

Histologie Générale, Techniques d'imagerie cellulaire

1- Introduction

L'histologie est un terme qui fait référence à l'étude de l'anatomie microscopique des cellules et des tissus.

L'histologie a pour but d'explorer la structure. Elle demeure une science vivante et utile pour tout étudiant en médecine (humaine et vétérinaire), en chirurgie dentaire et en biologie. En effet, la connaissance des tissus normaux, sur le plan structural et ultra structural, permet d'assurer le lien entre structure et fonction.

L'histologie se doit de répondre à de multiples questions :

- Comment s'associent les cellules pour former les tissus
- Comment les tissus sont-ils structurés et agencés dans les organes (jonctions)

La cellule est l'unité fondamentale de la vie. C'est la plus petite quantité de matière vivante capable de subsister à l'état autonome et de se reproduire. La cellule associée à la matrice extracellulaire forme les tissus fondamentaux :

CLASSIFICATION DES TISSUS : LES 4 TISSUS SIMPLES

α - Tissu épithélial \rightarrow De revêtement
Epithélium Glandulaire (endocrine ou exocrine)

α -Tissu conjonctif ~~NON~~ SPECIALISES

- fibreux lâche (TCFL)
- Tissu conjonctif fibreux dense (TCFD) orienté ou non orienté
- TC embryonnaire (gélatineux et mésenchymateux)

α - Tissu conjonctif \rightarrow SPECIALISES

- Tissu adipeux
 - Tissu cartilagineux
 - Tissu osseux
 - Tissu sanguin
- α - Tissu musculaire
- α - Tissu nerveux

FONCTIONS GÉNÉRALES D'UN ORGANE

- AXE —————> Os, articulations, ligaments, tendons (Tissu conjonctif)
- MOBILITE —————> Muscles (Tissu musculaire)
- PILOTE —————> Cerveau + nerfs (Tissu nerveux)
- PROTECTION EXTERNE ~~Peau~~ => (=épithéliums de revêtements + glandulaires)
- PROTECTION INTERNE ~~Sang~~ / globules blancs / lymphocytes (Tissu conjonctif).

2- LES TECHNIQUES D'ETUDE EN HISTOLOGIE

Toute activité histologique a en commun l'action d'observer et d'interpréter ce qui est vu. Dans toute démarche d'ordre histologique, 4 étapes se succèdent :

- Le choix du matériel à étudier,
- La technique permettant de visualiser les structures que l'on veut étudier,
- La production d'images de ces structures, par des moyens optiques et l'interprétation de ces images.

La connaissance des tissus repose essentiellement sur les moyens optiques qui permettent de les examiner et sur un certain nombre de traitements qui leur sont appliqués au préalable. Ces traitements préparatoires, ou techniques histologiques, ont pour effet de rendre possible l'observation microscopique et sont utilisés en vue de l'étude morphologique et fonctionnelle des éléments du tissu, ce qui implique, outre la recherche descriptive, l'identification de constituants chimiques et la connaissance de la cinétique cellulaire

Pour rendre visible ce que l'on veut observer, il est nécessaire de mettre en œuvre des techniques diverses (préparation des échantillons) que l'on applique au matériel. Pour l'observation en microscope photonique, les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : prélèvement, fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

2-1- PRELEVEMENT

- Il doit être pratiqué le plus tôt possible après la mort, parfois sur le vivant (*biopsie*).
- Eviter de triturer ou de malaxer l'organe et le détacher avec un instrument bien tranchant.
- Découper des tranches peu épaisses en tenant compte de l'orientation générale de l'organe.

2-1-1-DIFFERENTS PRELEVEMENTS

Le matériel est prélevé de différentes façons :

• Le 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). Permet de prélever des cellules. Les frottis qui peuvent être analysés au MO sont :

- Frottis sanguin ou de moelle osseuse pour le diagnostic de nombreuses maladies (Anémies, Leucémie, etc.)
- Les frottis vaginaux sont utilisés pour : Dépistage de cancer, Infections

• Les ponctions de liquide (pleurale, ascitique, péricardique, ...).

• Les biopsies

Une biopsie est un prélèvement d'un échantillon de tissus de l'organisme effectué afin de procéder à un examen, microscopique le plus souvent, ou, parfois, biochimique, immunologique, génétique ou bien bactériologique.

- **L'Exérèse partielle ou complète**

Ablation chirurgicale d'un organe ou partie, d'une lésion, d'un corps étranger (ex: tumeur).

Elle est réalisée en bloc opératoire ou pour une autopsie.



Mesure et dissection d'une pièce d'œsogastrectomie fixée dans le formol puis sélection des prélèvements destinés à l'étude

2-2- FIXATION

L'échantillon est fixé dans l'ordre pour préserver les tissus et ralentir la dégradation des tissus.

La fixation des tissus est une étape critique, qui préserve les composants tissulaires et cellulaires et maintenir leur structure naturelle.

Après la mort cellulaire, les enzymes naturellement présentes sont libérées des organites qui commencent à dégrader l'intracellulaire et protéines extracellulaires qui maintiennent l'intégrité structurelle de la cellule et des tissus environnants.

La fixation empêche une telle dégradation en inhibant directement la capacité de ces enzymes pour digérer les protéines et en rendant les sites de clivage enzymatiques non reconnaissables.

Les deux principaux mécanismes de fixation sont la réticulation et la coagulation.

-la réticulation implique la formation d'une liaison covalente à la fois dans les protéines et entre eux ce qui provoque la rigidité des tissus et donc résister à la dégradation



- la coagulation est causée par la déshydratation des protéines par l'utilisation d'un solvant organique comme l'alcool pour déformer la protéine 3D ou la structure tertiaire afin que les régions hydrophobes, ou craignant l'eau, peuvent se déplacer à la surface.

La fixation coagulante peut aider à intégrer les médias, comme la cire de paraffine, pénétrer dans les tissus.

L'un des fixateurs les plus couramment utilisés est le formol, qui est le formaldéhyde dissout dans l'eau

Pendant la fixation, le formaldéhyde se fixe aux amines primaires, tels que ceux trouvés sur les chaînes latérales des acides aminés lysines et glutamine pour former une liaison croisée stable appelée pont de méthylène. Ce processus est intrinsèquement lent et peut prendre jusqu'à 1 à 2 jours.

Indispensable pour préserver les structures biologiques

- A réaliser le plus rapidement possible après exérèse
- De petits blocs d'organes sont immergés dans un grand volume de liquide fixateur

- **Fixateurs** : ● Acide acétique, méthanol,

- Para formaldéhyde,
- Liquide de BOUIN (formol + acide picrique)

Afin de conserver l'échantillon dans un état le plus proche possible de l'état in vivo, deux moyens de conservation peuvent être utilisés :

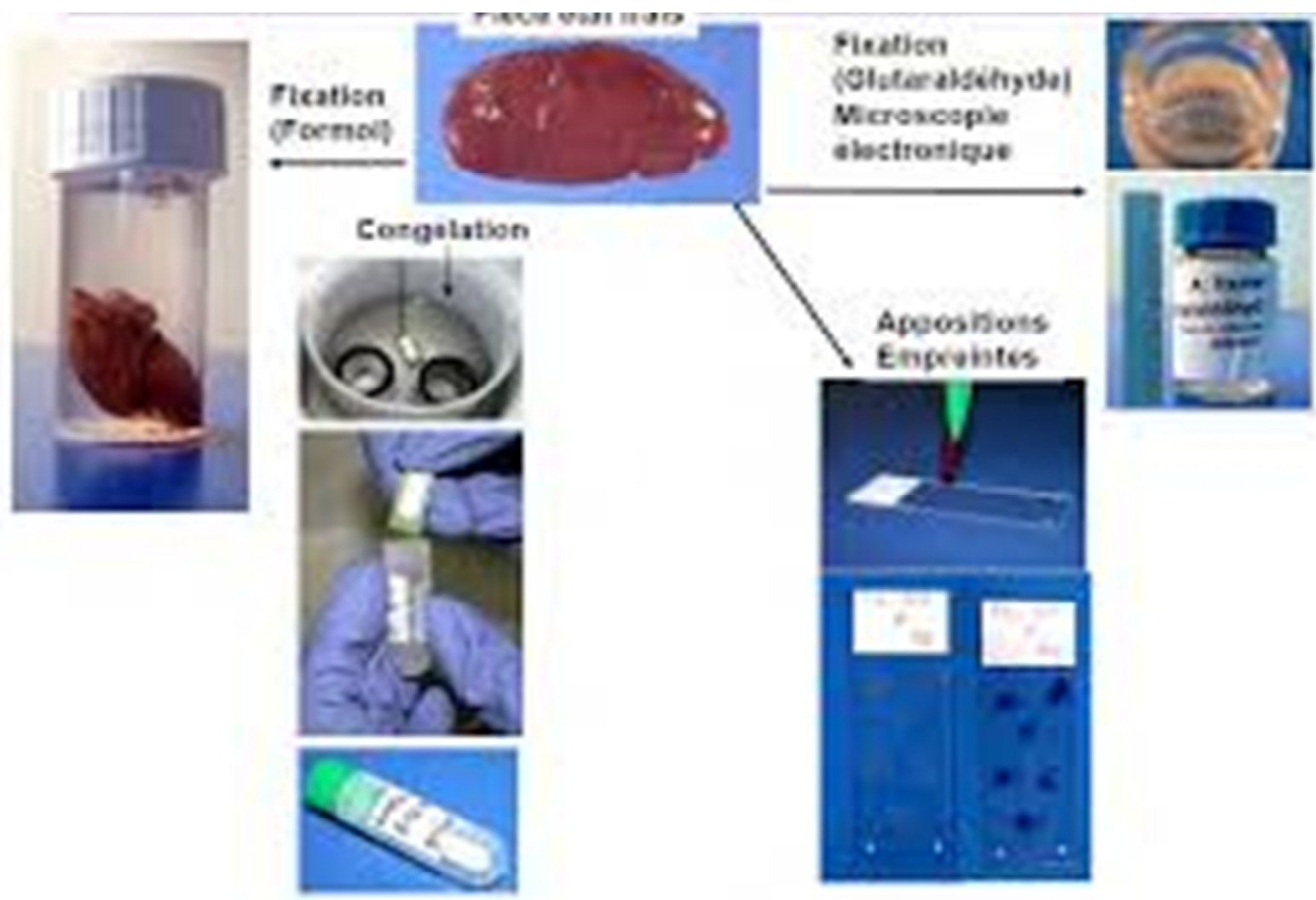
- **La congélation** : abaissement brutal de la température (-20 C, -50 C). Elle empêche l'autolyse et le prélèvement durci peut être coupé. Technique rapide pour besoin de diagnostic en bloc opératoire.
- **La Lyophilisation** associée à la congélation (cryodessiccation) l'évaporation complète et sous 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 coûteux sont réservées à des cas particuliers ou en recherche. Utilisée pour les prélèvements dont le diagnostic doit être connu rapidement.

- La fixation par un produit chimique comme le formol pénétrant (rapidement et fixe lentement) ou le Bouin (pénètre lentement et fixe rapidement).

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

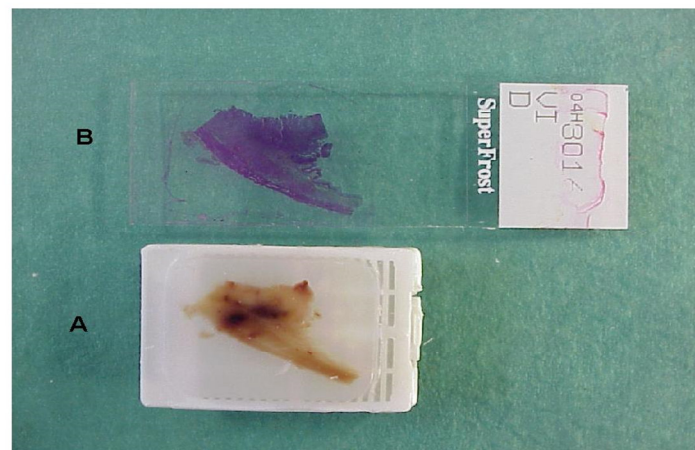


2-3- - INCLUSION

L'eau tissulaire est remplacée par de la paraffine. Mais ces milieux ne sont pas miscibles entre eux. On procède donc par étapes en remplaçant :

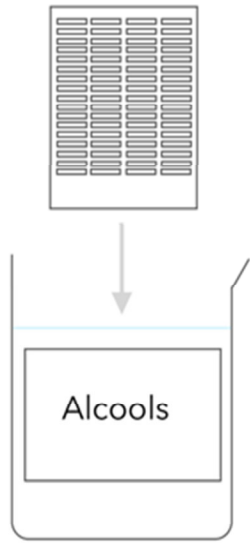
- l'eau par un alcool (70°,95°,100°)
- l'alcool par un solvant organique (Toluène),
- Toluène par la paraffine

Le prélèvement est imprégné de paraffine fondue afin de le **rigidifier** pour pouvoir le couper ensuite

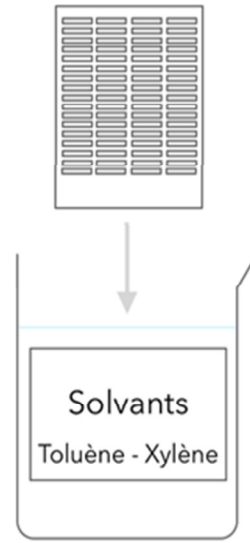


Tissu inclus en paraffine dans le bloc correspondant.

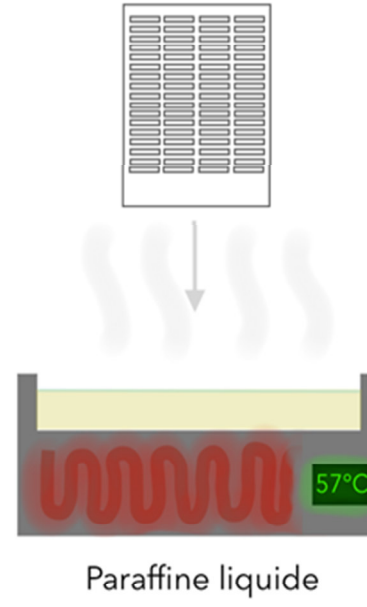
Déshydratation



Clarification



Impregnation

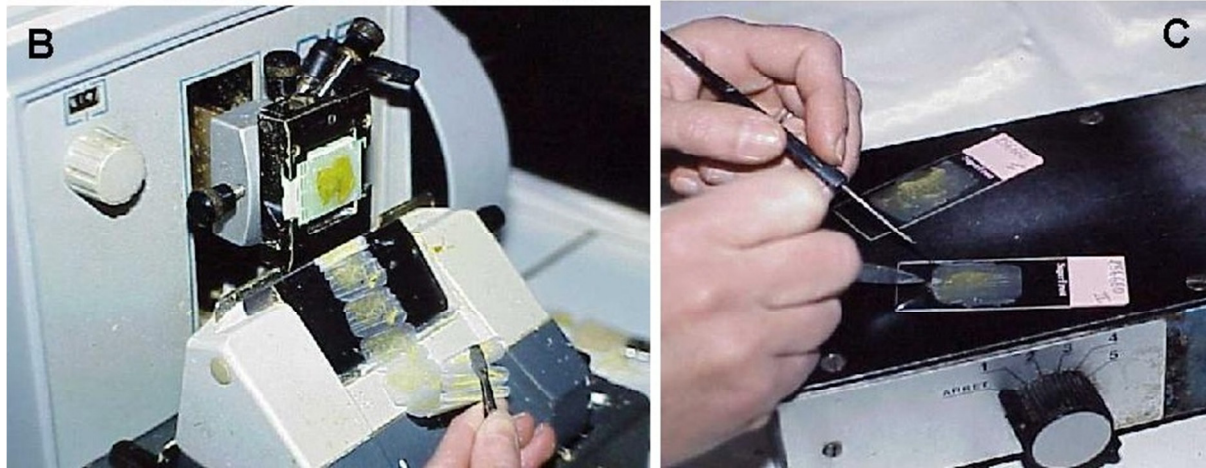


2-4- LES COUPES

Réalisées avec un **microtome** permettant d'obtenir des tranches de section (**coupes histologiques**) de **2 à 5 μm** d'épaisseur.

Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

Un ultra microtome est un appareil de très grande précision qui permet des coupes de **60 à 100 nm** servant en microscopie électronique.



B : coupe au microtome. C : étalement.

2-5- LES COLORATIONS

Afin de distinguer les différents tissus, on peut avoir recours à différents colorants : Colorants acides Colorants basiques

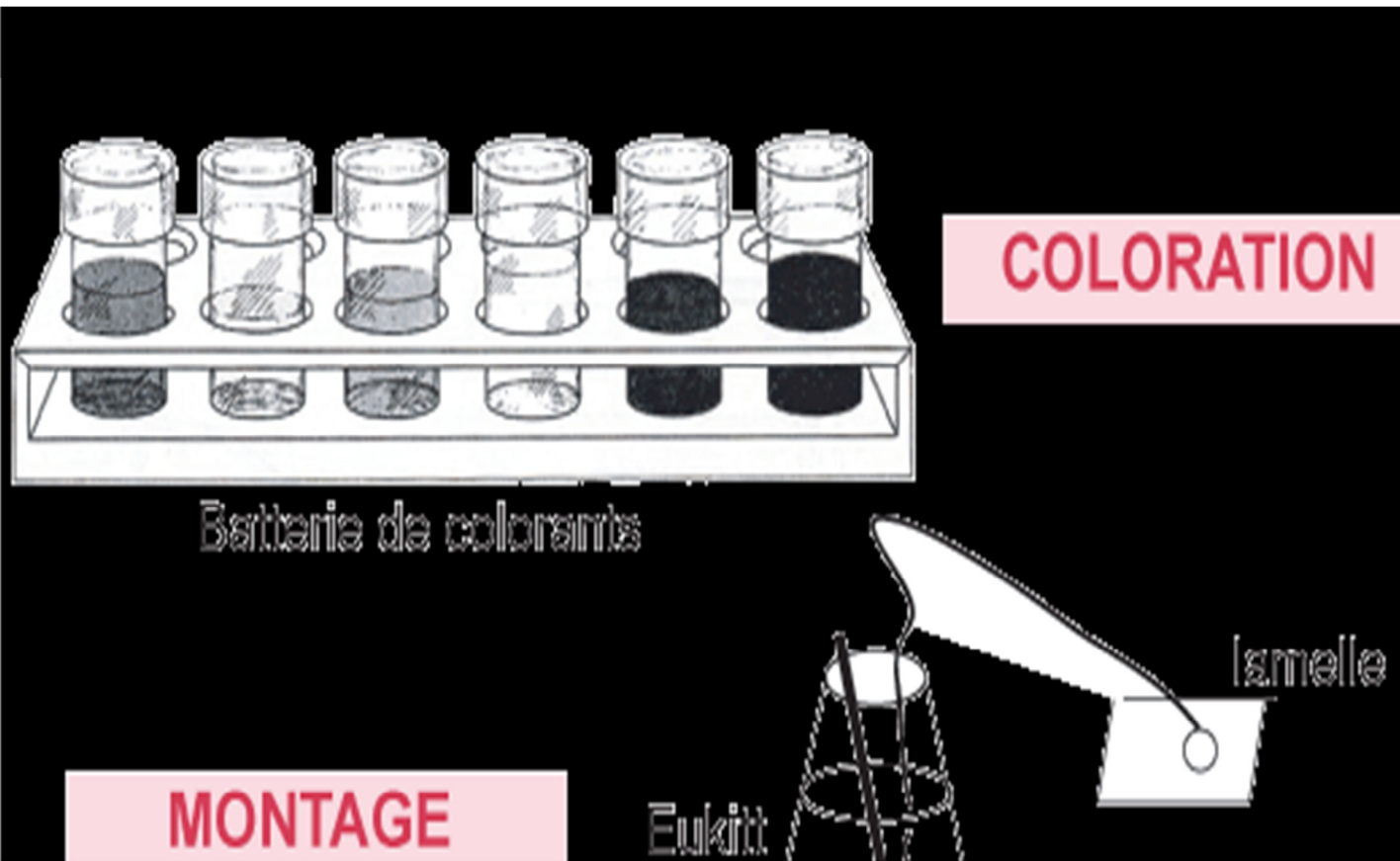
Les substances acides de la cellule sont colorées par un colorant basique, les substances basiques de la cellule par un colorant acide.

• Les colorations de routine utilisent un (hématoxyline) ou deux colorants différents : l'Hématoxyline-Eosine (H.E.) associe:

- l'hématoxyline qui colore les noyaux en violet.
- l'éosine les cytoplasmes en rose

2-6- LE MONTAGE ET OBSERVATION

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » (appelée « lame ») prête à être observée au microscope optique (MO)



Que devient le prélèvement ? des biopsies au microscope



Fixation formol



Inclusion en paraffine pendant la nuit



coupe



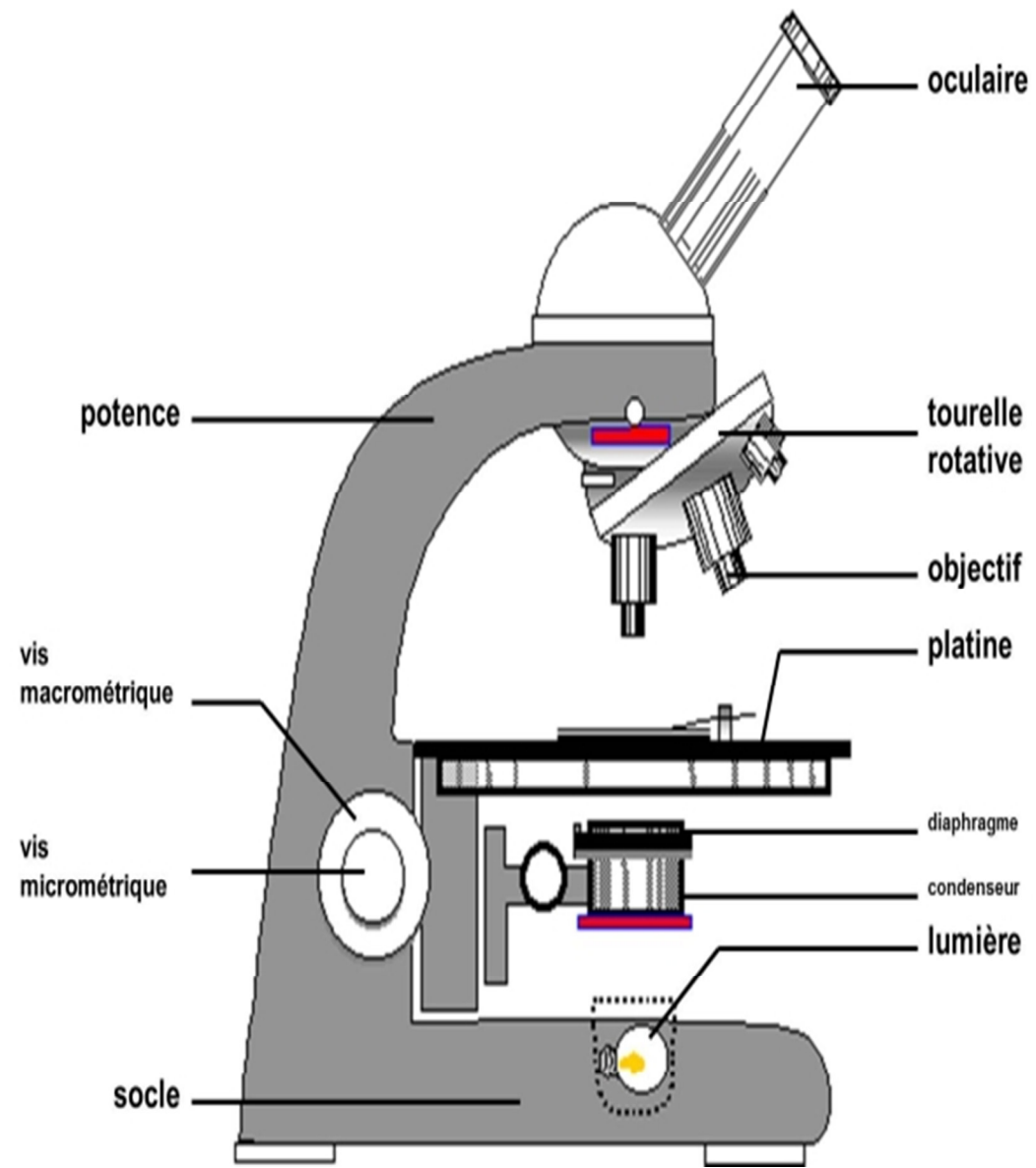
coloration



3- Microscopie

3-1- Le Microscope optique

- **Le statif :** est le corps de l'appareil qui supporte les divers mécanismes et tubes optiques
- **L'éclairage :** est situé à la base de l'appareil. Pour les modèles d'initiation il s'agit d'un miroir réfléchissant la lumière vers le système optique. Les modèles plus évolués sont quant à eux équipés de lampes au tungstène ou halogènes montées sur un dispositif de variation de l'intensité lumineuse.
- **La tourelle :** est un disque mécanique qui comporte plusieurs objectifs de différents grossissements.
- **La platine :** est le support sur lequel sont posées les lames de préparations. Elle est équipée de pinces valets dans les modèles de base, ou d'une surplatine à mouvement orthogonal contrôlé par vernier.
- **La tête d'observation :** est monoculaire sur les systèmes de base, binoculaire permettant l'observation avec les deux yeux, ou triloculaire permettant d'installer un dispositif de prises de vues (appareil photo ou caméra numérique)



La microscopie optique permet de visualiser des objets ou des détails invisibles pour nos yeux, dont la résolution est trop faible.

Technique

Le microscope optique utilise la lumière. Il est doté de deux lentilles :

- L'objectif, pour agrandir l'objet que l'on souhaite observer (il existe plusieurs grossissements) ;
- L'oculaire pour que les rayons arrivent à l'œil de manière parallèle, ce qui permet à l'œil de se reposer.

Des instruments supplémentaires permettent de régler la quantité de lumière (le diaphragme) ou la mise au point (molettes liées à un système de crémaillère) pour affiner l'observation de l'échantillon placé sur la platine porte-échantillon.

La résolution des microscopes optiques ne peut être supérieure à 0,2 micromètre, cette résolution étant limitée par la diffraction de la lumière. Des techniques permettent de s'approcher de cette limite : l'utilisation d'un objectif à immersion (dans l'huile), ou en diminuant la longueur d'onde de la lumière (toutefois limitée au visible).

Buts

- Se familiariser avec le microscope
- Observer des cellules animales et végétales
- Comparer la structure des cellules animales et végétales
- Observer la relation structure - fonction chez les cellules

Théorie

Le microscope est un instrument d'optique qui sert à regarder les objets très petits. Il est composé de deux parties principales, le statif et l'optique. Le fait qu'on puisse dire qu'un microscope en est un de qualité est basé sur son pouvoir de résolution qui détermine la netteté de l'image (par la qualité de ses lentilles) et non sur son pouvoir de grossissant.

Manipulation***Microscopie***

Pour utiliser adéquatement le microscope, il faut réaliser dans l'ordre les opérations suivantes :

- 1- Avant toute utilisation, vérifier qu'il ne manque aucune pièce au microscope, sinon le signaler immédiatement.
- 2- S'assurer que l'objectif le plus faible est mis en place.

- 3- Appuyer sur l'interrupteur de sorte que le témoin lumineux, placé sur le côté droit du statif (pied) s'allume.
- 4- Régler la luminosité grâce au bouton de réglage, à gauche sur le pied.
- 5- Placer le condensateur en butée supérieure et ouvrir le diaphragme de champ (s'il n'est pas déjà ouvert).
- 6- Placer la préparation sur la platine, la lamelle au-dessus de la lame, bien au centre du trou.
- 7- À l'aide de la vis micrométrique, monter au plus haut la platine. Regarder dans les oculaires tout en tournant la vis micrométrique de façon à ajuster votre mise au point grossière. Compléter ensuite votre mise au point fine avec la vis micrométrique. Toujours bien centrer la structure observée.
- 8- Pour avoir une vision stéréoscopique, éloigner et rapprocher les 2 oculaires au maximum. Déplacer les oculaires en mouvement de va et vient jusqu'à ce que vous n'observiez qu'un seul champ visuel.
- 9- On procède ensuite à l'ajustement des oculaires. a) Premièrement, regarder dans l'oculaire droit, en fermant l'œil gauche. Mettre au focus l'échelle présente dans cet oculaire (micromètre oculaire). Ensuite, faire une mise au point sur la préparation avec la vis micrométrique. b) Deuxièmement, regarder dans l'oculaire gauche, en fermant l'œil droit. Faire une mise au point sur la préparation, en tournant la bague de cet oculaire.

- 10- On commence toujours l'observation en utilisant le plus faible grossissement (objectif 4X). L'observation est alors possible à plus fort grossissement, après avoir pris soin de bien centrer son sujet d'étude. Pour passer à un plus fort grossissement, tourner la bague dentée du revolver afin de mettre en bonne position l'objectif désiré dans l'axe optique. Refaire la mise au point en utilisant uniquement la vis micrométrique et recentrer la structure. La mise au point se fait de la même manière pour les autres objectifs.

- 11- Pour faire une observation avec l'objectif 100X, on doit utiliser l'huile à immersion. Faire une mise au point à 400X. Passer au grossissement 1000X sans utiliser d'huile et faire la mise au point selon la procédure habituelle. Glisser ensuite de côté l'objectif 100X et déposer sur la préparation microscopique une goutte d'huile à immersion. Remettre en position l'objectif 100X et refaire la mise au point fine à l'aide de la vis micrométrique.

3-2- Le Microscope Électronique

Le microscope électronique utilise le même principe de lentilles et de faisceaux qu'un microscope optique.

Caractéristiques du microscope électronique

Ce qui varie, c'est que le microscope électronique est doté de lentilles électromagnétiques et d'un faisceau d'électrons, alors qu'un microscope optique utilise un faisceau de lumière et des lentilles en verre.

La résolution des microscopes électroniques est beaucoup plus grande (le grossissement atteint 2 millions de fois, contre 2.000 fois avec un microscope optique).

Les différents microscopes électroniques

Il existe plusieurs sortes de microscope électronique. Les plus connus sont :

- Le microscope électronique en transmission ;
- Le microscope électronique à balayage.

4- Etudes in situ des constituants biochimiques

4-1- Histochimie

Déceler et localiser à l'échelon cellulaire et tissulaire, sur des préparations histologiques les substances organiques et minérales, en particulier les constituants biochimiques (lipides, glucides et protéines) à partir de réactions chimiques mettant en évidence des fonctions ou des groupements

4-2- Histoenzymologie

Déceler et localiser des activités enzymatiques (et non les enzymes elles-mêmes) en mettant en évidence le produit de leur action sur un substrat spécialement fourni, donc surtout appliqué à des cellules vivantes

4-3- Autoradiographie

Utilisation de précurseurs de macromolécules marquées avec des isotopes radioactifs afin de repérer les sites de synthèse et étudier le cheminement de composés biologiques.

