excessif des pièces. À la fin du cycle, les paniers contenant les cassettes se trouvent dans un bain de paraffine chaude (liquide). Ils sont égouttés avant d'être transférés dans le bac d'attente du poste d'inclusion. Il existe différents appareils d'imprégnation. Des automates à imprégnation sous vide réduisent l'émission de vapeurs de solvant dans l'atmosphère de travail. Ils diminuent les risques d'erreurs humaines et assurent le traitement homogène de toutes les pièces. Ils permettent donc une meilleure imprégnation en paraffine et peuvent contenir un grand nombre de cassettes rangées dans des paniers spécialement conçus. Ils sont programmables, la plupart ont un mécanisme de retardement qui permet de régler à l'avance le programme ou le cycle choisis. Cette étape est habituellement réalisée de nuit.



Automate de déshydratation

d. L'inclusion :

Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu à examiner, celui-ci doit être très fin. Or les tissus sont mous, il faut donc leur donner une consistance solide.

Le principe de l'inclusion consiste en un enrobage de la pièce par de la paraffine liquide qui est rigidifiée permettant ainsi de conserver les rapports architecturaux des structures les unes par rapport aux autres et de lui fournir un support externe à la fois pendant et après la coupe. Il est nécessaire que la paraffine utilisée pour l'enrobage des pièces ait les mêmes caractéristiques que celle qui a servi à l'imprégnation. L'inclusion ne se fait de façon satisfaisante que si la pièce ne contient ni eau, ni solvant (éthanol) après l'imprégnation.

L'inclusion peut se faire également en résine pour les prélèvements destinés à l'observation par microscopie électronique. Pour les prélèvements congelés l'inclusion est relativement simple. L'échantillon est enrobé dans un polymère qui durcit une fois placé dans de l'isopentane refroidi soit par de l'azote liquide soit par de la carboglace.

Inclusion en paraffine :

Les cassettes placées dans le bac d'attente du postede travail contenant de la paraffinemaintenue à l'état liquide (≈ 60 °C) sont inclusesmanuellement lorsque la température de la plaquede travail a atteint 70 °C et celle de la plaque derefroidissement −15 °C.

- Sortir une seule cassette à la fois afin d'éviter tout risque d'erreur.
- Ouvrir prudemment son couvercle et l'ôter tout en vérifiant qu'il n'y a pas de prélèvement restéaccroché sur le couvercle ou entre les mousses
- Prendre un moule en acier inoxydable adapté à la taille du prélèvement (entreposé dans l'enceinte chauffée du poste de travail) et y fairecouler un peu de paraffine.
- Saisir un seul fragment à la fois à l'aide d'une pince métallique préchauffée afinque la paraffine ou le fragment n'y adhèrent. Le déposer délicatement au centre du moule tout en respectant la position initiale et éventuellement le réorienter convenablement. C'est-à-dire que le plan de section doit être positionné contrele fond du moule et certains sur la tranche de manière à ce que la coupe permette d'observer

simultanément toutes les structures, par exemple pour la peau : l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

- Poser le moule sur le disque de refroidissement afin que la paraffine au fond du moule se fige et aplatir délicatement à l'aide de pinces préchauffées le(s) fragment(s) sans les écraser ni les perforer.
- Avant que la paraffine prenne en masse, ajuster sur le moule la cassette d'identification (permettant de garantir sa traçabilité). Recouvrir de paraffine et chasser les bulles d'air éventuelles.
- Déposer immédiatement le moule sur la plaque de refroidissement et laisser figer la paraffine afin de sceller la cassette au moule.
- Après durcissement total de la paraffine et lorsque le bloc est bien froid, il est démoulé.



Mode opératoire de l'inclusion.
a. Poste d'inclusion.
b. Fragments tissulaires en cassette à inclure.

c. Inclusion des fragments tissulaires.
d. Inclusion d'un échantillon tissulaire.
e. Refroidissement et démoulage des blocs de paraffine.

L'excédent de paraffine tout autour de la cassette est retiré par grattage à l'aide d'un couteau (nontranchant) pour faciliter au moment de la coupel'insertion du bloc entre les machoires du porteobjetdu microtome.

Un bloc de tissu homogène en consistance et enélasticité est ainsi obtenu, ce caractère est d'unegrande importance pour la confection des coupes.

Les blocs sont classés sur des plaques réfrigérantespar numéro d'enregistrement (en suivant l'ordrealphabétique ou numérique) et les séries concernantun même patient sont regroupées. Les blocsen attente de coupe sont stockés dans un congélateurà −20 °C. La plupart des tissus se coupentmieux lorsqu'ils sont bien refroidis.

N.B. : l'inclusion peut être faite en barre deLeuckhardt, c'est-à-dire entre des barres métalliquesde taille variable. Ce procédé est utiliséen neuropathie pour l'inclusion des grandespièces, comme l'encéphale.

Problèmes d'enrobage

- Si les pièces sont mal incluses, le bloc peut être refondu et le prélevementréenrobé.
- Si la pièce est déposée dans un moule sans l'avoir préalablement rempli de paraffine ou si son épaisseur n'est pas suffisante, la surface de la piece y adhère et empêche la paraffine d'entrer en contact avec le fond du moule. Une fois le bloc durci, letissu peut se séparer de la paraffine qui l'entoure.
- Si les pinces sont trop chaudes, elles peuvent brûler le tissu.
- Si le bloc est refroidi trop lentement, la paraffine peut présenter une cristallisation irrégulière qui peut nuire à la confection des coupes.
- Si le bloc est refroidi trop rapidement, la paraffine située entre la pièce et le fond du moule se rétracte et donne un bloc à la surface concave.
- Si le geste n'est pas assez rapide avant de déposer la pièce dans le moule contenant la paraffine, il peut se former une épaisse couche de paraffine qui après durcissement demande un rabotage plus important au moment de la coupe.

e. La microtomie :

La microtomiea pour but d'obtenir des rubans de qualité très fins de 2 à 4 µm (micron ou millième de millimètre) et sans phénomènes de vibrations pour tous types de tissus inclus en paraffine. Cette épaisseur permet aux rayons lumineux du microscope de traverser la préparation et d'éviter les superpositions tissulaires. Ils sont confectionnés à température ambiante et nécessitent un microtome muni d'une lame de rasoir. La réalisationde coupes minces dépend du matériel à couper (dureté, elasticité), des performances du microtomeet de l'habilite manuelle du technicien.

La cryotomieest utilisée au cours d'une interventionchirurgicale ou pour certaines études quinécessitent de travailler sur des tissus frais non fixés(coloration des lipides). Le principe de la coupe encongélation est le durcissement du tissu grâceà lacongélation de l'eau qu'il contient. Les résultatsobtenus dépendent de plusieurs facteurs tels que la température de l'enceinte réfrigérée, le type detissu, l'entretien du cryostat et l'expérience du technicien. Les coupes sont moins fines(4–6 µm) et plus fragiles que celles réaliséesaprèsune inclusion. La morphologie tissulaire n'est pasd'aussi bonne qualité qu'après une fixation et uneinclusion en paraffine en raison de la congélationqui altère la morphologie cellulaire.

Mode opératoire d'une coupe à congélation :

Le tissu frais est déposé sur un plot ou porte-objetenduit d'une résine d'enrobage (transparenteà température ambiante) qui a la capacitéde durcir à basses températures (blanchissement).Dans l'enceinte réfrigérée d'un cryostat à−20 °C, la congélation est facilitée par l'utilisation d'unpiston qui accélère le refroidissement (en quelquessecondes) tout en favorisant l'obtention d'unesurface plane. Après un léger dégrossissage,la coupe au microtome est recueillie directementsur le rasoir avec une lameou elle y adhère spontanément. Lerasoir est équipé d'une plaque anti-déroulementqui empêche qu'elle ne s'enroule sur elle-mêmependant qu'on la confectionne.Après la coupe, le fragment tissulaire restant estrécupéré. Suivant les indications du pathologiste,ce fragment est soit placé en tumorothèqueen l'état, soit après dépolymérisation de larésine (à température ambiante) mis en cassette, identifié comme prélèvement extemporané pour être fixé dans un fixateur formoléavec le reste de la pièce.

N.B. : Pour éviter toute contamination entre deux prélèvements, changer la lame de rasoir, décontaminerle plot et nettoyer l'enceinte du cryostat. Refermer la vitre du cryostat pour conserver la température à−20 °C.



Coupe tissulaire au cryostat.

a. Échantillon tissulaire à l'état frais déposé sur un porte-objet.

b. Tissu durci par le froid pour réalisation d'une coupe dans l'enceinte d'un cryostat.

c. Confection d'une coupe à congélation au microtome (cryostat).

d. Récupération sur lame de la coupe à congélation

Mode opératoire d'une coupe en paraffine :

L'opérateur fait tourner une roue motriceà l'aide d'une manivelle. La lame de rasoir est fixe et le bloc se déplace verticalement pendant la confection des coupes. Il subit deux mouvements, l'un horizontal qui détermine l'épaisseur de coupe, l'autre vertical qui le fait entrer en contact avec la lame de rasoir. Après le changement du bloc ou la position de la lame de rasoir, il est nécessaire d'effectuer de nouveau un rapprochement entre le bloc et la lame, voire certains réglages.

N.B. : Danger de blessures aux mains. Les pièces enmouvement ainsi que la lame de rasoir représententun danger potentiel. Toujours mettre le levierd'arrêt de la roue motrice en position vérrouilléelors du positionnement ou du retrait de la lameou du bloc. Positionner le protège-doigts lors dela manipulation du bloc pour réduire les risquesde blessure. Etre vigilant lors de la confection descoupes. La lame de rasoir ne doit jamais rester sur lemicrotome en l'absence du manipulateur. Serrer correctementl'ensemble des vis des leviers de serrage.

- **Installation et retrait de la lame de rasoir**

Manipuler la lame de rasoir avec précaution pour ne pas endommager son tranchant qui est très délicat. Introduire la lame dans la fente derrière la plaque de pression. Bien l'ajuster puis l'immobiliser à l'aide d'un levier. Lorsque la lame est usée dans la zone de dégrossissage oude coupe, elle peut être déplacée latéralement de manière à l'utiliser sur toute sa longueur. Après usage, jeter la lame dans un conteneur réservé aux objets tranchants et/ou coupants.

- **Installation et retrait du bloc en paraffine**

Pour placer ou enlever la cassette d'entre les mâchoires du porte-objet, il suffit de tirer sur le levier. Pour un serrage parfait, il est important que les surfaces extérieures de la cassette soient exemptes de paraffine. Le porte-objet peut être orientéà l'aide de vis de réglage afin que les faces inférieure et supérieure du bloc soient parallèles au tranchant de la lame et la surface du bloc parfaitement verticale.

- **Réglage de l'angle de coupe**

Pour obtenir des coupes utilisables, il est important de trouver l'inclinaison adéquate en diminuant ou en augmentant l'angle de coupe en fonction de l'échantillon tissulaire à couper. Le réglage diffère selon le type de microtome. Il varie généralement entre 5 et 10° et se lit sur une échelle graduéesituée au niveau de la base du chariot. Eviter unangle trop plan sinon le tranchant ne peut paspénétrer dans le bloc. Eviter un angle trop raidesinon la lame se met à

vibrer de façon trop intenselors du processus de coupe, ce qui peut provoquerdes stries sur le bloc et la coupe.

- **Dégrossissage ou rabotage**

Cette étape consiste à enlever la couche de paraffinequi recouvre le tissu afin d'obtenir des coupesutiles. Le bloc doit donc être suffisammententamé pour que toute la lésion soit bien représentée.Reculer le porte-objet au maximum etveiller à une approche soigneuse entre le bloc etla lame. Pour réduire la durée du rabotage, ajusterà l'aide de la vis micrométrique l'échelle à 10 ou20 µm selon l'échantillon tissulaire. Le dégrossissageterminé, la lame de rasoir doit être changée sison fil est endommagé.

- **Confection des rubans**

La qualité du tranchant de la lame est extrêmementimportante. Il est indispensable que la faceet le dos de la lame soient propres (exempts deparaffine) pour assurer des coupes de qualité.Régler l'épaisseur des coupes en ajustant l'échelleà 3–4 µm. La régularite du mouvement de la rouemotrice facilite la confection du ruban qui s'effectuelors de la descente du bloc au contact avec lalame de rasoir. Sous l'action de la chaleur produitepar le frottement avec la lame, la paraffine fondlégèrement ce qui permet aux sections tissulairesd'adhérer les unes aux autres et de former le ruban.Dès l'apparition des premières coupes sur le platdu rasoir, saisir à l'aide d'une pince l'extrémité duruban, le tenir relevé pour éviter tout collement(afin de minimiser le contact entre les coupes et lalame du rasoir) et par légère traction le tirer délicatement.

N.B.: une élévation de la température mèneau ramollissement de la paraffine. Si le blocest réchauffé, le replacer sur une plaque réfrigéranteau congélateur ou refroidir la surface(sans retirer la cassette du porte-objet) avec unaérosol de congélation.

Les problèmes rencontrés pour confectionner descoupes ou obtenir des rubans de qualitépeuventêtre les conséquences d'une mauvaise imprégnationet/ou inclusion en paraffine des tissus, ouêtre dus à un mauvais réglage ou serrage des visdu microtome, à la lame de rasoir qui est endommagéeou sale, à la température ambiante qui esttrop élevée.

- **Étalement des rubans**

Les tissus inclus en paraffine sont très compriméspendant la coupe. Afin d'atténuer cette compressionet d'enlever du tissu les plis, il faut procéder au ramollissementde la paraffine sous l'action de la chaleur.C'est la face de la coupe (qui est dirigée vers l'arrière)qui doit être apposée sur une lame de verre car sarégularité facilite son adhésion. Le facteur essentield'une bonne adhérence des coupes est la propretédes lames de verre ainsi que la qualité des

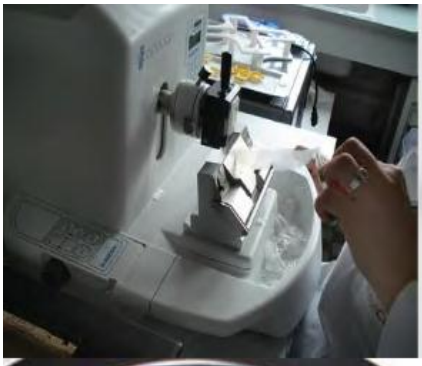
coupes.L'étalement des coupes peut être effectué soit surune platine chauffante, soit par flottaison à lasurface d'un bain-marie thermostatéà37 °C contenant de l'eau distillée et de la gélatine à1 %. La gélatine permet une meilleure adhérencedes coupes sur les lames de verre. Après usage, lagélatine à 1 % est gardée au réfrigérateur :

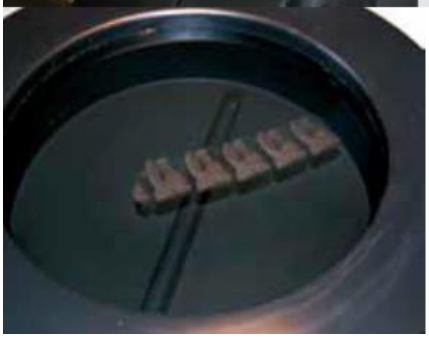
- le ruban est directement étalé sur la lamerecouverte d'eau gelatinée pour le défriper
- le ruban est déposé dans le bain-marie (courammentappelé piscine) pour l'étendre. La

section tissulaire sélectionnée est détachée duruban avec un objet lancéolé (bistouri, pic) puisrécupérée sur une lame.

Il est important de contrôler la qualité de chaquecoupe. S'assurer qu'il n'y a pas de plis ni destries, que l'intégritédu prélèvement a été coupéeet que le centrage du ruban sur la lame estparfait. La base de la lame peut être drainée surdu papier absorbant avant de la mettre à sécher àtempérature ambiante en position verticale sur unportoir. Avant d'entreprendre la coupe d'un autrebloc, vérifier qu'il ne reste aucune coupe ou petitsdépôts de paraffine dans le bain-marie.

Les rubans de coupe destinés aux colorations standard(HES) et spéciales (excepté les colorations argentiques) sont étalés sur des lames de verreordinaire. Ceux destinés à une étude immunohistochimique,d'hybridation*in situ* ou une colorationargentique sont étalés dans un bain-marie à 37 °Ccontenant de l'eau distillée puis récupérés sur deslames de verre chargées positivement facilitantainsi leur adhérence. Pour certains types de prélèvementdes niveaux de coupe sont nécessaires, lesrubans sont récupérés dans l'ordre de leur obtentionsur des lames identifiées (niveaux 1, 2, 3…).En vue de techniques complémentaires, des coupessupplémentaires peuvent être réalisées, les lamesblanches sont stockées dans des boites à l'abri dela poussière.



Réalisation d'un ruban au microtome, séchage des lames sur plaque chauffante, étalement du ruban de coupe au bain-marie.

f. La coloration :

Les tissus de l'organisme ne sont pas spontanément colorés, ce qui rend les observations difficiles.Les colorants utilisés en histologie sont plus ou moins sélectifs ; la plupart sont des composantsacides ou basiques en milieu aqueux qui forment des sels avec les radicaux ionisés des tissus. Descomposants acides sont utilisés pour les zones tissulaires basophiles, et des composants basiquessont utilisés pour les zones tissulaires acidophiles. La coloration la plus utilisée est HES : hématéine/éosine/safran. L'hématéine est une substanceplutôt basique, qui colore les noyaux en violet donc colore les acides nucléiques. L'éosine est unesubstance plutôt acide, qui colore plutôt les cytoplasmes (en rose) donc colore les protéines. Enfin,le safran colore les fibres de collagène en jaune.

Cependant pour qu'on puisse réaliser une coloration histologique, quelques étapes préparatoires à la coloration sont exigées :

Séchage des lames

Pour faciliter l'adhérence des coupes sur la lame de verre avant l'étape de déparaffinage, les lames doivent être cuites. Cette cuisson permet d'éliminer (par évaporation) la pellicule d'eau qui se trouve entre la coupe et la lame. Elle est réalisée dans une étuve dont la température doit être légèrement inférieure au point de fusion de la paraffine utilisée. Les portoirs de lames sont placés (de préférence en position horizontale) dans une étuve ventilée à 58 °C pendant 1 heure.

Déparaffinage

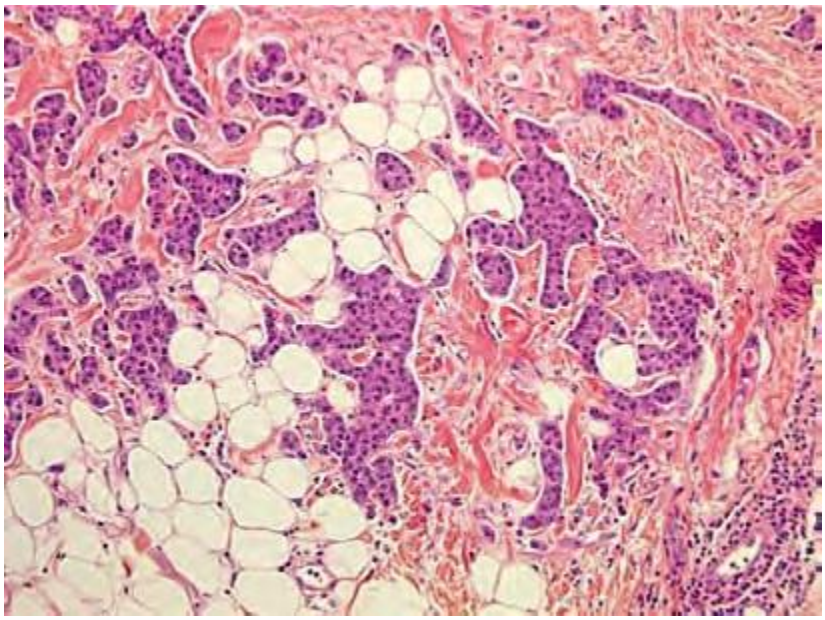
La première étape de toute coloration d'unecoupe histologique est d'éliminer la paraffine dutissu pour que les colorants puissent le pénétrer.A la sortie de l'étuve, les lames subissent (dans unautomate pour une bonne reproductibilité) undéparaffinage afin d'éliminer la paraffine à l'aided'un solvant (toluène, xylène), puis une réhydratationqui consiste à substituer progressivement lesolvant du tissu par des bains d'éthanol décroissantspour amener à l'eau. Le toluène estle solvant le plus utilisé car c'est un agent éclaircissantqui dissout le mieux la paraffine.

Etant donné que la plupart des colorants sont utilisésen solution aqueuse, leur pénétration ne peutêtre assurée que si les coupes sont imprégnées d'eau.L'hydratation a pour objet de retirer le toluène etde le remplacer par de l'eau. Les lames doivent êtreentièrement immergées dans des bains de toluèneet d'éthanol propres (non pollués par la paraffine).Les problèmes les plus fréquents reliés à l'hydratationsont le décollement des coupes et l'enlèvementincomplet du toluène.

A la fin du cycle dedéparaffinage, la coupe parait transparente alorsque l'imprégnation par l'éthanol la rend normalementopaque. On observe vite si l'hydratationn'a pas été bien faite car le tissu ne s'opacifie pasaux endroits où il reste du toluène. Lorsque ledéparaffinage a été mal fait des zones d'inégalité(ou la couleur n'a pas pris a cote d'autres régionsou la coloration s'est fixée) peuvent êtreobservéesen fin de coloration. Il peut également arriverqu'un enlèvementdéfectueux de la paraffine laisseun pigment biréfringentintranucléaire (artefact).Pour éviter ces problèmes, il est nécessaire dechanger les bains régulièrement.

Coloration

Le fait de colorer les coupes permet de visualiserles trois principaux constituants morphologiques des tissus. La coloration usuelle la plus utilisée estla coloration hématoxyline éosine safran – HES



Aspect microscopique de la colorationhématoxyline éosine safran (HES).
Vue d'ensemble (sein, carcinome canalaire infiltrant).

Elle renseigne sur la répartition, l'architectureet la structure des cellules. Lebut de cette coloration trichromique est d'associerun colorant nucléaire (noyaux bleu), un colorantcytoplasmique (cytoplasmes roses à rouges), et uncolorant du tissu conjonctif (jaune orange). Sonprincipal avantage est la coloration jaune orangédonné au collagène (constituant fibreux majeurdu tissu conjonctif) par le safran. Compte tenudu coût non négligeable du safran, une méthodebichromique – la coloration hématoxyline éosine(HE) – est parfois utilisée. L'éosine teinte en rosenon seulement les cytoplasmes mais aussi le collagèneen rose pâle et les fibres élastiques en rose vif.L'HES suffit généralementà porter un diagnosticmais peut être complétée par des colorationsspéciales.

Montage :

Les lames sont ensuite montées pour préserver les colorations, pour cela des étapes préparatoires s'imposent :

- **Déshydratation :**

Cette étape permet de préparer les lames après une coloration afin de réaliser un montage en résine. Les préparations subissent une déshydratation qui consiste à retirer l'eau des coupes

par des bains successifs d'éthanol absolu puis à un éclaircissement dans des bains de toluène, celui-ci étant miscible avec le milieu de montage. Cette étape doit être rapide car l'éthanol (surtout en faible concentration) est susceptible d'extraire plusieurs colorants des coupes. L'éthanol absolu du dernier bain peut être remplacé par l'alcool isopropylique (isopropanol C3H8O, liquide inflammable) qui a moins tendance à dissoudre les colorants, et qui possède les mêmes propriétés quele toluène, mais est moins nocif.

- **Montage :**

Cette opération (réalisée par un automate ou manuellement) consiste à fixer à l'aide d'une résine synthétique une lamelle couvre-objet sur la coupe afin de la protéger de la dégradation chimique des colorants qui s'oxydent àl'air et des bris mécaniques.

Observation microscopique :

Le pathologiste juge si l'interprétation des coupes colorées par l'HES est suffisante pour établir un diagnostic ou s'il doit être completé par d'autres techniques (histochimiques et/ou immuno-histochimiques). Pour certains cas, les premiers niveaux de coupe d'un bloc déterminé ou d'une série de blocs ne sont pas informatifs pour mettre en évidence des aspects lésionnels. De ce fait, une recoupe du bloc ou une macroscopie sur les résidus conservés en reserve (qui sont identifiéscomme un deuxiemedépart) sont demandées.

Les contraintes tissulaires particulières :

- **La décalcification:**

Dans le cadre de l'étude du tissu osseux, la dureté de celui-ci nécessite un traitement à l'aide d'agents chimiques permettant de chélater le calcium. La décalcification facilite l'obtention de coupes fines exploitables d'un point de vue microscopique.

La diversité des agents, dits décalcifiants, permet de trouver un compromis idéal entre l'objectif de l'étude et le temps imparti au processus de décalcification.

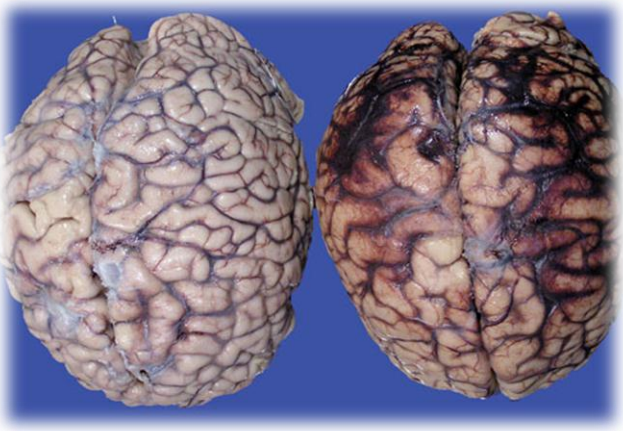
Exemple de décalcifiant : E.D.T.A. 4,13% tamponné à pH=7,4, acide nitrique à 8%.



Automate micro-ondes à décalcification KOS

- **La Fixation :**

La fixation de certains organes demande beaucoup plus de temps, à titre d'exemple, la fixation de l'encéphale est une étape longue, qui nécessite une fixation de 6 à 8 semaines.



- **La cryoprotection:**

Dans le cadre de l'étude du tissu que l'on souhaite congeler, il peut dans certains cas être nécessaire de pratiquer la cryoprotection. En effet celle-ci va permette, par l'intermédiaire de diverses substances, d'empêcher ou retarder l'apparition de cristaux de glace : saccharose, dextran, glycérol, DMSO23 etc.

Elles peuvent cependant provoquer, si les tissus sont peu ou pas fixés, des perturbations osmotiques avec leur cortège d'artefacts.

Exemple de cryoprotecteur :

Le sucrose dissout en P.B.S. pH=7,4 en gradient progressif.

2. Microscopie électronique :

La microscopie électronique (ME) repose exactement sur les mêmes principes que la microscopie optique mais unfaisceau d'électrons remplace le faisceau de photons et les prélèvements s'effectuent sous vide ; onutilise d'autre part des lentilles magnétiques.
La préparation des tissus comporte les mêmes grandes étapes qu'en microscopie optique, mais avec des adaptations dues à la contrainte de rapidité qui est encore plus importante pour la fixation.

a. Le prélèvement :

Il est impératif que le tissu soit fixé aussitôt prélevé. Le médecin qui souhaite demander une étude en microscopie électronique doit s'assurer qu'il y a bien du fixateur dans son service. Le fragment tissulaire doit être rapidement plongé dans le fixateur (glutaraldéhyde à 2% stocké à +4°C) afin d'éviter les chocs osmotiques et le contact avec l'air qui altèrent l'ultra-trastructure cellulaire et acheminé directement au laboratoire d'anatomie et cytologie pathologiques.

b. La fixation :

Le fixateur utilisé est le glutaraldéhyde (plusieurs bains, 1heure au total), et l'on effectuegénéralement une post-fixation grâce à l'acide osmique (tetroxyde d'osmium) afin d'obtenir de
meilleures observations.

- **Première fixation dans le glutaraldéhyde à 2 %**

Travailler sous hotte. A l'aide d'une pince, sortir le prélèvement du pilulier contenant le fixateur et le déposer sur la plaque en téflon. Recouvrir le tissu avec quelques gouttes de fixateur afin qu'il ne se dessèche pas.
Avec une lame de rasoir dégraissée avec de l'alcool, couper en petits fragments de 1 à 3 mm maximum. A l'aide d'une pipette en plastique, aspirer le fixateur et une vingtaine de fragments pour les remettre dans le flacon.
N.B. : pour un tissu tumoral, privilégier les fragments concernant les zones denses et blanchâtres. Eliminer les zones hémorragiques.Eliminer le reste du prélèvement dans l'ecobox. La lame de rasoir est jetée dans les boites à objets tranchants. Nettoyer la plaque de téflon avec la pissette d'alcool. Mettre le flacon contenant le prélèvement à fixer une heure dans le réfrigérateur.

Il n'y a pas de sur-fixation avec le glutaraldéhyde ,l'échantillon peut éventuellement passer la nuit dans le fixateur si on ne peut pas aller plus loin dans la technique.

- Poumon :

L'air contenu dans le poumon ralentit la pénétration du fixateur. Il faut donc augmenter le temps de fixation jusqu'à deux heures. Si le prélèvement est suffisamment volumineux, le maintenir immergé à l'aide d'une épingle plantée dans de la cire dentaire.

Une fois la fixation terminée, éliminer le tissu endommagé par l'épingle.

- Cerveau :

Utiliser une solution de glutaraldéhyde à 3 % et prolonger la fixation jusqu'à quatre heures.

- Muscle :

- Un fragment musculaire est épinglé sur de la cire dentaire et plongé dans le fixateur.
- Mettre au réfrigérateur 20 minutes.
- Sur une plaque en téflon, retirer les épingles et éliminer la cire dentaire.
- Recouvrir de quelques gouttes de fixateur.
- A l'aide d'une lame de rasoir couper les deux extrémités du fragment musculaire altérées par les épingles.
- Débiter en cinq fragments en forme de bâtonnet de 1 mm d'épaisseur maximum.
- Couper chaque fragment au tiers de sa longueur.
- On obtient cinq bâtonnets courts en vue de l'orientation longitudinale des fibres et cinq bâtonnets longs en vue de l'orientation transversale.
- Mettre le flacon contenant les fragments de muscle à fixer une heure dans le réfrigérateur

- Peau :

- Poser la biopsie sur les lames du hachoir, l'épiderme orienté vers le haut.
- Glisser les dents du peigne entre les lames.
- Appuyer sur la biopsie.
- Récupérer les tranches obtenues à l'aide d'un pic.
- Plonger dans le fixateur.
- Mettre le flacon contenant les prélèvements de peau à fixer une heure dans le réfrigérateur.

- Prélèvement congelé :

- Plonger le fragment congelé dans le fixateur.
- Attendre 30 minutes avant de le couper en petits fragments .
- Mettre le flacon contenant les prélèvements à fixer une heure dans le réfrigérateur
- Cette technique donne une architecture ultra-structurale de qualité médiocre.

- Prélèvement formolé :

- Couper en petits fragments le prélèvement
- Eliminer le fixateur à l'aide d'une pipette pasteur.
- Remplir le pilulier avec 3 ml environ de liquide de rinçage (tampon cacodylate 0.1 M).
- Effectuer 3 bains de 10 minutes chacun.
- L'échantillon peut séjourner 48 heures à +4°C dans le liquide de rinçage si on ne peut pas aller plus loin dans la technique.
- Cette technique donne une architecture ultra-structurale de qualité médiocre.

- Prélèvement inclus en paraffine

❖ Cette technique donne une architecture ultra-structurale de mauvaise qualité.

❖ Préférer la réserve formolée s'il n'a pas été réalisé de prélèvement pour la microscopie électronique à l'état frais.

❖ A l'aide d'une lame de rasoir, prélever dans le bloc BH (histologie) une portion de tissu. Débiter en fragments de 1mm3 .

❖ Effectuer les changements de bains suivants :

- Déparaffiner dans le xylène 1 heure.
- Xylène/éthanol : 30 minutes.
- Ethanol : 3x 20 minutes.
- Ethanol+ 25% de liquide de rinçage : 20 minutes.
- Ethanol+ 50% de liquide de rinçage : 20 minutes.
- Ethanol+ 75% de liquide de rinçage : 20 minutes.
- Remplir le pilulier avec 3 ml environ de liquide de rinçage (tampon cacodylate 0.1 M).
- Effectuer 3 bains de 10 minutes chacun.

L'échantillon peut séjourner 48 heures à +4°C dans le liquide de rinçage si on ne peut pas aller plus loin dans la technique.

- Prélèvement calcifié :

- Mettre le prélèvement deux heures dans le réfrigérateur à fixer.

- Eliminer le fixateur à l'aide d'une pipette pasteur.
- Remplir le pilulier avec 3 ml environ de liquide de rinçage (tampon cacodylate 0,1M+ saccharose 0,16M – PH 7,3 – 360 mOsm).
- Effectuer 3 bains de 10 minutes chacun.
- Remplacer le dernier bain de rinçage par 3 ou 4 ml de milieu décalcifiant (EDTA 0,1M dans du tampon cacodylate 0,1M contenant 0,83% de glutaraldéhyde) et laisser le tissu se déminéraliser dix jours au réfrigérateur.

- **Rinçages dans le tampon cacodylate 0,1M**

- Eliminer le fixateur à l'aide d'une pipette pasteur.
- Remplir le pilulier avec 3 ml environ de liquide de rinçage.
- Effectuer 3 bains de 10 minutes chacun.
- L'échantillon peut séjourner 48 heures à +4°C dans le liquide de rinçage si on ne peut pas aller plus loin dans la technique.

- **Post-fixation dans le tétroxyde d'osmium à 2%**

- Fixer 1 heure à +4°C (ne pas dépasser 1h30 : danger de sur-fixation)
- Eliminer le fixateur à l'aide d'une pipette pasteur Rincer 5 minutes dans l'eau distillée
- Plonger le fragment dans l'acétate d'uranyle à 0,5% si on ne peut aller plus avant, un stockage de 72 heures est possible à 4°C.

c. La déshydratation :

La déshydratation est effectuée dans l'éthanol selon le protocole suivant :

- Ethanol à 70% dans l'eau distillée : 3x10 min à température ambiante.
- Ethanol à 95% : 3x10 min.
- Ethanol pur (sur gel de silice): 3x20 min.
- Acétone/éthanol (volume/ volume) : 30mn.
- Acétone pur : 1 heure

Substitution en résine époxy (sortir les seringues de résine du congélateur 1heure avant leur utilisation) :

- Imprégnation standard :

- 1er bain: résine diluée à 50% dans l'acétone = 1h (sous agitation),
- 2 ème bain: résine pure = 1h (sous agitation),
- 3 ème bain: résine pure = 1h (sous agitation) dans un pilulier propre,
- 4 ème bain: résine fraîche, non congelée = 1 nuit dans un pilulier propre et dans la pompe à vide.

- Imprégnation temps long pour prélèvement "dur" (épiderme, nerf, prélèvement fibreux) :

- 1 er bain: résine diluée à 25 % dans l'acétone = 4 heures
- 2 ème bain: résine diluée à 50 %= 1 nuit
- 3 ème bain: résine diluée à 75 % = 4 heures
- 4 ème bain: résine pure = 1 nuit dans la pompe à vide.

d. L'inclusion :

Pour l'inclusion, on utilise des résines synthétiques d'époxy. Celles-ci présentent les avantages suivants :

- stables au bombardement électronique,
- peu de rétrécissement,
- durcissement uniforme.

Les désavantages sont que ces résines sont très visqueuses et présentent une compatibilité limitéeavec l'éthanol.

Mode opératoire :

- Sortir la résine du congélateur 1h avant son utilisation.
- Placer les gélules sur les portoirs.
- Verser 1 goutte de résine au fond de chaque gélule.
- Déposer à l'intérieur un fragment de prélèvement à l'aide d'une pointe montée.
- Emplir la gélule jusqu'à 2mm du bord.
- Inscrire sur une bandelette de papier d'environ 4mm de large sur 2 cm de long le Numéro de l'examen et un sous numéro pour la gélule.
- Faire en général dix gélules.
- Mettre les portoirs dans l'étuve à 60°C pendant 48 heures pour la polymérisation de la résine .

- Laisser refroidir les gélules au moins deux heures à température ambiante avant de procéder au fraisage.

Cas particuliers:

- biopsie rénale : Inclure la totalité de la biopsie.
- Muscle : Inclure 5 fragments (les bâtonnets longs) en transversal dans des moules spéciaux.
- Peau : Inclure 20 fragments.



Inclusion en résine Epoxy

e. L'ultra-microtomie :

Les coupes sont réalisées sur un ultra-microtome avec rasoir de verre ou de diamant : on obtient descoupessemi-fines d'environ 0.5 à 1 mm d'épaisseur ainsi que des coupes fines d'environ 60 à 100 µm d'épaisseur.

Ces coupes sont ensuite déposées sur de petites grilles de cuivremesurant quelques centimètres de diamètre, et l'observation se fait entre les barreaux.



Ultra-microtome

f. Contraste :

Il n'existe pas de techniques de coloration en microscopie électronique, mais des techniques de contraste des tissus.

On utilise fréquemment l'acétate d'uranyle qui contraste les nucléoles et le citrate de plomb qui contraste les membranes

N.B. : l'acétate d'uranyle et citrate de plomb sont des sels de métaux lourds.

Observation microscopique :

Un microscope électronique emploie la propagation des électrons à laquelle est associée une longueur d'onde beaucoup plus courte que celle de la lumière. Une gerbe d'électrons est condensée sur une partie d'échantillon (de l'ordre de quelques nanomètres au dixième de millimètre).

Une lentille magnétique permet de former une image de l'objet avec les électrons qui interagissent fortement avec la matière traversée.

Le pouvoir de résolution du microscope électronique (pouvant atteindre un grossissement de × 5 000 000) permet de faire une étude détaillée de l'ultrastructure cellulaire et tissulaire.

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

- Le microscope à transmission est un appareil qui bombarde l'objet par des électrons qui forment une image très agrandie de l'objet en noir et blanc sur un écran fluorescent ou une plaque photographique.L'émission des électrons est produite par chauffage d'un filament de tungstène ou d'un cristal d'hexaborure de lanthane.

- Le microscope à balayage est un appareil qui balaie l'échantillon d'un faisceau d'électrons pour donner une impressiond'image en pseudo-3D.

II. Les différents types de coloration :

Il existe deux types de coloration, les colorations de routine ou topographiques et les colorations spéciales ou histochimiques.

Coloration standard

Les colorations standard colorent un type de charge. Elles permettent de voir la morphologie de la cellule, la position du noyau et sa forme, la structure d'un tissu. Ainsi, on peut déterminer le nombre de types cellulaires dans le tissu. Selon les conditions particulières de chaque laboratoire, une même méthode peut avoir des variantes deprocédés techniques, de formules de colorant, de concentrations des solutions, de temps, etc.

a. Hématoxyline éosine safran (HES)

Coloration signalétique qui permet de mettre en évidence les noyaux, les cytoplasmes et les fibres de collagène en leur faisant capter des colorants de façon sélective afin de se faire une idée de la topographie générale d'un tissu. Temps de réalisation ≈ 3 minutes pour l'HES rapide, 7 minutes pour l'HES directe, 35 minutes avec déparaffinage pour l'HES standard, 40 minutes pour l'HES os.

Méthode trichromique qui fait agir successivement trois colorants. Une solution aqueuse d'hématoxyline (nucléaire), une solution aqueuse d'éosine (cytoplasmique) et une solution alcoolique de safran (collagène). La coloration nucléaire est progressive. Après l'hématoxyline (de Mayer), une différenciation rapide dans une solution de carbonate de lithium à saturation (eau lithinée) ou simplement à l'eau courante est réalisée afin debleuir les noyaux et faciliter la fixation des colorants. La coloration cytoplasmique est régressive. Après l'éosine, l'excès est rincé à l'eau courante, une différenciation est réalisée dans des bains successifs d'éthanol jusqu'à l'éthanol absolu. Les passages en éthanol préparent l'action du safran qui se diffuse dans tout le tissu grâce à un phénomène d'absorption. En fin de coloration, les lames doivent être immergées dans un bain de solvant (toluène, xylène) pour le montage. En aucun cas elles ne doivent sécher à l'air libre, car les colorants risquent de précipiter dans le tissu.

Résultats : l'intensité de la coloration dépend de nombreux facteurs, incluant la proportion relativedes colorants, mais surtout l'épaisseur de la coupe tissulaire. La coloration est plus intense sur les coupes épaisses :

• cytoplasme : rose (violet s'il contient de grandes quantités d'ARN) ;

• noyau : bleu violacé ;

• collagène : jaune orangé ;

• fibre musculaire : rouge vif ;

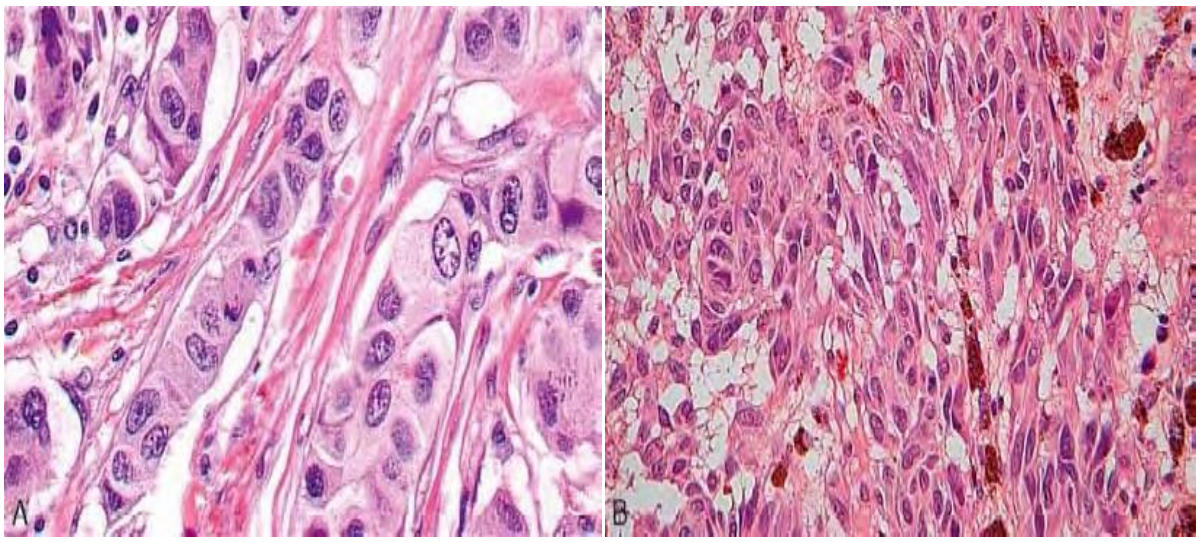
• fibre élastique : rose ;

• hématie : rouge vif ;

mucus, substance fondamentale du cartilage(chondroide) ou de l'os (ostéoide) : jaune orangé.

N.B. : l'éosine peut être remplacé par l'érythrosine qui donne une coloration plus vive et plus résistante que celle de l'éosine.

Vérifier quotidiennement la qualité de la premièrecoloration au microscope. Filtrer l'hématoxyline.Changer régulièrement les bains des alcools(saturés par les colorants), le bain d'hématoxyline2 fois par semaine, celui de l'éosine 1 fois par semaine etcelui du safran tous les 2 mois, sinon compléterle niveau.



Coloration hématoxyline éosine safran HES,

A : grossissement X40, B : présence de mélanine (pigments bruns)

b. May-Grünwald-Giemsa (MGG)

Coloration qui utilise les affinités tinctoriales différentes du May-Grunwald (éosinate de bleu de méthylène) et du Giemsa (éosinate d'azur de méthylène) afin de colorer de façon très nuancée les noyaux, les cytoplasmes et les granulations. Ces deux colorants sont solubilisés dans l'alcool méthylique et sont de ce fait inactifs, c'est le contact de l'eau qui leur donne un pouvoir colorant. Les sels se dissocient alors en colorant acide rouge (l'éosine) et basique bleu (azur de bleu de méthylène). L'éosinate de bleu de méthylène colore le cytoplasme. L'éosine colore les éléments basiques (acidophiles et éosinophiles) en rose, et le bleu de méthylène colore les éléments acides (basophiles) en bleu. L'éosinate d'azur de méthylène colore les

noyaux, les granulations azurophiles et basophiles. Pour la dilution des colorants, l'eau doit être tamponnée.

Dans tous les cas, cette eau ne se conserve pas et doit être préparée chaque jour. Un pH acide favorise les teintes rouges, tandis qu'un pH basique favorise les teintes bleues.

Temps de réalisation ≈ 30 minutes.

Méthode qui permet après fixation dans l'alcool méthylique (solvant des colorants) l'action successive de deux colorants neutres. Chacun d'entre eux contient des ions colorés acides (éosine) et basiques (bleu et azur de méthylène) qui se fixent sur les éléments cellulaires complémentaires. En fin de coloration, les lames sont rincées à l'eau courante jusqu'à l'élimination de l'excès de colorant. Le dos de chaquelame ainsi que les contours du frottis sont essuyés soigneusement avec un papier absorbant. Les laisser sécher en position verticale sur un portoir à température ambiante. Après séchage complet, les mettre dans un bain de solvant (toluène) pour le montage.

Résultats :

• cytoplasme :

– acidophile : rose ou rouge clair,

– basophile : bleu ciel au bleu foncé ;

• noyau :

– basichromatine : violet,

– oxychromatine : rose ;

• nucléole : bleu,

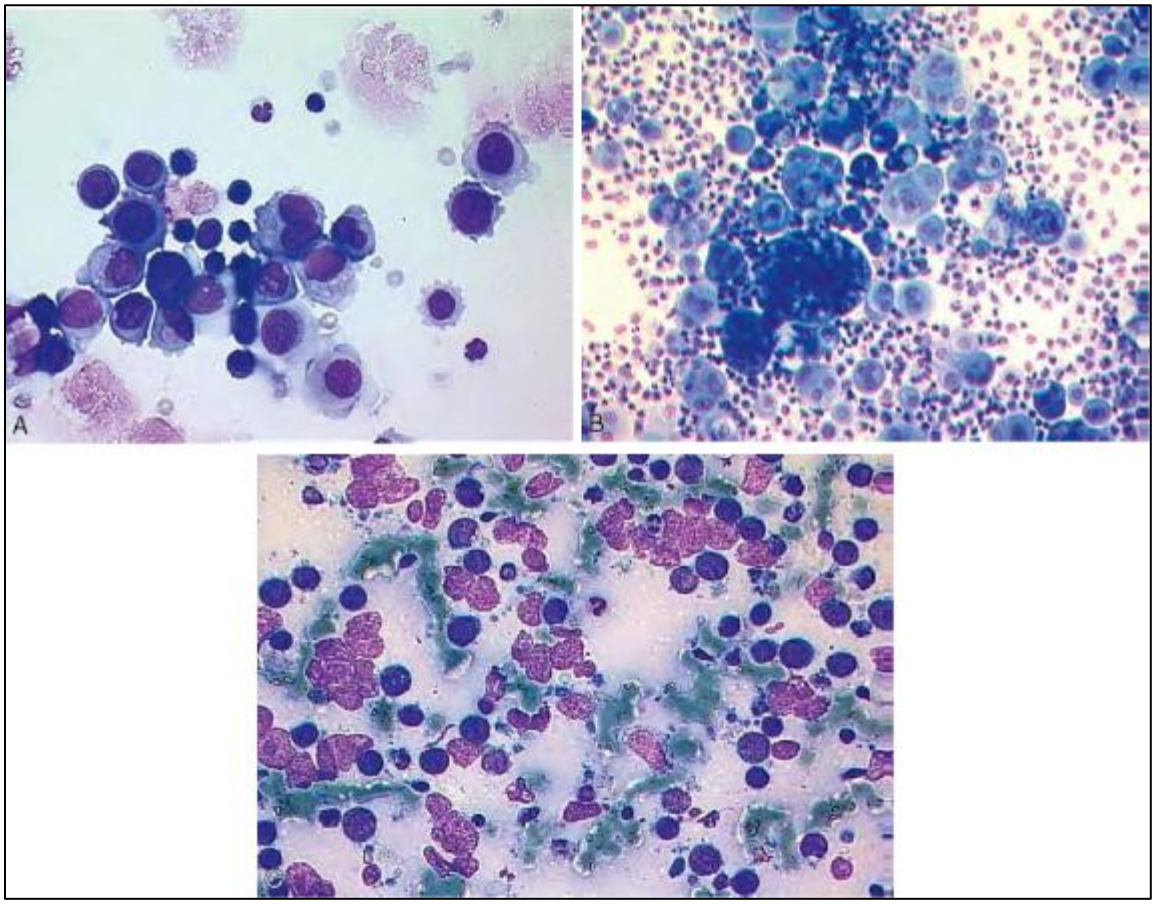
• hématie : grisâtre,

• kératine : bleu intense,

• mucus : bleu pâle.

N.B. : L'emploi de l'eau de ville est fortement déconseillécar des variations imprévisibles et incontrôlables peuvent survenir compromettant le résultat de la coloration d'où l'interêt d'utiliser une eau tamponnée. Préparer quotidiennement la solution de Giemsa. Réajuster régulièrement le niveau des bains de May-Grunwald purs et dilués et les changer 1 fois/mois. Conserver tous les soirs ces solutions au réfrigérateur à+ 4 °C.

Dégraisser les lames (sauf les étalements en couche mince) dans du toluène (sous hotte en fonctionnement) avant la coloration.



May-Grünwald-Giemsa (MGG).

a. Cytocentrifugation (Cytospin®) d'un LCR (méningitecarcinomateuse).

b. Étalement manuel après centrifugation d'un liquide pleural(mésothéliome malin).

c. Étalement manuel d'une cytoponction ganglionnaire (lymphomede Burkitt).

c. Coloration Papanicolaou

Coloration pentachrome de référence en cytologie gynécologique et dans les examens de cellules épitheliales. Elle a pour avantage de dessiner très finement le détail des structures nucléaires et de bien mettre en évidence la différenciation cytoplasmique. Temps de réalisation ≈ 30 minutes.

Méthode qui fait appel à une action polychromatique résultant de l'intervention d'un colorant nucléaire en phase aqueuse, l'hématoxylinede Harris, et de deux colorants cytoplasmiques en phase alcoolique, l'orange G et la solution de polychrome (mélange de vert lumière, brun de Bismarck et d'éosine).La coloration se fait en fonction de l'affinité tinctoriale des cellules.

L'hématoxyline de Harris colore les noyaux en gris bleu ou en violet selon la densité en ADN, l'orange G colore le glycogène en brun clair et la kératine en orange vif, et le polychrome (EA 50) colore le cytoplasme des cellules éosinophiles en rose et des cellules cyanophiles en bleu.

La réhydrationest obligatoire car elle prépare l'action du colorant nucléaire. L'eau chlorhydrique à 37 % (mélange d'HCl et d'eau déminéralisée) est utilisée pour la différenciation nucléaire. L'alcool ammoniaque (mélange à 3 % d'ammoniaque concentré dans l'éthanol 70°) fixe la coloration nucléaire et prépare l'action des colorants en solution alcoolique. En fin de coloration, les lames doivent être immergées dans un bain de solvant (toluène) pour le montage.

Résultats :

• cytoplasme des cellules :

– superficielle (acidophile) : rose à rouge orangé,

– intermédiaire : bleu-vert,

– profonde (basophile) : vert plus foncé ;

• noyau : bleu ou violet foncé ;

• bactérie, *Trichomonas* : bleu foncé ;

• hématie : rouge orangé ;

• spore : légèrement rosé ;

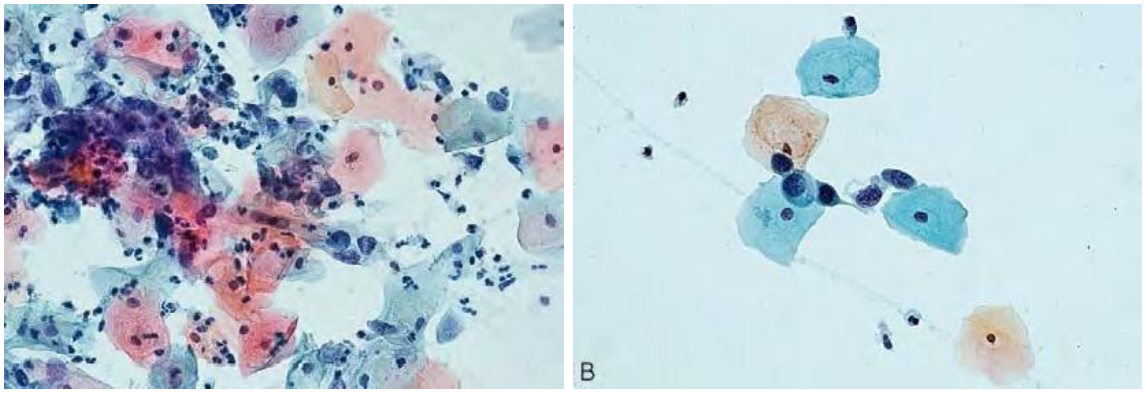
• nucléole : bleu foncé ;

• kératine : orangé à orange vif.

N.B. : Le vieillissement des colorants dépend de la quantité de lames colorées dans les mêmes bains de solution. Il est annoncé par la disparition progressive des affinités tinctoriales des cytoplasmes. Si tous les colorants sont changés, l'on obtient dans un premier temps des frottis trop colorés.

Filtrer quotidiennement l'hématoxyline. Changer régulierement les bains des alcools et du toluène.Compléter le niveau de l'orange G et du polychrome. Changer l'eau chlorhydrique et l'alcoolammoniaque 1 fois/mois, sinon ajuster les niveaux.

Avant la coloration, immerger les lames fixées par un spray (laque) dans un bain d'eau distillée pour éliminer le film protecteur.



Frottis cervical (lésion de haut grade) coloré par la méthode de Papanicolaou.

a. Image microscopique d'un étalement conventionnel.

b. Image microscopique d'un étalement en couche mince (LBC).

d. Autres colorations d'utilisation fréquente :

L'histologie dispose d'un nombre considérable de colorations spéciales et les variantes techniques possibles sont presque infinies.

- **Bleu alcian (BA)**

Cette coloration permet la mise en évidence des mucosubstancesà caractère acide. Une mucosubstance est considerée comme un constituant riche en sucres.

• Utilité : adénocarcinome mucosecrétant, liposarcome, tumeur myxoide (chondrosarcome myxoide).

• Témoin : digestif (côlon).

• Temps de réalisation ≈ 40 minutes.

Le bleu alcian est un phtalocyanine cuivrique contenant des groupements isothiouroniums (chargés positivement) qui se lient aux anions (sulfates et carboxyles) de la structure grace à des liaisons électrostatiques. La colorabilité des diverses substances dépend du pH de la solution utilisée.

Le BA à un pH voisin de 1 colore les glucides sulfatés(mucus intestinal).

Le BA à un pH entre 2,5 et 2,6 colore les glucides à groupes carboxyliques acides (matrice extracellulaire).

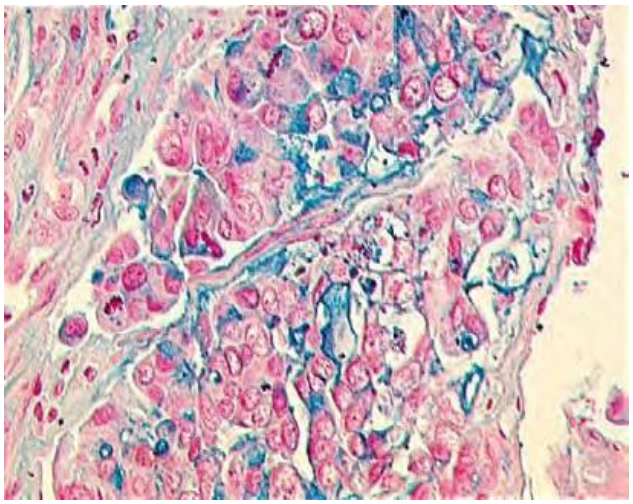
Contre-colorer par le rouge nucléaire, déshydrater et monter en milieu résineux.

Résultats :

• substance réactive : bleu turquoise ;

• fond : rose ;

• noyau : rouge.



Bleu alcian. Mucosécrétions en bleu turquoise (coupe tissulaire d'un ovaire).

- **Coloration Giemsa*Helicobacter***

La coloration Giemsa*Helicobacter*est une coloration de Giemsa peu differenciée qui permet de mieux voir les bactéries spiralées *(Helicobacter).*

Monter en milieu résineux.

• Utilité : cancers et lymphomes gastriques.

• Temps de réalisation ≈ 35 minutes.

• Résultats : *Helicobacter*bleu foncé.

- **Coloration de Gram**

Cette coloration permet la mise en évidence de plusieurs bactéries. Certains germes restent insensibles à cette coloration, c'est le cas des mycobactéries(famille à laquelle les agents de la tuberculose et de la lèpre appartiennent).

Elle est rarement utilisée en pathologie tumorale.

• Gram (positif) : streptocoque, staphylocoque.

• Gram (négatif) : pneumocoque.

• Témoin : appendice, intestin.

• Temps de réalisation ≈ 45 minutes.

Méthode basée sur la capacité que certaines bactéries ont de retenir un complexe violet cristal/ iode (de couleur bleue) lorsqu'elles sont soumises à une différenciation par l'acétone ou l'alcool et une coloration à l'aide d'un colorant basique (lafuchsine).

Monter en milieu résineux. L'iode est un agent de rétention des colorants.

Résultats :

• bactérie Gram (positif) : bleu ;

• bactérie Gram (négatif) : rouge ;

• noyau : rouge ;

• fond : jaune.

- **Coloration Grocott**

Le Grocott est une méthode basée sur la teneur particulièrement élevée en glucides de la paroi des champignons et la mise en évidence d'autres micro-organismes.

• Utilité : bactéries (*Actinomyces*, *Nocardia*), mycose (*Candida*), parasite *(Pneumocystiscarinii)*.

• Témoin : poumon (champignons).

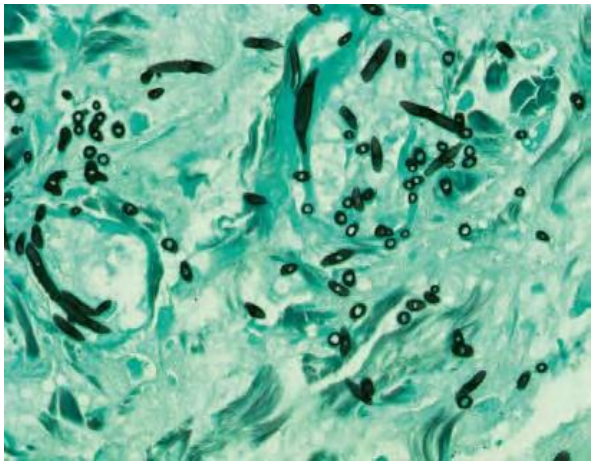
• Temps de réalisation ≈ 2 heures.

Les groupes reactifs de la composante glucidique des champignons sont oxydés par l'acide chromique et les aldéhydes libérés sont mis en évidence par réduction d'un complexe d'argent–méthénamine(héxaméthylènetétramine). Colorer le fond par une solution de vert lumière et monter en milieu résineux.

Résultats

- contour du champignon : noir ;
- partie interne : grisâtre ;
- fond : vert pâle ;
- filament mycélien et levure : noir ;
- mucine : gris foncé.

N.B. : Ne pas utiliser d'objet métallique.



Grocott. Aspergillose en noir (coupe tissulaire du poumon).

- ***PeriodicacidSchiff*(PAS)**

Cette coloration permet la mise en évidence du glycogène (forme de stockage des hydrates de carbone dans les cellules, comme les hépatocytes et les cellules musculaires), des mucines (mucosubstancesépitheliales), des mucopolysaccharides (mucosubstances conjonctives) neutres, ainsi que les filaments et spores mycéliens.

• Utilité :

- chondrosarcome, PNET, rhabdomyosarcome, sarcome à cellules claires, sarcome alvéolaire des tissus mous, sarcome d'Ewing, tumeur vitelline.
  Positivité variable dans les
  carcinomes qui oriente vers une origine glandulaire (adénocarcinome).
- Mycose (aspergillose, candidose).

• Témoin : digestif (côlon), mais cette coloration possède un témoin interne (polynucléaires).

• Temps de réalisation ≈ 1 heure. Un agent oxydant, l'acide périodique, est utilisé pour transformer des groupes glycols en aldéhydes. Le réactif de Schiff (solution de fuchsine basique), décolore par l'acide sulfureux (ou un lavage à l'eau courante) qui réagit avec les aldéhydes libres, forme un produit de condensation de couleur rouge. Contre-colorer par l'hématoxyline, déshydrater et monter en milieu résineux.

Résultats :

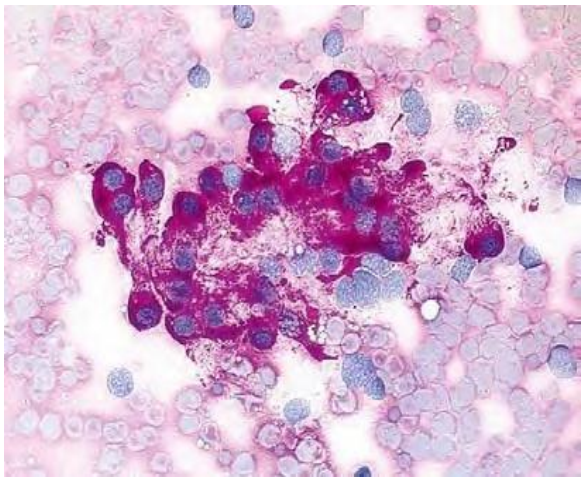
• substance réactive : rose à rouge violacé plus oumoins intense ;

• noyau : bleu.

N.B. : L'acide périodique (HIO4) est un oxydant sélectif qui rompt les liens entre deux carbones d'un certain nombre de groupes chimiques tels que les groupes 1,2-glycol, 1,2-hydroxyle, amine. Un contact trop prolongé avec l'acide périodique de même qu'une solution

dont le pH est trop acide entraînent des faux positifs, car il y a suroxydation des aldéhydes en carboxyles.

Le réactif de Schiff doit être parfaitement limpide et incolore sinon le jeter. Cette solution se conserve mieux au réfrigérateur à+ 4 °C dans un flacon opaque à la lumière et bien bouché.



PAS positif. Glycogène intracytoplasmique en rose violacé

- ***PeriodicacidSchiff*/bleu alcian (PAS/BA)**

La coloration PAS/BA est une coloration combinée dans laquelle le PAS met en évidence les glucides neutres et le BA, les glucides acides.

• Utilité : lésion du côlon.

• Témoin : digestif (côlon).

• Temps de réalisation ≈ 1 heure.

La différenciation se fait au niveau des mucopolysaccharidesacides faiblement sulfatés colorés par le BA, et les mucopolysaccharides neutres et colorés par le PAS.

Contre-colorer par l'hématoxyline, déshydrater et monter en milieu résineux.

Résultats :

• polysaccharide acide PAS (négatif) : bleu ;

• polysaccharide neutre : rouge ;

• noyau : bleu sombre.

- **Coloration Perls**

Cette coloration permet la mise en évidence de dépôts ferriques (Fe+++) dans des érythroblastes et des macrophages (sidérophages)

• Utilité : embolie pulmonaire, hématome en résorption, différentiel des autres pigments.

• Témoin : hématome en résorption, rate.

• Temps de réalisation ≈ 1 heure.

En milieu acide, les ions ferriques réagissent avec le ferrocyanure de potassium en formant un précipité insoluble.

Ce précipité de ferrocyanure ferrique, de coloration bleue (bleu de Prusse), met en évidence un pigment, l'hémosidérine.

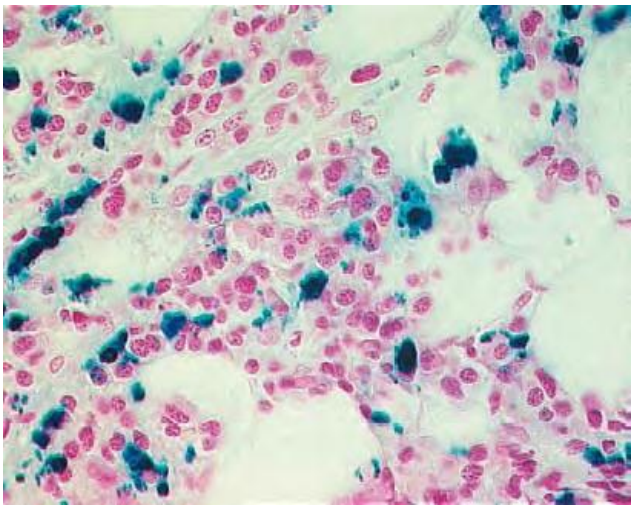
Contre-colorer par le rouge nucléaire, déshydrater et monter en milieu résineux.

Résultats :

• fer ferrique et hémosidérine : bleu à bleu-vert ;

• noyau : rouge.

NB :les mélanges de ferrocyanure de potassium et l'acide chlorhydrique doivent être préparés extemporanément et avoir une coloration jaune. Jeter toute solution présentant une teinte légèrementverdâtre. Ne pas utiliser d'objet métallique.



Perls. Surcharge ferrique en bleu (macrophages). Coupe tissulaire ostéomédullaire.

- **Réticuline**

La réticuline permet la mise en évidence des fibres de réticuline du stroma (basée sur l'argyrophilie des fibres) et de préciser l'architecture des tumeurs. Les fibres de réticuline se présentent comme des fibrilles très minces, très ramifiées et anastomosées (fibres grillagées) au microscope optique

Elles peuvent constituer des réseaux à mailles plus ou moins serrées.

• Utilité : hémangiopéricytome, synovialosarcome.

• Les prélèvements ont un témoin interne.

• Temps de réalisation ≈ 1 heure.

L'oxydation des fibres de réticuline fait qu'elles deviennent capables de réduire les sels d'argent qui précipitent à leur contact. Le précipité est stabilisé et insolubilisé (comme une photographie) par un sel d'or et du thiosulfate de sodium.

Contre-colorer par le rouge nucléaire, déshydrater et monter en milieu résineux.

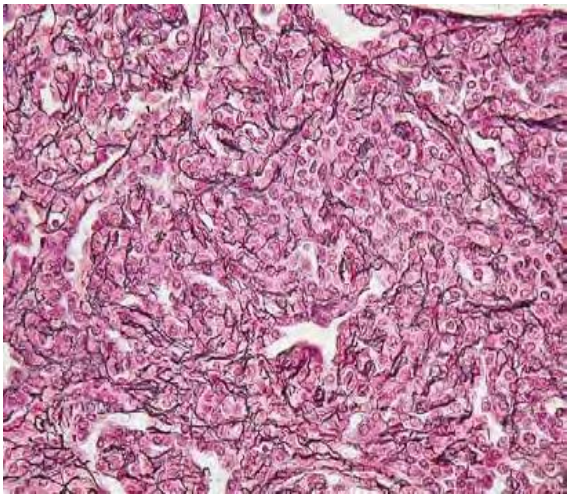
Résultats :

• fibre de réticuline (collagène type III) : noir intense ;

• fibre de collagène I : brun pourpre ;

• noyau : rouge rosé.

N.B. : ne pas utiliser une solution de nitrate d'argent ammoniacal qui a plus de 10 jours et d'objet métallique.



Réticuline. Fibres de réticuline en noir. Coupe tissulaire du poumon.

- **Coloration Trichrome de Masson**

Le Trichrome de Masson permet la mise en évidence des fibres de collagène (ces fibres se présentent comme des bandes ondulées et non anastomosées au microscope optique). Cette coloration trichromique est utilisée pour obtenir des contrastes plus vifs entre cytoplasmes et collagène

• Utilité : léiomyosarcome (striations longitudinales), rhabdomyosarcome (striations transversales).

• Cette coloration ne nécessite pas de témoin.

• Temps de réalisation ≈ 50 minutes.

La combinaison successive d'une laque nucléaire (hématoxyline), d'un colorant cytoplasmique (fuchsine acide faible/ponceau de xylidine) et d'un colorant du tissu conjonctif (bleu d'aniline ou vert lumière), tous deux acides forts, donne un boncontraste.

Déshydrater et monter en milieu résineux.

Le bleu d'aniline donne souvent une coloration un peu plus empâtée mais permet une meilleure visualisation des fines fibrilles de collagène, il est généralement utilisé pour la neuropathie. Le vertlumière est plus transparent, il convient mieux aux biopsies rénales et digestives.

Résultats :

• collagène : bleu ou vert (suivant le colorant utilisé) ;

• cytoplasme : rose à rouge (muscle rose et foierose-vert) ;

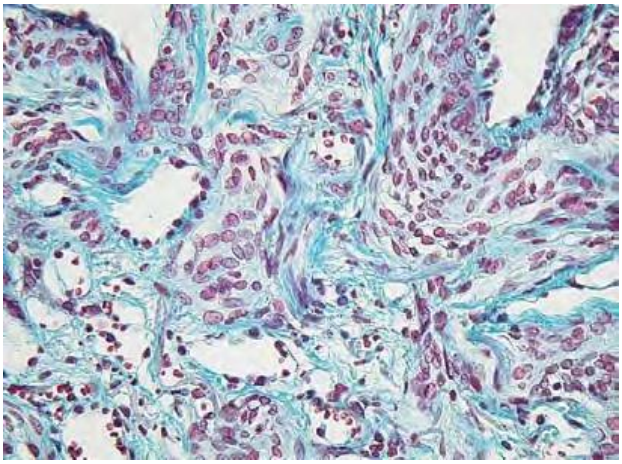
• noyau : bleu foncé ou brun ;

• hématie et granulation éosinophile : rouge ;

• mucus : bleu ou vert (suivant le colorant utilisé) ;

• kératine : rouge vif.

• fibre élastique : rose



Trichrome de Masson. Collagène et mucus en bleu.Coupe tissulaire du poumon.

- **Coloration Von Kossa**

La coloration de Von Kossa permet la mise en évidence des sels de calcium. La spécificité de cette méthode est axée davantage sur les phosphates et les carbonates de calcium, les autres anions n'étant pas mis en évidence.

Des accumulations anormales de calcium se trouvent dans les fibres élastiques en dégénérescence, de même que dans certaines lésions spécifiques (lésions caséeuses de la tuberculose).

Temps de réalisation ≈ 50 minutes.

Révélation des sels de calcium (carbonate, oxalate, phosphate, sulfate) en leur substituant un cation métallique lourd (nitrate d'argent) que l'on visualise après réduction en argent métallique noir.

Contre-colorer par le rouge nucléaire, déshydrater et monter en milieu résineux.

Résultats :

• dépôt de sels de calcium : noir ;

• fond : rose-rouge.

- **Coloration Ziehl-Neelsen**

La coloration de Ziehl-Neelsen permet la mise en évidence de certains micro-organismes (en particulier les mycobactéries) sur leurs caractères acido-alcoolo-résistants.

• Utilité : détection des bactéries (nocardiose, tuberculose), mycose (aspergillose).

• Témoin : granulome (follicule tuberculeux).

• Temps de réalisation ≈ 30 minutes.

Coloration de certains germes par un mélange de phénol et de fuchsine basique suivie de l'action d'éthanol additionnée d'acide chlorhydrique. Certains germes (bacille de Koch et de Hansen) résistent à l'action décolorante de l'alcool chlorhydrique (ils sont ditsacido-alcoolo-résistants), les autres germes étant décolorés.

Contre-colorer par le bleu de méthylène, déshydrater et monter en milieu résineux.

Résultats :

• bacille acido-alcoolo-résistant (tuberculeux) :rouge ;

• noyau : bleu foncé à bleu-vert ;

• fond : bleu pâle.

N.B. : La différenciation alcool/acide sert surtout à mettre en évidence le *Mycobacteriumtuberculosis*.

III. L'immunohistochimie IHC et l'immunocytochimie ICC :

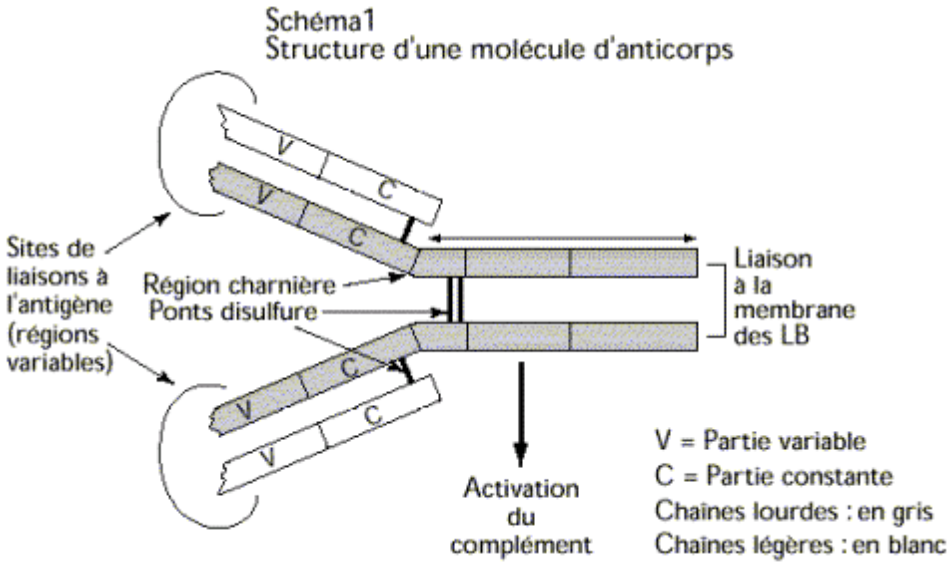
Les techniques immunochimiques sont des techniques performantes pour déterminer l'expression des protéines dans les cellules cancéreuses. Elles complètent les méthodes normalisées en pathologie.L'immunohistochimie(ou « IHC») est le nom d'une méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu, par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps.L'immunohistochimie exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques. Les anticorps peuvent être d'origine polyclonale ou monoclonale.

a. Interêts et définitions :

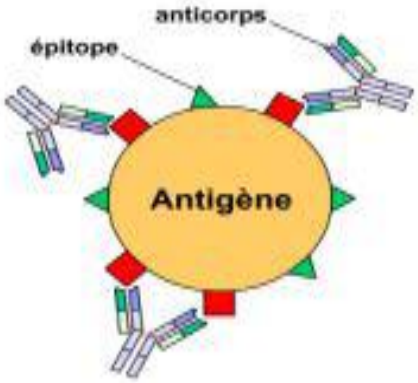
L'intérêt de cette technique est de repérer des antigènes (protéines le plus souvent) d'intérêt auniveau cellulaire ou extracellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques.

Un antigène est une molécule capable d'activer le système immunitaire et de conduire à laproduction d'anticorps.

Un anticorps est une glycoprotéine, sécrétée par les plasmocytes, capable de se lier spécifiquement àl'antigène.



On appelle épitope le site de l'antigène où se fixe l'anticorps.



Liaison anticorps-antigène

b. Principes de l'immunohistochimie et retour sur les définitions :

- Exploiter la réponse immunitaire de diverses espèces pour produire des anticorps spécifiques.
- Réaliser la liaison antigène-anticorps spécifique.
- Détecter (visualiser) le complexe antigène-anticorps.

Un antigène possède en général plusieurs épitopes.

En fonction de la configuration de l'antigène, un épitope peut ne pas être accessible à l'anticorps.

Plusieurs anticorps peuvent se lier à un même épitope avec des affinités différentes.

Un même épitope peut parfois être présent sur plusieurs antigènes.

La principale difficulté de l'IHC est de disposer d'un bon anticorps spécifique et pouvant atteindreson épitope sur coupe

On distingue deux types d'anticorps : les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux.

Les anticorps spécifiques peuvent être fabriqués en injectant à plusieurs reprises un échantillon del'antigène (protéine à détecter) à un animal (le plus souvent, lapin ou chèvre), et en recueillantensuite le sérum riche en anticorps (antisérum). Cet antisérum contient différents anticorps ditspolyclonaux, produits par différents plasmocytes, reconnaissant divers antigènes de la protéined'intérêt.

- Avantages : simple, peu couteux.
- Inconvénients :

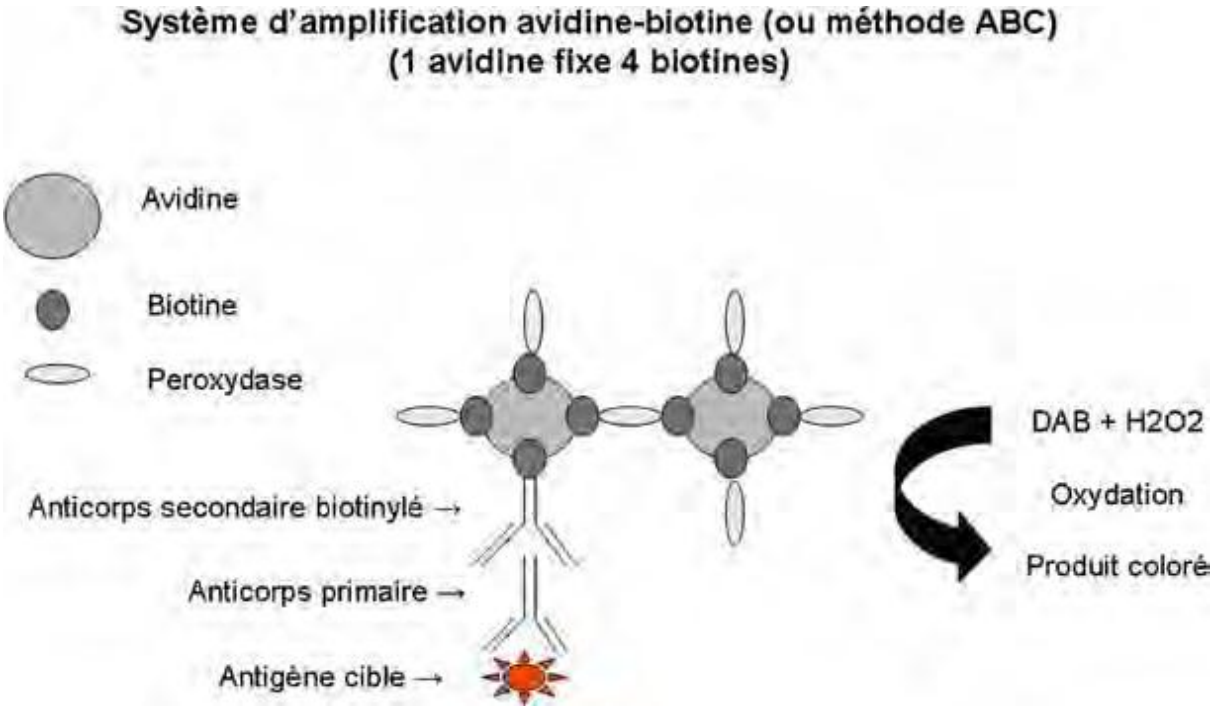
- risques de réactions croisées (signal non spécifique) ;
- quantités limitées de sérum.

Un anticorps monoclonal correspond à une population d'anticorps identiques dirigés contre lemême site antigénique d'une protéine. Ces anticorps sont produits en grande quantité en culture parun clone de lymphocytes B selon la technique des hybridomes. Après avoir immunisé une souriscontre un antigène donné, on prélève dans sa rate des lymphocytes B. Ceux-ci sont fusionnés avecdes plasmocytes tumoraux immortalisés. Après sélection, les hybridomes ainsi obtenus sont unesource permanente et stable d'un seul type d'anticorps monoclonal. La spécificité des anticorpsmonoclonaux est supérieure à celle des sérums polyclonaux, mais leur sensibilité peut êtreinférieure.

- Avantages : un seul anticorps par clone (limite les réactions croisées) ;
- Inconvénients : long, coûteux, résultats incertains

- **Principe d'une technique immunochimique : la méthode ABC**

La technique utilise un anticorps primaire dirigé contre l'antigène cible permettant d'identifier les protéines recherchées dans la cellule. On utilise ensuite un anticorps secondaire biotinylé dirigé spécifiquement contre l'anticorps primaire. Un complexe avidine–biotine couplèà la peroxydase permet l'amplification du signal lors de la révélation par la diaminobenzidine (DAB).



Solution de rinçage :

Tout au long de la manipulation des étapes de lavages et de rinçages sont nécessaires soit dans de l'eau déminéralisée, soit dans des solutions tamponnées de molarité et de pH différents, appropriées pour un marquage automatisé ou manuel.

Les détergents, tels que le PBS et le TBS, minimisent l'absorption non spécifique des anticorps. Les détergents sont des molécules amphiphiles, c'est à- dire qu'elles ont une partie hydrophile (chargée ou non) et une partie hydrophobe.

Les détergents non ioniques sont particulièrement peu dénaturants et sont employés lorsqu'on veut préserver l'activitédes protéines.

Les détergents contenant un agent mouillant, Tween 20 ou triton, comme le PBT qui est du PBS Tween 20, permettent une perméabilisation douce des sites antigéniques (création de pores dans la couche de phospholipides membranaires) car lesanticorps ne sont pas capables de pénétrer de façon significative à l'intérieur ou à la surface des cellules, et de réduire les fixations non spécifiques.

Recommandations techniques

• Pour une meilleure adhérence de la coupe sur la lame de verre, utiliser de préférence des lames spéciales (chargées positivement). Ensuite, fixer les coupes sur les lames par passage

d'une heure dans une étuve ventilée à 58 °C, suivi toute une nuit à 37 °C avant le déparaffinage.

• Tous les réactifs doivent s'équilibrer à température ambiante (20–25 °C) avant immunomarquage.

• Le pH des solutions doit être titré au pH-mètre (préalablement étalonné).

• Toutes les incubations doivent se dérouler à température ambiante sauf mention contraire.

• Ne pas laisser sécher les préparations pendant la procédure de marquage (risque de marquage non spécifique accru). Les prélèvements peuvent être cerclés d'un anneau de matière hydrophobe pour éviter la dispersion des réactifs.

• Pour une manipulation manuelle placer les lames dans un environnement humide (chambre humide) en position horizontale lors d'incubations prolongées.

• Après le blocage des sites non spécifiques, surtout ne pas rincer, enlever l'excès du réactif endrainant les lames.

Pour un traitement enzymatique protéolytique, le pH de la solution doit correspondre au pHd'action de l'enzyme utilisée.

• Pour le démasquage par la chaleur au four à micro-ondes :

– placer les lames dans une (des) cuve(s) thermorésistante(s) pour four à micro-ondes contenant la solution tampon ;

– répartir les cuves dans l'enceinte du four àmicro-ondes étalonné, attendre les 97–98 °Csans toucher le point d'ébullition et maintenir ce palier ;

– laisser refroidir les lames dans le tampon hors du four à micro-ondes àtemperatureambiante pendant 20 minutes ;

– rincer les lames dans une solution tampon de rinçage avant de poursuivre la technique.

Détermination de l'origine des problèmes techniques

Les techniques immunochimiques sont généralement automatisées et contrôlées par ordinateur. Mais la préparation des échantillons cellulaires ou tissulaires et des solutions est réalisée manuellement, donc opérateur/dépendant. Lorsqu'il y a un problème, il faut savoir l'identifier.

Par exemple, la présence d'un bruit de fond est en règle liée à un problème technique (mauvaise fixation, coupe trop épaisse, concentration de l'anticorps trop importante, séchage des lames, rinçages insuffisants…), l'absence de réactivité sur toutes les lames peut être due au mauvais choix de l'anticorps secondaire, à la présence d'azide de sodium (agent

antibactérien) dans la dilution ducomplexe (ABC), à l'omission de l'eau oxygenéedans la solution chromogène.

N.B. : L'azide de sodium (NaN3) est un agent chimique hautement toxique à l'état pur. C'est un inhibiteur des peroxydases. Ne pas l'utiliser dans les tampons de révélation de ces enzymes.

Principales familles d'anticorps

Les principales familles d'anticorps se définissent par leur cible (l'antigène correspondant).

- Filament intermédiaire (FIs)

Les filaments intermédiaires (FIs) forment avec les microtubules de tubuline (24 nm de diamètre) et les microfilaments ou filaments d'actine (5 a 8 nm de diamètre) les différentes architectures du cytosquelette (réseau complexe de filaments protéiques contenu dans le cytoplasme de toutes cellules). Ils regroupent cinq classes de protéines.

L'actine est une protéine importante pour l'architecture et les mouvements cellulaires. Elle est présente dans toutes les cellules du corps et spécialement dans les cellules musculaires.

La vimentineet les kératines sont des proteines importantes qui sont fabriquées par des cellules avec une spécificitévariable mais souvent étroite. La vimentine est responsable du maintien de la forme cellulaire, de l'intégrité du cytoplasme, et stabilise les interactions cytosquelettiques. Elle est présente dans la plupart des cellules mésenchymateuses (fibroblastes, chondrocytes, endothéliales vasculaires).

Les cytokératines CK (8–10 nm de diamètre) correspondent àdes polypeptides fibreux intracellulaires présents dans pratiquement toutes les cellules épithéliales.

Il en existe une vingtaine différente chez l'homme. Elles sont classées et numérotées selon leur poids moléculaire (pm) et leur point isoélectrique, et peuvent être réparties entre une sous-famille acide (type I) numérotée de 9 à 20 et une sous-famille basique ou neutre (type II) numérotée de 1 à 8. Chaque épithélium et chaque tumeur correspondent à un profil cytokératine particulier.

N.B.: une co-expression de la kératine est possible avec la vimentine dans les épithéliums glandulaires**.**

La vimentine est positive dans la plupart des tumeurs conjonctives, les mélanomes, les mésothéliomes, certains lymphomes non hodgkiniens (LNH) et carcinomes (endomètre, glandes salivaires, rein, sein, thyroide). La mise en évidence de cytokeratines de poids moléculaires différents a un grand intérêt dans le typage de certaines tumeurs et/ou leurs métastases.

La pancytokératine KL1 (anticorps à spectre large) est positive dans de nombreuses tumeurs malignes : carcinome (embryonnaire, neuro- endocrine), carcinome indifférencié du nasopharynx(UCNT), choriocarcinome, mésothéliome, sarcome épithelioide, synovialosarcome, teratome, tumeur (à cellules de Merkel, desmoplasique, germinale, vitelline).

La pancytokeratine AE1–AE3 (cocktail de deux anticorps monoclonaux : l'Ac AE1 reconnait les kératines acides et l'AcAE3, les kératines basiques) est utilisée pour l'identification d'une différenciation épithéliale dans une tumeur indifférenciée.

Les carcinomes sont quasiment toujours positifs pour des cocktails d'anticorps anti-cytokératines (pancytokératines : KL1 ou AE1–AE3). Certains sous-types de cytokératines peuvent mieux orienter le diagnostic et en particulier le profil CK 7/CK 20.

- Antigène de surface

La plupart des CD (*cluster of différenciation* = classe de différenciation) de typage leucocytaire permettent l'identification du phénotype d'une population cellulaire et de reconnaitre les cellules lymphoides impliquées.

Les molecules CD se répartissent en trois groupes principaux : marqueurs exprimés tout au long de la vie de la cellule, marqueurs exprimés transitoirement pendant une phase de différenciation, et marqueurs exprimés lorsque la cellule est activée.

Il s'agit d'un domaine complexe ; plus de 2000 CD existent, certains étant formés de plusieurs protéines. Chaque classe d'antigènes de différenciation est suivie d'un numéro dont la classification repose sur une nomenclature internationale.

- Immunoglobuline (Ig)

Les anticorps non clustérisés des chaines lourdesdes immunoglobulines (anti-Ig A, G, M, D) et deschaînes légères des immunoglobulines (anti-Kappa, -lambda) sontutiliséspour rechercher la monoclonalité d'uneprolifération lymphoide B.

- Molécule d'adhérence

Ce sont des glycoprotéines de la membrane cellulairequi assurent l'adhérence des cellules entreelles ou à la matrice extracellulaire. Elles regroupentles cadhérines, les intégrines et les sélectines.

- Antigène tumoral (oncofoetal ou néo-antigène)

Ils mettent en évidence des constituants cellulairescaractéristiques ou relativement caractéristiquesd'un ou plusieurs types de cancers.

- Divers

La PS 100 est une protéine soluble à100 % dansle sulfate d'ammonium d'où son nom. Elle marquedes cellules très diverses mais peut être utilepour affirmer l'origine nerveuse ou mélanocytaired'une tumeur maligne à cellules fusiformes.

- Enzyme

- NSE (neuroénolase spécifique) pour détecter les carcinomes pulmonaire à petites cellules, Neuroblastome, Phéochromocytome, Rétinoblastome, Tumeur à cellules de Merkel, desmoplasique, neuro ectodermique, neuro-endocrine
- PAP (phosphatase acide prostatique) pour Carcinome prostatique , tumeur germinale
- PLAP(phosphatase alcaline placentaire) pour Carcinome embryonnaire, Dysgerminome ovarien, Seminome ou tumeur germinale

- Marqueur de différenciationcellulaire

La calretinineappartient à la superfamille liée aucalcium. Elle est utile pour le diagnostic des mésotheliomes.La GCDFP 15 *(grosscysticdiseasefluidprotein 15)* est utile pour le diagnostic du carcinomeapocrine du sein. La positivité nucléaire de TTF 1 *(thyroidtranscription factor 1)* oriente vers un adénocarcinome pulmonaire (primitif oucarcinome neuro endocrine à petites cellules dupoumon) ou thyroidien (médullaire, papillaire et vésiculaire). La positivité de la thyroglobulinedans les carcinomes thyroidiens peut permettresecondairement de séparer ces deux origines.

- Oncoprotéine

Les oncoprotéines sont des protéines traduisantdes gènes dont certains sont exprimés au coursdes cancers (oncogènes) alors que d'autres sontdéprimés ou absents (anti-oncogènes) :

• le Bcl 2 est un oncogène impliqué dans les voiesde l'apoptose. Il a comme caractéristique d'êtreun inhibiteur puissant de la mort cellulaireprogrammée ;

• le Bcl 6 (proto-oncogène) code pour un répresseurtranscriptionnel impliqué dans la formationdes centres germinatifs, la maturation lymphocytaireB et T, du cycle cellulaire et l'apoptose.Une expression du Bcl 6 est observée avec unefréquence variable dans certains lymphomes dephénotype B (lymphome folliculaire, lymphomede Burkitt) ;

• le CD 117 (oncogène c-kit) est une protéinetransmembranaire à activité tyrosine kinase. Desmutations sont observées dans les tumeurs stromalesdigestives (GIST) ;

• l'EGFR *(epidermalgrowth factor receptor)* estfortement exprimé dans les cancers épidermoidesde la tete et du cou, des voies aérodigestivessupérieures (VADS), du colon, du pancréas, del'ovaire et de la vessie ;

• l'HER-2 est une glycoprotéine transmembranaireà activité tyrosine kynase. Cette protéineest exprimée dans les cancers du sein mais égalementde l'ovaire, du colon et du pancréas ;

• la p53 est une protéine impliquée dans la réparationde l'ADN ou l'induction de l'apoptoseaprès un stress cellulaire. Elle est retrouvéeen petite quantité dans les cellules normalesmais en grande abondance dans les tumeursmalignes. Des délétions ou des mutations dela p53 sont observées dans près de 50 % descancers ;

• le WT 1 est un gène qui code pour un facteurde transcription. Il joue un rôle critique dans le développement normal du rein et desgonades. Des mutations de ce gène provoquentdes cancersdu rein chez l'enfant (tumeur deWilms).

Marqueur de prolifération cellulaire

Ils marquent les cellules engagées dans le cyclecellulaire :

• le Ki 67 est exprimé durant toute la durée du cyclecellulaire permettant d'évaluer la fraction cellulaireen phase de croissance. Il peut être utile pouraider à déterminer le degré de malignité de certainestumeurs comme les tumeurs stromales dutube digestif. Un index de Ki 67 élevé indique queles cellules cancéreuses se divisent rapidement ;

• l'altération de l'expression de la p53 peut êtreretrouvée dans pratiquement tous les types decancer.

- Marqueur pronostic

Ils sont des facteurs dont la valeur permet de préciserle potentiel évolutif du cancer :

• l'expression de l'ALK *(anaplastic lymphome kinase)* est corrélée à un bon pronostic des lymphomesT anaplasiques ;

• l'expression de Bcl 2 est corrélée à un mauvais pronosticdes lymphomes B diffus à grandes cellules ;

• la surexpression de HER-2 (Cerb B2) est corrélééà un mauvais pronostic des cancers invasifsdu sein.

- Marqueur prédictif

Ils sont utilisés pour déterminer le statut potentielde réponse à un traitement antitumoral cibléspécifique :

• la détermination des récepteurs hormonaux (récepteurs aux oestrogènes et à la progestéroneest effectuée essentiellement sur des lésionsmammaires afin d'évaluer l'hormonosensibilitéen vue d'un traitement spécifique. L'expressionnucléaire des récepteurs hormonaux est réaliséepar une analyse semi-quantitative. La positivité des récepteurs aux oestrogèneset/ou de récepteurs à la progestérone (seuil de positivité> 10 %des cellules tumorales marquées) est associée àune meilleure réponse à un traitement par hormonothérapie.

L'absence des récepteurs aux oestrogènesest associée à unemeilleure réponse à la chimiothérapie ;

• l'absence de l'amplification (par techniqueFISH) de Cerb B2 (HER-2) est corrélée à uneabsence de réponse au traitement par l'HerceptineR dans les cancers du sein.

c. Technique de l'immunohistochimie :

- L'immunofluorescence directe sur coupe en congélation est une méthode très spécifique qui évite toutes les réactions non spécifiques dues à l'accrochage de l'anticorps au récepteur du Fc des immunoglobulines, à condition d'utiliser l' anticorps à la dilution optimale. Mais c'est une méthode peu sensible (pas d'amplification du signal) et qui nécessite d'utiliser des anticorps couplés à un chromogène fluorescent (Fluorescéine, Rhodamine, Rouge Texas….).

Intérêt : permet facilement les doublesmarquages et évite les problèmes liés aux peroxydases endogènes.

Le marquage est labile dans letemps : des milieux de montages spéciaux permettent d'éliminer l'effacement du marquage.

- Pour la révélation de l'immunohistochimie indirecte, les enzymes utilisées sont la peroxydase ou la phosphatase alcaline et les chromogènes sont le plus souvent la diaminobenzidine (réaction de couleur brune) ou l'aminoethylcarbazole (réaction de couleur rouge).

Il existe dans la méthode immunoenzymatique indirecte un risque de marquage non spécifique par fixation de l'anticorps secondaire sur le récepteur du Fc des immunoglobulines : ces sites de fixation non spécifique doivent donc être bloqués au cours de la technique.

L'intensité du signal obtenu après marquage d'une réaction antigène-anticorps dépend du nombrede molécules colorées visibles.

Plusieurs mécanismes d'amplification sont possibles, parmilesquelles les méthodes à trois couches, d'autant que l'anticorps intermédiaire divalent peut aussi servir àattacher un complexe réactif : peroxydase-antiperoxydase, avidine-biotine péroxydase (ouphosphatase alcaline) et streptavidine-biotine-peroxydase

On peutmultiplier le nombre de molécules réactives en les attachant à un polymèreou bien l'amplification peut être générée par la création d'un complexe qui multiplie les moléculesd'enzyme attachées de façon non covalente à l'anticorps (tyramide).

L'amplification peut êtreapportée par l'augmentation du temps d'incubation et aussi par le prétraitement des coupesdéparaffinées par la chaleur ou des enzymes.

L'utilisation de tissus congelés ou de tissus fixés et inclus en paraffine comporte des avantages et des inconvénients :

- **congélation** : nécessité de disposer de tissus frais, d'un système de stockage (au moins à - 80 °C), de pratiquer des coupes au cryostat ; morphologie moins bien conservée que sur des coupes fixées et incluses dans la paraffine.

  L'intérêt majeur est de pouvoir visualiser des épitopes détruits par des procédés de fixation et d'inclusion. Néanmoins, les indications de l'immunohistochimie sur coupes à congélation tendent à diminuer, d'une part en raison de la fabrication de nouveaux anticorps reconnaissant des épitopes résistants à la fixation, d'autres part grâce aux techniques de démasquage antigénique (micro-ondes, autocuiseur, bain-marie) et aux systèmes de révélation ultrasensibles.
- **tissus fixés inclus en paraffine** : les avantages sont l'utilisation a posteriori quand le tissu a été fixé et la possibilité d'études rétrospectives (sur blocs ou sur lames) ainsi qu'une morphologie bien conservée. Mais certains épitopes sont détruits : pour y remédier, nécessité d'une bonne fixation (ni trop courte, ni trop longue).

  Le choix du fixateur est important (en règle préférer le formol tamponné), car certains épitopes sont détruits par certains fixateurs (alcooliques surtout) et l'éventuelle décalcification.

  Eviter les températures excessives au moment de l'inclusion et du séchage des lames.

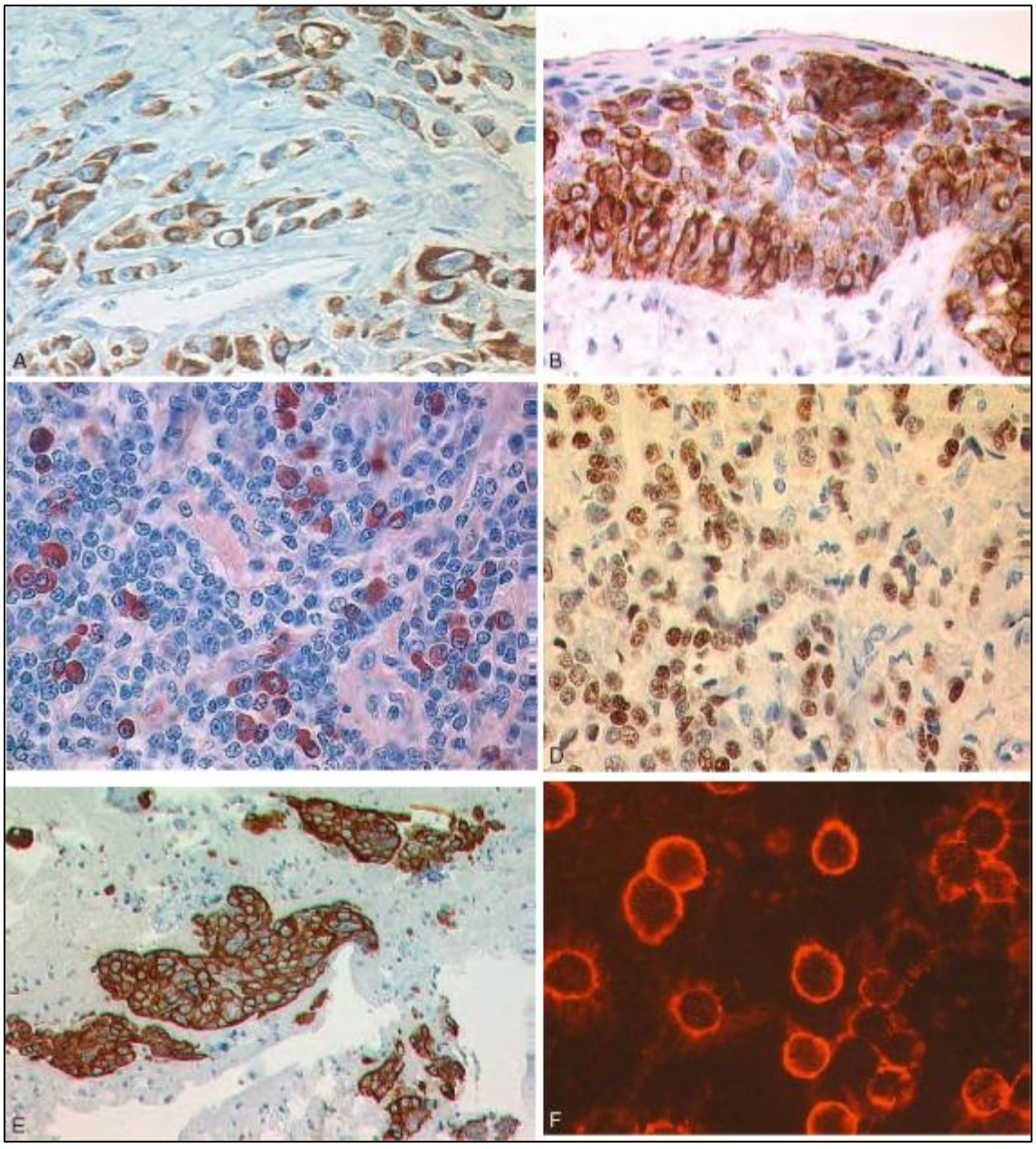
  Nécessité pour de nombreux épitopes d'un démasquage antigénique (prétraitement qui permet de rompre les liaisons moléculaires créées par le fixateur et modifiant la configuration spatiale des épitopes et leur accessibilité aux antigènes) : digestion enzymatique ou plus souvent chauffage des coupes dans un tampon au four à micro-ondes, autocuiseur, ou bain-marie.

Modèle opératoire IHC :

La procédure suivante peut servir de guide (coupes de tissus fixés et inclus en paraffine) :

1. prélèvement ;
2. fixation (formol tamponné) ;
3. inclusion en paraffine ;
4. coupes ;
5. fixation des coupes en étuve ;
6. déparaffinage ;
7. réhydration ;
8. prétraitement : restauration antigénique combinée si nécessaire (digestion enzymatique suivie d'un traitement par la chaleur) ;
9. inhibition des peroxydases endogènes par l'H2O2 à 3 % afin de supprimer le bruit de fond interférant lamanipulation ;
10. incubation d'un sérum normal de cheval qui sature les épitopes non spécifiques de l'antigène recherché ;
11. incubation de l'anticorps primaire qui se fixe sur l'épitope spécifique de l'antigène recherché ;
12. incubation de l'anticorps secondaire biotinylé qui se fixe sur la partie constante de l'anticorps primaire ;
13. incubation du complexe comprenant de l'avidine, de la biotine et de la peroxydase. Les sites libres del'avidine fixent les biotines présentes à la surface de l'anticorps secondaire ;
14. incubation de la solution chromogène/substrat DAB qui permet de révéler le site de réaction Ag/Ac créé ;
15. contre-coloration légère à l'hématoxyline qui rend possible une détermination topographique dumarquage ;

16. déshydratation en alcools croissants pour arriver au toluène (ou au xylène) ;
17. montage entre lame et lamelle ;
18. observation.



IHC.

a. Marquage cytoplasmique anti-cytokératines KL1 (mésothéliome malin), peroxydase/DAB.

b. Marquage cytoplasmique anti-HMB 45 (mélanome), peroxydase/DAB.

c. Marquage cytoplasmique anti-IgM (lymphome), peroxydase/AEC.

d. Marquage intranucléaire anti-récepteurs oestrogènes RO (carcinome mammaire), peroxydase/DAB.

e. CB : marquage cytoplasmique anti-cytokératines AE1–AE3 (métastase carcinome épidermoïde), peroxydase/DAB.

f. Marquage membranaire rouge fluorescent (quantum dot 605 nm) anti-HER-2/neu, pas de contre-coloration.

Pour l'immunocytochimie, le mode opératoire est sensiblement identique.

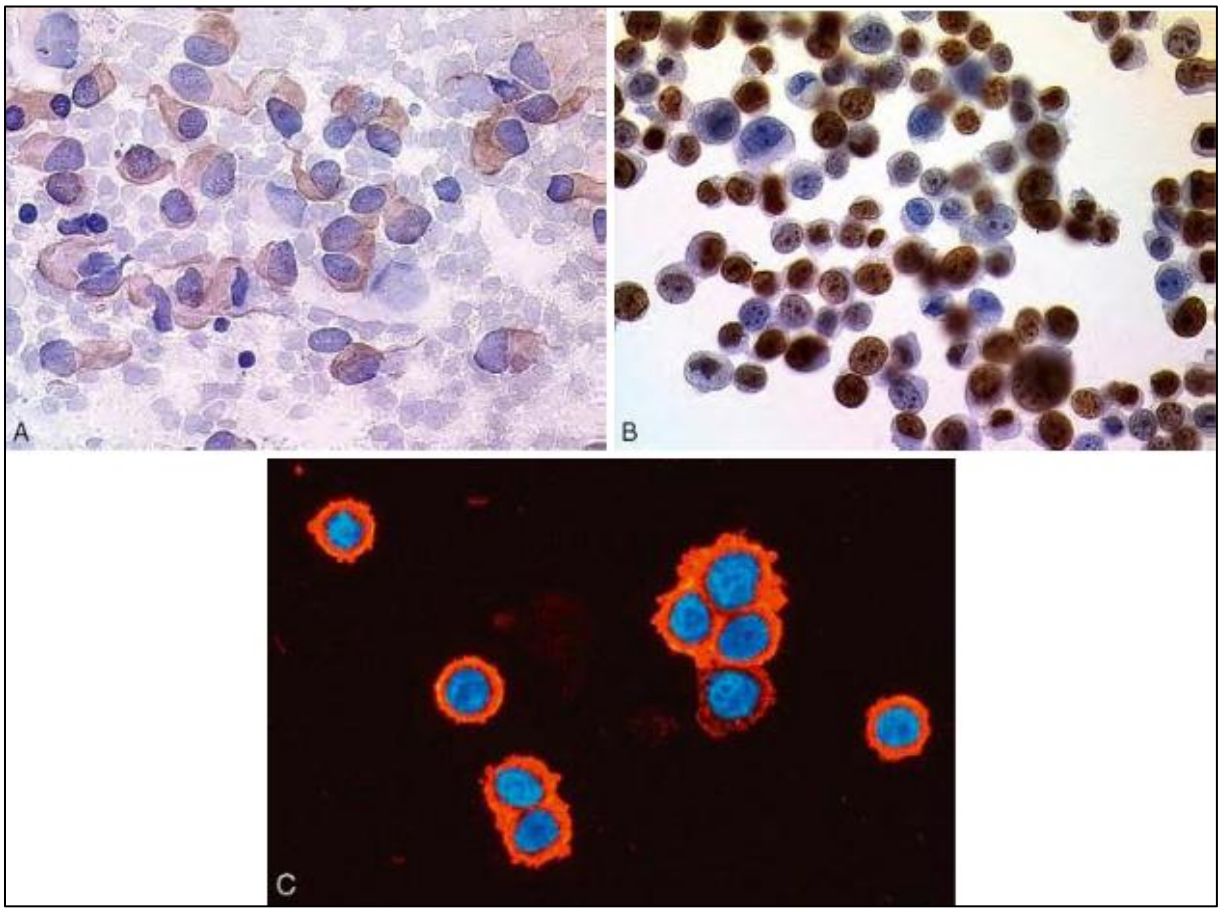
Excepté :

• les étapes post-fixation histologique ;

• la concentration des anticorps adaptée en fonction du fixateurutilisé ;

• les étalements en couche mince (LBC) nécessitent pour certains épitopes nucléaires (avant la technique)une fixation complémentaire extemporanément dans un mélange (acide acétique glacial/éthanol absolu).

Les préparations cellulaires fixées sont réhydratées dans du PBS. En fonction de l'antigène recherché, elles subissent ou non une restauration antigénique par la chaleur et poursuivent le même procédé technique. La digestion enzymatique est à proscrire car elle entraîne des décollements et des altérations cellulaires importantes.



ICC.

a. EM : marquage cytoplasmique anti-desmine (rhabdomyosarcome),peroxydase/DAB.

b. LBC : marquage intranucléaire anti-Ki 67 (carcinomemammaire), peroxydase/DAB.

c. Marquage membranaire rouge fluorescent (quantum dot605 nm) anti-HER-2/neu, contre-coloration nucléaire par leDAPI.

Références bibliographiques

Gabe., 1968. « Techniques histologiques ». Edition Masson , 205 p.

Kuehnel., 2003. « Color atlas of cytology, histology and microscopic anatomy».4^{éme} edition, 745 illustrations.

Marck ., 2010. «Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie. Théorie et pratique ». Edition ELSEVIER MASSON. 183p.

Sorenson., 2008.« Atlas of human histology ».3^{éme} edition, 180p.

Toupet et Critzman., 1898. « Manuel technique d'histologie ». 2^{éme} édition française , 281 figures.