

Préparation des tissus : information générale

Tissus inclus dans la paraffine

- Technique solidifiant les tissus et permettant de confectionner des coupes tissulaires minces (4-5µm).
- Applicable aux tissus fixés dans la plupart des fixateurs (Formaline 10%)
- Cette préparation n'est pas recommandée pour détecter les antigènes labiles, ou isoler l'ADN/ARN (option: congélation des tissus frais)

Étapes pour la préparation de tissus inclus dans la paraffine

1. Le prélèvement doit être pratiqué le plus tôt possible après l'euthanasie. Effectuer un prélèvement représentatif de votre tissu (éviter de comprimer ou malaxer le tissu et couper proprement au scalpel des tranches peu épaisses en tenant compte de l'orientation générale du prélèvement) d'une épaisseur de **3 à 5 mm**.
2. Placer les prélèvements dans des cassettes spécialement conçues pour la circulation des spécimens. N'oubliez pas de bien identifier vos cassettes à l'aide d'un crayon à la mine.
N'utilisez jamais de crayon à l'encre car celle-ci disparaît durant la circulation.
3. Déposer vos spécimens dans un récipient muni d'un couvercle hermétique et contenant une solution de fixateur (formaline tamponnée 10%). La fixation consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenus dans les lysosomes cellulaires. La quantité de liquide doit être de **15 à 20 fois** supérieure au **volume** du spécimen. Prenez en considération que le temps de fixation varie selon sa grosseur.
On calcule 1mm/H à température ambiante.
4. Acheminez vos pots de prélèvements mis en cassettes au laboratoire d'histologie par service de courrier.



Si vous avez des questions ou que vous n'êtes pas certains de la qualité de vos prélèvements, n'hésitez pas à nous consulter. Il nous fera plaisir de travailler avec vous et pour vous, selon vos besoins.

Un bon prélèvement et une bonne fixation font toute la différence pour l'obtention de résultats satisfaisants.

Tissus congelés

La congélation (abaissement brutal de la température à -20°C ou plus) empêche l'autolyse. Le prélèvement (alors durci) peut ensuite être coupé au cryostat.

- Cette technique solidifie les tissus permettant de réaliser des coupes très minces comme pour les tissus enrobés en paraffine.
- Les tissus non fixés et congelés conservent une antigénicité excellente, mais aux dépens de la morphologie.
- Convient à la détection d'antigènes labiles, pour la préservation de l'ADN/ARN.
 - ➔ Les tissus sont congelés dans un composé (gel O.C.T.) qui durcit à -20°C. L'OCT est un composé adéquat pour préserver l'ultrastructure cellulaire mais aussi les acides nucléiques.
- Ne convient pas aux études où la morphologie optimale des tissus est essentielle (option : inclusion dans la paraffine plus adaptée)
 - ➔ La congélation peut se faire sur du tissu **fixé** ou de préférence **frais** (non fixé)
- Les tissus frais se coupent plus facilement sauf le tissu adipeux qui se coupe mieux une fois fixé
- Tissu fixé, fixateurs possibles :
 - Formaline tamponnée 10 % ou paraformaldéhyde
 - Fixateurs à base de mercure (non recommandé)
 - Fixateurs à base d'alcool (inhibe congélation)

Étapes pour la préparation de vos tissus à congeler

Tissus frais

1. Effectuez le prélèvement de votre tissu d'une épaisseur d'au plus **3 mm** et d'une longueur adéquate selon le moule utilisé ensuite. (Ces moules en plastique sont disponibles au laboratoire d'histologie. N'oubliez pas de les identifier au marqueur permanent ou en ajoutant un papier d'identification placé sur le moule qui sera enveloppé de papier aluminium.)
2. Préparez un mélange **d'isopentane** et de **glace sèche** dans un contenant assez large (pétri en verre par exemple) et placer le moule en plastique (qui accueillera le spécimen) sur le contenant (Pétri) avec le mélange. Veillez à disposer la glace sèche assez loin par rapport au moule. Déposez le tissu au fond du moule en plastique et appliquer l'OCT immédiatement. Assurez-vous que le tissu est bien recouvert d'OCT et que le moule est rempli jusqu'au bord. Faire attention aux projections lors du contact entre la glace sèche et l'isopentane. Aucune projection ne doit se retrouver dans le moule avec le prélèvement. L'OCT est rapidement saisi par l'abaissement brutal de la température. Attention aux bulles d'air !
3. Placez les spécimens dans un congélateur à -80 °C ou -20°C selon les besoins de votre projet.
4. Transportez vos spécimens dans une glacière ou dans une boîte de styromousse avec de la glace sèche afin que les tissus ne subissent pas d'altération due aux écarts de température.
5. Cas particulier de cerveau (souris/rat)
Refroidir l'isopentane jusqu'à -30° / - 35°C sur la glace sèche puis immerger le cerveau dans l'isopentane refroidi. Attendre que les bulles cessent (30 sec à 1mn), puis placer le cerveau saisi dans une feuille d'aluminium toujours sur la glace sèche et attendre que l'isopentane s'évapore. Enfin, envelopper le cerveau et stocker à -80°C pendant au moins 48H avant la coupe. IL est recommandé de conserver l'isopentane à 4°C (hautement inflammable)

Tissus fixés :

1. Effectuez le prélèvement de votre tissu
2. Fixez votre spécimen dans du fixateur standard (Formaline 10% tamponnée),
3. Veillez à plonger le spécimen dans un volume de fixateur adéquat.
4. Acheminez le prélèvement dans son pot rempli de fixateur au laboratoire.
5. Au niveau de la plateforme d'histologie, le tissu sera ensuite incubé 2H environ dans du sucrose 25% (étape de déshydratation permettant une meilleure cryoconservation du tissu = meilleure morphologie des cellules évitant la formation de cristaux lors de la congélation), puis épongé sur du papier, enrobé dans un gel d'OCT et durci selon les procédures internes (point 3 protocole tissus frais).

ATTENTION

Avant d'acheminer vos échantillons à notre plateforme, veuillez remplir comme il se doit le **formulaire de requête de service PDF** que vous pourrez obtenir auprès de Mme Julie Hinsinger.

Le traitement de votre requête sera ainsi facilité par l'ajout de commentaires, informations pertinentes incluant également toutes vos coordonnées mises à jour.

Cheminement des tissus en paraffine

- 1- Préparation et mise en cassette des prélèvements
 - a. Le tissu est acheminé au laboratoire dans un fixateur standard (Formaline 10% tamponnée).
 - b. La coupe est faite en fonction du prélèvement reçu et de l'examen macroscopique.

- 2- Circulation : Étape consistant à faire pénétrer la paraffine au sein du tissu
 - a. Déshydratation des tissus : 3 bains d'alcool a concentrations croissantes c'est-à-dire : 70%-85%-90%, pour que le tissu ne subisse ni distorsion ni durcissement. On termine avec 3 bains d'alcool absolu afin d'enlever complètement l'eau des tissus.
 - b. L'éclaircissement : 3 bains de toluène à 100% qui servent à remplacer l'alcool dans les tissus afin que celui-ci soit miscible avec la paraffine. Le toluène éclaircira le tissu pour que son indice de réfraction soit plus élevé et augmentera sa transparence.
 - c. L'imprégnation : bains de paraffine chaude (44°C à 60 °C) pour solidifier le tissu.



Sakura Tissue Tek VIP E150

- 3- Inclusion (enrobage) des tissus
 - a. Le tissu est inclus dans un moule rempli de paraffine chauffée. Il est placé dans le moule selon un certain angle ou une certaine position afin de voir toutes les structures désirées lors de l'examen microscopique.



Station d'enrobage ESBE EC350

Cheminement des tissus en paraffine

- 4- Coupes au microtome (préparation des lames)
 - a. Les sections sont effectuées la plupart du temps à 4 µm d'épaisseur. Elles sont placées dans un bain d'eau chaude (43-45°C pour de la paraffine dont la T° de fusion est à 55-56°C) et étalées sur une lame polarisée que l'on fait sécher pendant une heure à l'étuve (45°C).



Microtome LEICA RM2255

- 5- Coloration de base ou spéciale
 - a. De base : HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran)
 - Déparaffiner les lames
 - 2 bains de toluène (95%-100%). 3 minutes chacun.
 - 3 bains d'alcool (80%-95%-100%). 3 minutes chacun.
 - Rincer à l'eau courante.
 - Hématoxyline de Gill. 3 à 10 minutes
 - Différencier avec le bicarbonate de Na 5 à 10 secondes
 - Rincer à l'eau courante.
 - Phloxine 1 minute.
 - Rincer à l'eau courante.
 - 3 bains successifs d'alcool à 100%. 40 secondes chacun.
 - Safran. 3 à 10 minutes (6minutes)
 - 3 bains successifs d'alcool à 100%. 40 secondes chacun.
 - 3 bains de toluène à 100%
 - Montage des lames.
 - b. Colorations spéciales :
 - Pour ce qui est des colorations spéciales, elles sont différentes selon la demande et selon ce que l'on désire observer (consulter les options proposées dans notre guide des services).
- 6- Lecture par le pathologiste et interprétation

Cheminement des tissus congelés

1- Préparation et mise en moule des prélèvements

- a. Le tissu est acheminé au laboratoire dans un fixateur standard (Formaline 10% tamponnée) ou est amené congelé, inclus dans l'OCT dans une glacière ou avec de la glace sèche (cf annexe préparation des tissus)



OCT



moules en plastique d'inclusion



prélèvement sur le porte-échantillon du cryostat

2- Coupes au cryostat

- a. Les sections sont effectuées la plupart du temps à 7 μm .
- b. Elles sont étalées grâce à un pinceau sur un support refroidi et contrôlé en température, puis collées par contact aux lames qui sont à température ambiante.
- c. La température de coupe varie d'un spécimen à l'autre. A titre d'exemple, un foie ne se coupe pas à la même température qu'une rate.



Leica CM3050 S

Cheminement des tissus congelés

3- Coloration de base ou spéciale

a. De base : HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran)

2 bains de toluène (95%-100%).

3 bains d'alcool (80%-95%-100%).

Rincer à l'eau courante.

Hématoxyline de Gill.

Différencier avec le bicarbonate de Na

Rincer à l'eau courante.

Phloxine.

Rincer à l'eau courante.

3 bains successifs d'alcool à 100%.

Safran.

3 bains successifs d'alcool à 100%.

3 bains de toluène à 100%

Montage des lames.

Les temps d'incubation sont raccourcis par rapport à la procédure pour des tissus inclus en paraffine.

b. Colorations spéciales :

Pour ce qui est des colorations spéciales, elles sont différentes selon la demande et selon ce que l'on désire observer (consulter les options proposées dans notre guide des services).

4- Lecture par le pathologiste et interprétation