

TOUT EN FICHES

EXERCICES ET MÉTHODES D'

HISTOLOGIE GÉNÉRALE

Sous la direction de **Marc Thiry**
Professeur à la Faculté des Sciences
à l'université de Liège (Belgique)

Nadine Antoine
Professeure à la Faculté de Médecine vétérinaire
à l'université de Liège (Belgique)

Stéphanie Caudroy
Maîtresse de conférences et praticienne hospitalière
à la Faculté de Médecine de l'université de Reims

Valérie Defaweux
Chargée de cours adjointe à la faculté de Médecine
à l'université de Liège (Belgique)

Pierre Rigo
Assistant pédagogique et acteur de la communication
scientifique à l'université de Liège (Belgique)

Nicolas Thelen
Assistant à la faculté des Sciences
de l'université de Liège (Belgique)

DUNOD

Photo de couverture: Cellules caliciformes de l'épithélium intestinal, dont le mucus est mis en évidence par le mucicarmin (en rouge). Gros intestin de chat. Fixation au liquide de Zenker-formol. Triple coloration: mucicarmin de Mayer, jaune de métanile et hématoxyline.

© Dunod, 2019
11, rue Paul Bert, 92247 Malakoff
www.dunod.com
ISBN 978-2-10-079194-1

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2° et 3° a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Table des matières

	<i>Avant-propos</i>	5
	<i>Comment utiliser cet ouvrage ?</i>	6
	<i>Remerciements</i>	8
1	Les bases de l'histologie	9
	QCM	23
	Vrai ou faux?	27
	Exercices.....	30
	Schéma de synthèse: Les bases de l'histologie.....	37
2	Les épithéliums de revêtement	39
	QCM	52
	Vrai ou faux?	56
	Exercices.....	58
	Schéma de synthèse: Les épithéliums de revêtement	63
3	Les tissus épithéliaux glandulaires	65
	QCM	79
	Vrai ou faux?	84
	Exercices.....	86
	Schéma de synthèse: Les tissus épithéliaux glandulaires	92
4	Les tissus conjonctifs	93
	QCM	107
	Vrai ou faux?	111
	Exercices.....	114
	Schéma de synthèse: Les tissus conjonctifs proprement dits.....	120
5	Les tissus cartilagineux	121
	QCM	129
	Vrai ou faux?	132
	Exercices.....	134
	Schéma de synthèse: Les tissus cartilagineux	138
6	Les tissus osseux	139
	QCM	152
	Vrai ou faux?	156
	Exercices.....	158
	Schéma de synthèse: Les tissus osseux	168

7	Le sang, la lymphe et les vaisseaux	169
	QCM	193
	Vrai ou faux?	197
	Exercices.....	199
	Schéma de synthèse: Le sang, la lymphe et les vaisseaux.....	206
8	Les tissus musculaires	207
	QCM	218
	Vrai ou faux?	224
	Exercices.....	226
	Schéma de synthèse: Les tissus musculaires.....	231
9	Les tissus nerveux	233
	QCM	255
	Vrai ou faux?	263
	Exercices.....	265
	Schéma de synthèse: Les tissus nerveux.....	270
10	Exercices d'intégration des différents tissus	271
	QCM	272
	Exercices.....	291
	<i>Abréviations</i>	299
	<i>Index</i>	301

Avant-propos

Ce livre a été conçu comme un outil pédagogique destiné à aider les étudiants en études supérieures à appréhender les concepts fondamentaux de l'histologie générale. Par divers types d'exercices, l'étudiant est incité à se poser des questions sur la matière et à compléter ainsi petit à petit ses connaissances.

L'ouvrage présente en dix chapitres les concepts fondamentaux de l'histologie générale. Il traite de l'histologie des tissus sains et adultes chez les mammifères, Homme inclus. Après une présentation des bases de l'histologie et en particulier, la description des différentes étapes à suivre pour le diagnostic histologique, les caractéristiques morphologiques de chacun des différents types de tissus sont exposées successivement. Les tissus épithéliaux, scindés en deux chapitres (chapitre 2 : épithéliums de revêtement, chapitre 3 : les tissus épithéliaux glandulaires) sont d'abord abordés, viennent ensuite les tissus conjonctifs, divisés en quatre chapitres (chapitre 4 : les tissus conjonctifs proprement dits, chapitre 5 : les tissus cartilagineux, chapitre 6 : les tissus osseux, chapitre 7 : le sang, la lymphe et les vaisseaux). Les tissus musculaires (chapitre 8) et nerveux (chapitre 9) font l'objet de la seconde partie du livre. L'ouvrage se termine enfin par un chapitre où sont proposés des exercices de diagnostic sur différentes coupes histologiques contenant plusieurs tissus intégrés, un avant-goût de l'histologie spéciale.

Cette division est nécessairement arbitraire, c'est pourquoi dans chaque chapitre présentant une notion précise, de multiples renvois permettent au lecteur de se référer rapidement aux données associées à la question traitée.

Chaque chapitre débute par un rappel théorique synthétique, sous forme de fiches, accompagné de schémas didactiques destinés à faciliter la compréhension des données et leur mémorisation. Ce rappel

théorique est suivi par de nombreux exercices de différents types (QCM, questions Vrai/Faux et exercices d'entraînement dans l'identification des cellules et des tissus) et de difficulté croissante. Ils permettent à l'étudiant de s'évaluer et de réviser ses connaissances ainsi que d'appliquer les concepts fondamentaux de l'histologie générale. Tous les exercices sont corrigés et commentés. Les questions Vrai/Faux jouissent également d'une réponse plus détaillée et les exercices d'entraînement bénéficient de conseils méthodologiques pour aider l'étudiant à construire une réponse. Un schéma de synthèse à la fin de chaque chapitre relie les différentes notions abordées pour aider à une réflexion globale.

La majorité des coupes histologiques sont colorées classiquement à l'hématoxyline et à l'éosine. Quelques colorations spéciales sont occasionnellement utilisées pour mettre en évidence certains constituants tissulaires. Cependant, la couleur n'étant pas indispensable à la bonne pratique du diagnostic histologique, les illustrations ont été volontairement toutes présentées en noir et blanc pour inciter les étudiants à faire appel aux seuls critères morphologiques.

Cet ouvrage d'histologie générale est destiné aux étudiants de licence de Sciences de la vie et de la Santé, aux étudiants en Médecine et Médecine vétérinaire, aux étudiants des IUT de Génie biologique et aux élèves en prépas BCPST (en France) ainsi qu'aux étudiants du Bachelier des Facultés de Sciences, de Médecine et de Médecine vétérinaire (en Belgique). Il pourra aussi être consulté par tous ceux qui ressentent le besoin de mettre à jour leurs connaissances dans un domaine en perpétuelle évolution, et qui est devenu indispensable à la compréhension des grandes fonctions biologiques et à celle de leurs dysfonctionnements.

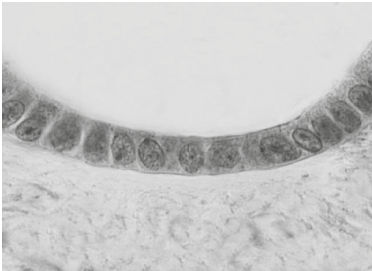
Comment utiliser

Les épithéliums de revêtement

2

Mots-clés

recouvrement • revêtement • polarité • épithélium simple • épithélium stratifié • épithélium pseudostratifié • microvillosités • stéréocils • cils • crista • cohésion • jonctions intercellulaires • desmosomes • jonctions serrées • jonctions adhérentes • zonula adherens • hémidesmosomes • molécules d'adhésion • jonctions communicantes • complexe de jonctions • avasculaire • malpighien • kératinisé • pavimenteux • cubique • prismatique • membrane basale • couche germinative • lumière



Épithélium simple cubique séparant la lumière du canal cochléaire (en haut) et le tissu conjonctif (en bas)

10 chapitres
et leurs mots-clés

Des rappels de cours
sous forme de fiches

Fiche 1

Généralités

D'origine mésenchymateuse, les tissus cartilagineux diffèrent des tissus conjonctifs proprement dits (précédemment décrits chapitre 4) par les propriétés que leur confère la substance fondamentale présente dans la MEC. Cette substance fondamentale, riche en protéoglycane (PGAGs) hydrophiles est responsable de la teneur en eau qui donne aux tissus cartilagineux une consistance de gel semi-solide. Les tissus cartilagineux peuvent supporter certaines pressions, mais restent néanmoins flexibles et déformables.

Les tissus cartilagineux se distinguent également des autres tissus conjonctifs proprement dits par le fait qu'ils sont avasculaires et non innervés.

Les tissus cartilagineux peuvent être permanents ou transitoires. Les **tissus cartilagineux permanents** constituent les pièces de soutien de l'appareil respiratoire (cloison du nez, squelette du larynx, des anneaux trachéaux et bronchiques...) ainsi que la plupart des cartilages articulaires et l'extrémité sternale des côtes. Les **tissus cartilagineux transitoires** sont des tissus cartilagineux précurseurs des os du squelette en développement.

Les fibres qui composent la MEC permettent de classer les tissus cartilagineux en trois catégories : le **tissu cartilagineux hyalin**, le **tissu cartilagineux élastique** et le **tissu cartilagineux fibreux ou fibrocartilage**.

Le cartilage hyalin est le plus répandu. Il servira donc de modèle pour l'étude des tissus cartilagineux.

Fiche 2

Cellules cartilagineuses

Les cellules propres au cartilage sont appelées **chondroblastes** ou **chondrocytes**, selon l'état fonctionnel dans lequel elles se trouvent. Les **chondroblastes** sont des cellules actives responsables de la synthèse de la matrice cartilagineuse. Cette matrice entoure petit à petit les chondroblastes et finit par les enserrer étroitement. Une fois enfermées complètement dans la matrice, les cellules ont peu de possibilités de se mouvoir si ce n'est par apposition de nouvelle matrice, qui permet aux cellules de s'écarter progressivement les unes des autres. Ces cellules sphériques ou ovales possèdent un volumineux noyau central, arrondi et contenant un nucléole visible.

Les **chondrocytes** sont des chondroblastes peu actifs (figure 5.1), qui gardent néanmoins la capacité de synthétiser des protéines et des PGAGs matriciels. Ils possèdent un noyau dont l'état de condensation de la chromatine et la présence d'un nucléole visible sont liés à l'état d'activité de la cellule.

Les caractéristiques du cytoplasme des cellules cartilagineuses sont à mettre en relation avec la capacité de synthèse des protéines et des PGAGs de ces cellules : REL et surtout REG abondant, appareil de Golgi bien développé. On y trouve des grains de glycogène, les cellules tirant leur énergie de la glycolyse anaérobie, et des vacuoles lipidiques, qui augmentent en nombre au sein du cytoplasme des chondrocytes âgés peu actifs.

Les cellules cartilagineuses sont situées dans des logettes ou lacunes arrondies et dépourvues d'éléments matriciels. Ces logettes sont appelées des **chondroplastes** (figure 5.1).

Lors de la fixation, les cellules cartilagineuses adoptent une morphologie rétractée artefactuelle au sein des logettes, rendant ces dernières plus visibles. La présence de ces logettes procure un aspect de « fromage de gruyère » au tissu cartilagineux. Le tissu cartilagineux est dépourvu de cellules étrangères (lymphocytes, macrophages...).

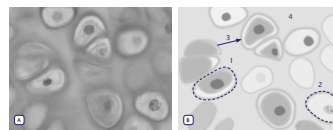


Figure 5.1 : Illustrations du tissu cartilagineux hyalin

A1 : coupe histologique, B1 : schéma correspondant à A1 ; B2 : chondroblaste (noyau décondensé) ; B3 : chondroplaste ou logette ; B4 : MEC

Fiche 3

Matrice cartilagineuse

Comme tous les tissus conjonctifs, les cellules cartilagineuses baignent dans une matrice extracellulaire composée de substance fondamentale et de fibres.

Substance fondamentale

La substance fondamentale cartilagineuse contient des PGAGs sulfatés, principalement représentés par de l'aggrécane. Celui-ci est composé d'une protéine centrale liée à des chaînes de GAGs. Les GAGs (chondroïtine-sulfate et kératine-sulfate) composent ces PGAGs sont riches en radicaux acides chargés négativement. Ceux-ci sont très hydrophiles et sont responsables de la teneur en eau de la matrice cartilagineuse. Les PGAGs s'associent à l'acide hyaluronique (GAG non sulfaté, chapitre 4) pour former d'importants agrégats fortement hydratés et sont responsables des propriétés de résistance à la compression associée par le tissu cartilagineux hyalin.

Des enzymes protéolytiques (métalloprotéinases) telles les aggrecanases permettent la dégradation de la matrice au cours de son renouvellement, de nombreux facteurs de croissance et des cytokines, produits principalement par les chondroblastes impregnent la substance fondamentale.

La substance fondamentale possède des propriétés tinctoriales basophiles.

Fibrilles de collagènes

Le collagène constitutif du tissu cartilagineux est un collagène de **type II**, à l'état de **fibrilles** dispersées à travers toute la matrice. Celles-ci ne sont pas visibles en microscopie optique classique, leur indice de réfraction étant identique à celui de la substance

De nombreux
schémas

Des questions Vrai/Faux

Des schémas de synthèse
en fin de chapitre

Des QCM pour s'auto-évaluer

Des exercices pour s'entraîner avec des conseils méthodologiques

Réponses

1. c. L'histologie est la partie de la biologie qui étudie la structure des tissus et leurs propriétés fonctionnelles. L'étude des cellules n'est pas l'histologie, mais c'est la cytologie ou biologie cellulaire. L'étude des organes et l'organisation des corps différents tiennent fondamentaux au sein des divers organes et de l'organe de l'anatomie microscopique ou histologie des organes. Un organe est effectivement un assemblage de cellules et de l'accomplissement d'un ou plusieurs fonctions spécifiques. Souvent, un des tissus est responsable et est responsable de la fonction majeure d'un organe.
2. d. Les techniques classiques de l'histologie comprennent plusieurs étapes à réaliser pour obtenir un ordre bien défini. La préparation ou l'échantillonnage commence typiquement avec une procédure de fixation de façon à "figer" les structures le plus proche de l'état vivant. Une fois fixés, les échantillons sont placés dans des milieux d'inclusion qui est capable de soutenir suffisamment l'échantillon pour pouvoir y réaliser des coupes minces. Le plus souvent c'est la paraffine qui est utilisée pour enrober l'échantillon. Les échantillons sont ensuite débits en fines tranches de quelques microns d'épaisseur. Ces coupes subissent ensuite un ensemble de traitements destinés à à colorer les éléments de façon plus ou moins contrastée avant d'être recouverts d'un résine (montage) permettant de maintenir en place une lamelle couvre-objet assurant leur protection.
3. d. e. La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des échantillons biologiques. La paraffine est une substance étanche et un mélange d'hydrocarbures saturés à chaîne non cyclique. Son intérêt est de rendre chimiquement neutre et stable les nombreux solvants (toluène, xylène, benzène, chloroforme...) et faire que la paraffine n'est pas miscible à l'eau. Les échantillons fixés devront être déshydratés dans des bains d'alcool à degrés croissants puis dans un solvant organique non miscible (par exemple, le toluène ou le xylène) et pour

finir dans de la paraffine chauffée à son point de fusion (56-58 °C). Une fois imprégnée par la paraffine, les échantillons peuvent alors être débits avec un microtome en coupes fines de quelques microns d'épaisseur.

b. et c. Le volume de liquide de l'échantillon concentré et le type de fixateur utilisé, la température de la fixation peuvent varier pendant plusieurs semaines. La déshydratation, qui permet de remplacer l'eau contenu dans les tissus par un alcool d'augmentation de concentration effectuée en incubant l'échantillon dans des bains d'alcool de concentrations croissantes jusqu'à l'alcool absolu (100%) de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire à l'obtention de coupes fines et régulières) implique aussi l'élimination lente de la coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déshydratation et de déparaffinisation. Cette dernière est réalisée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (par exemple le toluène) puis dans des alcools de concentrations décroissantes, de 100% (compatible avec le solvant précédant) jusqu'à 70% (compatible avec l'eau), avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale. La paraffine est donc éliminée de façon soignée et couramment utilisée en histologie. Elle se compose d'un colorant nucléaire, l'hématoxyline, d'un colorant cytoplasmique, l'éosine. L'hématoxyline est un colorant cationique (ou basique), qui a une affinité pour les éléments chargés négativement des structures chimiques (nucléiques des bases). Il colore notamment les noyaux en bleu/violet. À contrario, l'éosine est un colorant anionique (ou acide) qui a une affinité pour les éléments chargés positivement (cationiques) des osmophiles. Il colore le cytoplasme en rose et les autres cellules colorées aussi les fibres de collagène du tissu conjonctif (chapitre 4) en rose pâle. Le bain de déshydratation et de déparaffinisation couramment utilisé pour différencier

© Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

25

Remerciements

Je remercie très vivement tous ceux qui depuis plusieurs années participent au bon fonctionnement de mes cours dispensés aux étudiants du bachelier en Sciences biologiques. Il s'agit en particulier des membres du collectif enseignant de la Faculté des Sciences et des assistants qui encadrent les séances d'aide à l'étude et les travaux pratiques de biologie et d'histologie : Pierre Balthasart, Sébastien Brouwers, Philippe Compère, Nadine Coosemans, Véronique Goosse, Alain Hambuckers, Marine Joris, Marielle Lebrun, Sandrine Malchair, Ludovic Sottiaux et Marie-France Versali.

Je remercie bien sûr tous mes collaborateurs grâce auxquels j'ai pu enrichir et diversifier mes connaissances en histologie. Je pense en particulier aux membres de mon unité de recherche du GIGA-Neurosciences : Jean Defourny, Érica Marucco Fuentes et Patricia Piscicelli.

Un tout aussi grand merci à Madame Cécile Kinet pour la relecture minutieuse de chacun des dix chapitres. Son expérience remarquable dans l'enseignement de l'histologie à la Faculté de Médecine à l'Université de Liège et ses commentaires judicieux nous ont été d'une aide précieuse.

Je termine en exprimant toute ma gratitude à Nadine, Nicolas, Pierre, Stéphanie et Valérie avec lesquels j'ai partagé cette magnifique expérience. L'échange de nos savoirs, chacun dans sa spécialité, ainsi que l'expérience pédagogique et l'esprit critique de chacun ont été des atouts considérables dans l'élaboration notre livre.

Je les remercie chaleureusement.

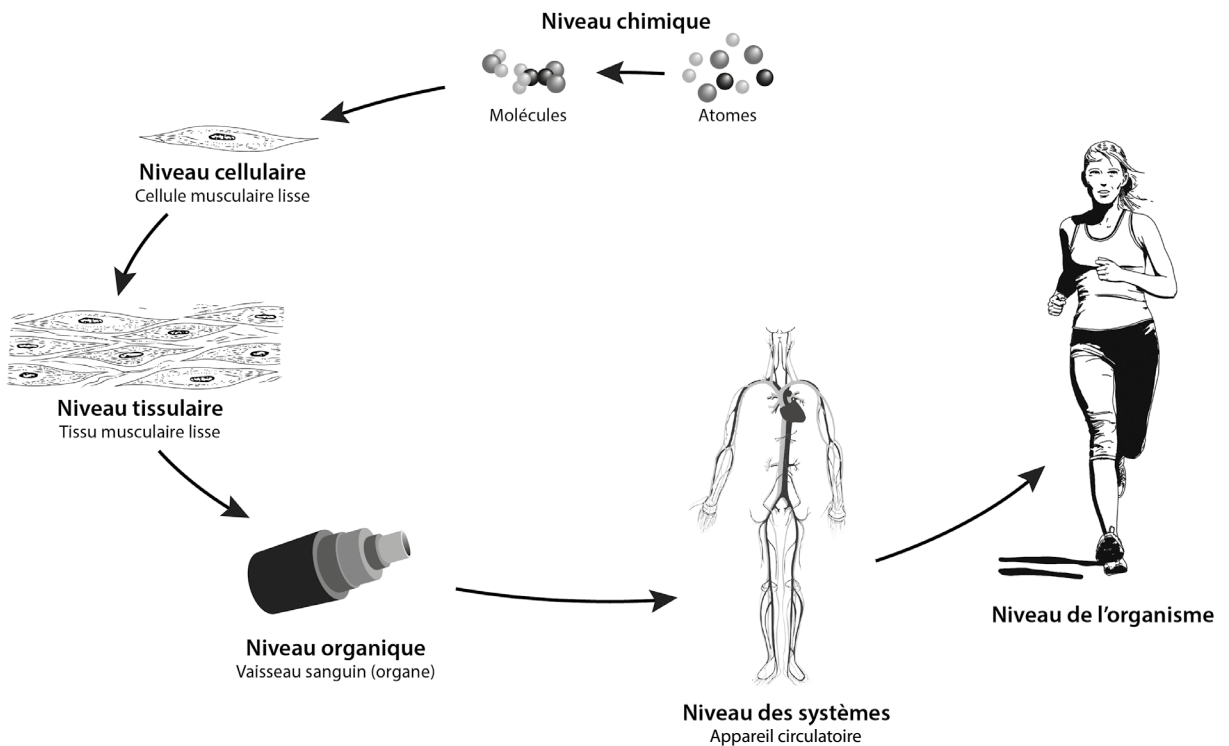
Marc Thiry

Les bases de l'histologie

1

MOTS-CLÉS

cellule ■ tissu ■ organe ■ différenciation cellulaire ■ appareil ■ système ■ fixation ■ déshydratation ■ inclusion ■ coupe ■ coloration ■ montage ■ diagnostic ■ critères morphologiques ■ plans de coupe ■ symétrie bilatérale ■ images à deux dimensions



Les tissus, un niveau d'organisation du vivant.

Tissus

Les organismes vivants révèlent une extraordinaire diversité. La **cellule** est l'unité fondamentale commune à tous les êtres vivants, c'est la plus petite portion de matière vivante qui puisse se reproduire. L'étude des cellules est la **cytologie** ou la biologie cellulaire.

Chez les unicellulaires, une unique cellule assume toutes les activités (nutrition, reproduction, excrétion...) de l'être. Chez les pluricellulaires, dont l'organisme est formé d'un grand nombre de cellules étroitement associées, il s'établit une différenciation morphologique en rapport avec une division du travail, une spécialisation dans les différentes activités ; on assiste à l'édification des différents tissus. Un **tissu** est donc un assemblage de cellules spécialisées dans l'accomplissement d'un ou plusieurs rôle(s) déterminé(s). L'étude microscopique des tissus est le propre de l'**histologie générale**. Le plus couramment, les observations tissulaires se font au microscope optique (MO) ordinaire en lumière transmise (figure 1.1).

Chez les vertébrés, on distingue quatre grands groupes de tissus fondamentaux :

- Les **tissus épithéliaux** couvrent les surfaces externes et les cavités internes de l'organisme (épithéliums de recouvrement, chapitre 2) ou forment des glandes responsables des sécrétions de l'organisme (épithéliums glandulaires, chapitre 3).
- Les **tissus conjonctifs** produisent une matrice extracellulaire (MEC) abondante dans laquelle se trouvent dispersées les cellules. Ils servent de lien, mais aussi de support, pour les autres tissus et comptent parmi eux les tissus cartilagineux et osseux, le sang et la lymphe (chapitres 4-7).
- Les **tissus musculaires** se caractérisent par des propriétés contractiles de leurs cellules et sont donc impliqués dans tous les mouvements de l'organisme (chapitre 8).
- Les **tissus nerveux** forment l'encéphale, la moelle épinière, ainsi que les nerfs et les ganglions périphériques. Les cellules nerveuses permettent la communication entre des zones largement distantes de l'organisme : elles reçoivent et transmettent les informations pour engendrer dans l'organisme les réponses appropriées (chapitre 9).

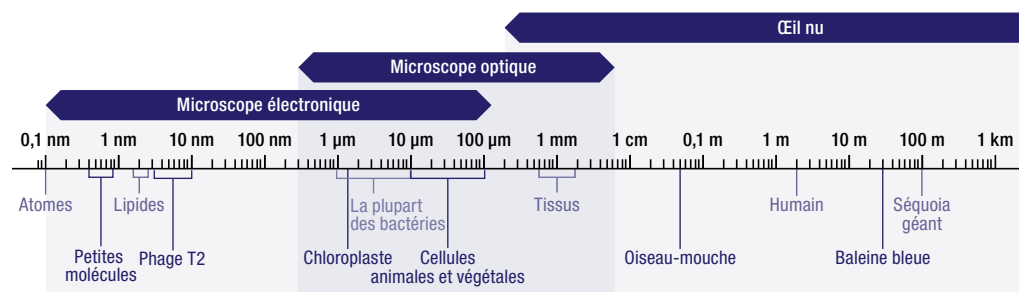


Figure 1.1 Étude de l'échelle de grandeur du vivant

En général, dans l'organisme, les tissus ne s'organisent jamais de façon indépendante, mais ils se juxtaposent ou s'interpénètrent et se combinent pour former des organes (figure en ouverture de chapitre). Un **organe** est donc un assemblage de tissus où chaque tissu apporte sa fonction spécifique. Souvent, un des tissus est prédominant et est responsable de la fonction principale d'un organe (le cœur est un organe formé principalement d'un tissu musculaire qui assure la circulation du sang en pompant le sang par des contractions rythmiques vers les vaisseaux sanguins et les cavités du corps). L'étude des structures

macroscopiques et des fonctions des organes relèvent respectivement de l'anatomie et la physiologie. L'étude de la distribution, de l'organisation et de la répartition des quatre tissus fondamentaux au sein des différents organes de l'organisme est l'**anatomie microscopique** ou histologie des organes (ou histologie spéciale).

Plusieurs organes se regroupent à leur tour dans un certain ordre pour concourir à l'accomplissement d'une activité vitale déterminée c'est-à-dire d'une des grandes fonctions de l'organisme. L'ensemble des organes groupés en vue d'une même fonction constitue un **appareil** (figure en ouverture de chapitre ; appareil digestif, respiratoire, circulatoire...). Si tous les organes d'un appareil sont formés d'un même tissu, on utilise le terme de **système** (système nerveux). Il y a toujours interdépendance des appareils et des fonctions. Différents mécanismes assurent la corrélation des différentes parties de l'organisme et c'est de la bonne coordination des différentes fonctions que résulte l'unité de l'organisme (figure en ouverture de chapitre).

Fiche 2

Préparations histologiques

Dans la plupart des cas, l'étude des structures cellulaires et tissulaires nécessite l'obtention de coupes suffisamment fines dans le matériel biologique pour être observées avec un MO ordinaire. Les coupes examinées sont l'aboutissement de procédures techniques élaborées, comportant plusieurs étapes successives : fixation, déshydratation, inclusion, coupe, coloration, montage.

La **fixation** est destinée à immobiliser les structures cellulaires et tissulaires, dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. Elle doit également maintenir en place la ou les substances que l'on veut étudier et empêcher leur déplacement ultérieur en conservant, le cas échéant, leur activité. La fixation doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur. Les liquides fixateurs les plus couramment utilisés sont les solutions à base de formol. La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements (de quelques heures à plusieurs jours).

Après une fixation suffisante, le fragment de matériel biologique étudié est habituellement trop épais pour pouvoir être examiné directement sous un microscope optique ; il devra donc être débité en tranches fines ou coupes histologiques. Toutefois, de telles coupes ne sont généralement réalisables qu'après avoir donné une plus grande consistance au fragment. Ceci s'obtient par l'enrobage de l'objet biologique dans un support solide (inclusion). Les cellules ayant une forte teneur en eau et les milieux d'inclusion étant généralement hydrophobes, la pièce fixée doit être déshydratée avant l'inclusion. Cette **déshydratation** s'effectue habituellement en faisant séjourner la pièce dans des bains d'éthanol de plus en plus concentrés jusqu'à l'éthanol absolu puis dans des bains d'un solvant de l'agent d'inclusion (par exemple, le toluène).

L'**inclusion** a pour but de permettre la confection de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus couramment utilisé est la paraffine. Une fois déshydratés, les fragments de tissus sont coulés dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage ($> 56^{\circ}\text{C}$) et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse. C'est au cours de cette étape que l'on place l'échantillon selon l'orientation désirée (fiche 5).

Les **coupes** du bloc de paraffine sont faites à l'aide d'un **microtome** permettant d'obtenir des tranches de section de 2 à 8 μm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

Les techniques de **coloration** réalisées sur lames permettent de différencier les constituants de la préparation. Cependant, le plus souvent, le ton lui-même de la coloration n'a pas de signification particulière et on ne peut rien en conclure quant à la nature chimique de l'élément coloré. Les colorations de routine utilisent un ou deux colorants différents. Par exemple, la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (coloration HE) associe l'hématoxyline colorant les noyaux cellulaires en bleu/violet et l'éosine mettant en évidence les cytoplasmes en rose. De nombreuses colorations spéciales permettent de visualiser différentes structures ou composants des tissus (par exemple, les fibres élastiques par la coloration à l'orcinine, chapitres 4 et 7).

Finalement, les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre (montage). Les coupes ainsi montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines d'années.

Remarque

Pour différencier les constituants cellulaires et tissulaires de l'échantillon, les coupes peuvent être soumises à d'autres techniques utilisant une variété de substances autres que les colorants histologiques.

L'**immunomarquage** fait appel à des anticorps pour localiser un antigène de l'échantillon. Cette méthode consiste à mettre au contact de la préparation histologique une solution contenant un anticorps. L'anticorps se fixe spécifiquement à l'endroit où se trouve l'antigène recherché. Le complexe stable formé entre l'anticorps et son antigène est révélé, car l'anticorps est préalablement marqué soit avec des molécules fluorescentes (observées sous le microscope à immunofluorescence), soit avec des enzymes (révélés par une réaction enzymatique avec un substrat spécifique) ou encore des éléments radioactifs (révélés par autoradiographie, voir ci-dessous).

L'**hybridation *in situ*** est une approche permettant de localiser une séquence de nucléotides (ARN ou ADN simple brin) connue dans l'échantillon, la cible, au moyen d'une séquence complémentaire, la sonde.

Pour pouvoir localiser une molécule d'ADN cible, celle-ci est préalablement dénaturée par la chaleur (la séquence double brin devient simple brin).

La sonde complémentaire de la cible est finalement observable, car la sonde est marquée soit par des isotopes radioactifs (détectés par autoradiographie, voir ci-dessous) soit par des molécules fluorescentes (visualisées à l'aide d'un microscope à immunofluorescence) ou non-fluorescentes et dans ce cas, par exemple avec la biotine, elles sont reconnues par un réactif approprié (révélé par immunomarquage).

Cette technique a permis d'identifier et de mettre en évidence des gènes et leurs expressions dans les préparations histologiques.

L'**autoradiographie** repose sur le principe que des éléments (isotopes) radioactifs présents dans la préparation biologique sont capables d'impressionner une émulsion photographique mise à son contact.

Un isotope radioactif d'un élément participant au métabolisme (le radiotraceur) peut être inséré dans une molécule organique.

Lors de l'expérience, il est incorporé aux tissus, aux endroits de son renouvellement cellulaire. L'émulsion photographique posée sur la préparation histologique, est impressionnée par l'isotope et est ensuite développée.

L'endroit où l'isotope a été incorporé peut ainsi être localisé par observation au MO. L'emploi d'acides aminés tritiés (marqués au tritium) permet par exemple de suivre le remplacement des protéines tissulaires.

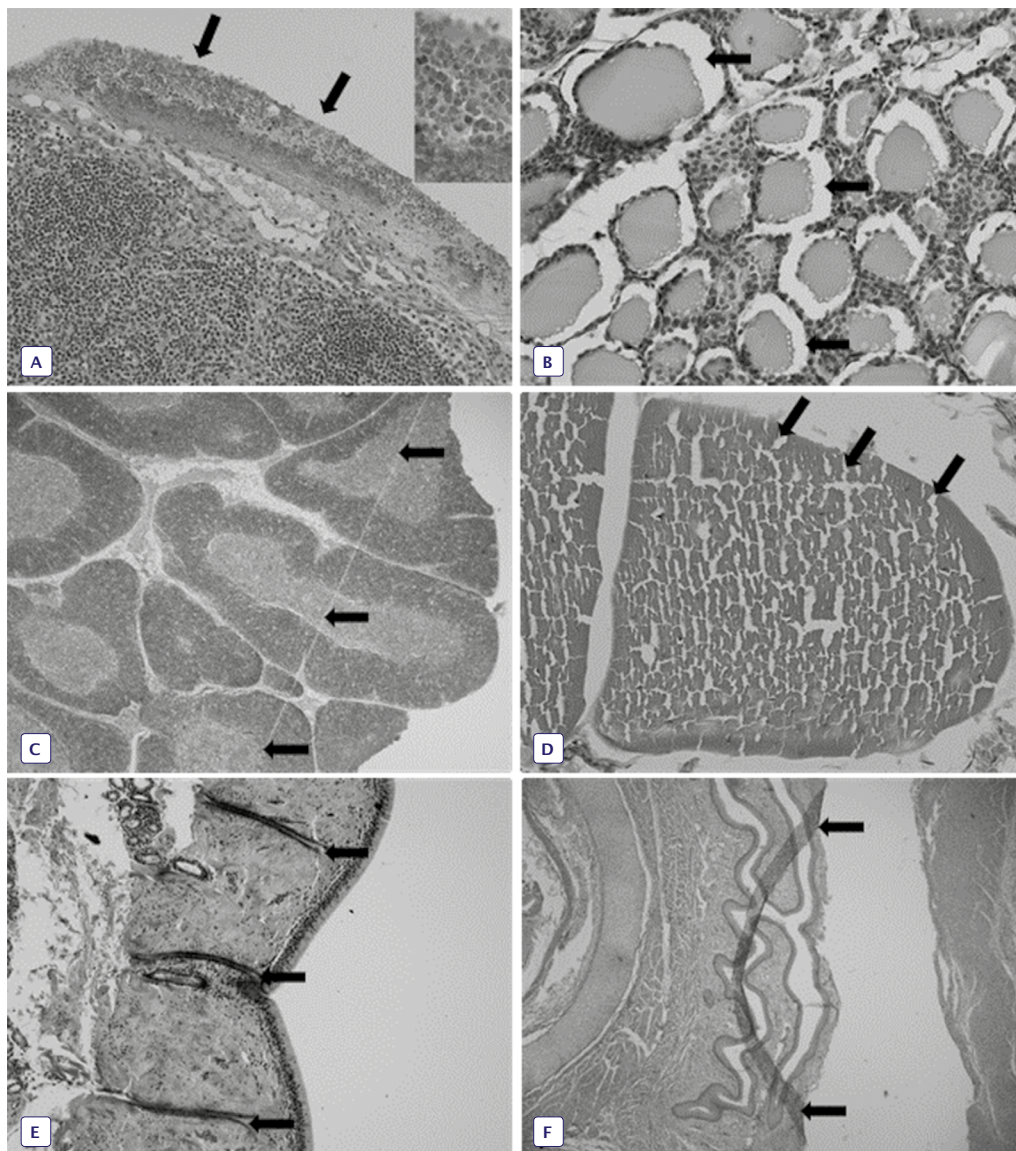


Figure 1.2 Différents types d'artéfacts créés par la technique

A. Artéfact de prélèvement: en surface du prélèvement (ganglion lymphatique), nous observons un dépôt de cellules sanguines (flèches, encart). **B.** Artéfact de fixation: dans les vésicules de la glande thyroïdienne (follicules thyroïdiens), un espace (flèches) se crée entre l'épithélium périphérique et le contenu (colloïde) qui se rétracte sous l'effet du fixateur. Ce décollement peut avoir lieu sur tout le pourtour du follicule.

C. Artéfact de coupe: défaut dans la coupe engendré par une strie dans le couteau du microtome et identifié par la présence d'une ligne rectiligne apparente (flèches) dans le matériel biologique (thymus). **D.** Artéfact de coupe: une série de craquelures (flèches) sont visibles dans le matériel biologique (tendon). Celui-ci est une substance très dure à couper. Le couteau ne peut parfois le traverser d'un seul trait, mais avance par saccades, engendrant une image avec ces craquelures, dite de broutage. **E-F.** Artéfacts de montage: lors du dépôt des coupes sur les lames, les coupes peuvent se replier sur elles-mêmes, générant des plis (E, flèches) ou un étalement incomplet (F, flèches) qui empêche toute observation à ces endroits. (E: voie respiratoire, F: coupe transversale au niveau de l'œsophage-trachée).

Toutes ces opérations peuvent générer des anomalies qui sont autant d'**artéfacts** qu'il faut tenter d'éviter et savoir reconnaître (figure 1.2). Il peut exister des artéfacts de prélèvement (coups de ciseaux ou de pinces), de fixation (dégradation autolytique du matériel biologique à la suite d'une fixation tardive), d'inclusion (vides artificiels dus à la rétraction du matériel biologique), de coupe (stries dues à des défauts du couteau), de collage (décollements, plis et replis de la coupe), de coloration (précipités, taches de colorant), de montage (bulles d'air entre la coupe et la lamelle).

Fiche 3

Diagnostic histologique

Pour identifier une préparation histologique inconnue et en échafauder un diagnostic, il faut respecter quelques règles de base, en procédant de manière systématique dans chaque cas :

- Il faut commencer l'examen microscopique en parcourant l'ensemble de la coupe au faible grossissement ($\times 25-40$), c'est-à-dire qu'il faut avoir observé tous ses bords libres. Il faut faire particulièrement attention à la présence, dans la préparation, de subdivisions éventuelles en diverses zones, d'une lumière (espace occupant l'intérieur d'un organe : cavité ou autre canal de l'organisme), de régions différemment contrastées ou d'irrégularités, comme des plis. Certains artéfacts induits par la technique, comme des replis de la coupe, doivent être reconnus (figure 1.2 F).
- Il faut poursuivre ensuite par un examen microscopique à un plus fort grossissement ($\times 400-600$) des différentes aires repérées lors de la première étape, en débutant par celle qui occupe la surface la plus étendue ou celle qui borde une large lumière. Cette analyse consiste en une description détaillée des différents constituants tissulaires. Il faut donc caractériser au mieux les diverses cellules et la matrice extracellulaire, le matériel dans lequel elles se trouvent, à l'aide de critères morphologiques (fiche 4). Il faut noter l'importance relative de ces deux constituants tissulaires. Il faut également relever la disposition des cellules les unes par rapport aux autres. Certaines cellules, comme les fibrocytes des tissus conjonctifs (chapitre 4), peuvent être isolées dans une matrice abondante. D'autres, comme toutes les cellules épithéliales (chapitres 2 et 3), peuvent être étroitement accolées sur de grande surface, laissant peu de place à la matrice extracellulaire. Ici aussi, des artéfacts engendrés par la technique doivent être identifiés. Les problèmes liés à l'incidence de coupe doivent aussi être considérés (fiche 5).
- À partir d'une synthèse des données de l'observation, une ou éventuellement plusieurs hypothèses de diagnostic doivent être édifiées. Cette étape revient à classer les résultats de l'observation en les replaçant dans les catégories de tissus concernées. À ce stade, il faut notamment dégager l'essentiel de l'accessoire, c'est-à-dire « hiérarchiser » les résultats de l'observation en fonction de leur importance comme critère de reconnaissance.
- La validité de chaque hypothèse doit être vérifiée soigneusement en fonction des concepts théoriques et le diagnostic retenu doit coller le plus correctement et le plus complètement avec la théorie. À ce stade, certains éléments théoriques non notés lors des observations peuvent être mis à l'examen pour confirmer ou infirmer l'hypothèse.

Critères morphologiques de caractérisation des constituants tissulaires

Cellules

Pour caractériser les cellules, les traits à examiner doivent être les suivants :

- La **taille** : elle est très variable. Parmi les cellules les plus petites de l'organisme, on note certains éléments mobiles du sang, les lymphocytes qui n'ont qu'un diamètre de 6 à 8 μm (chapitre 7). En revanche, les cellules peuvent atteindre plusieurs dizaines de μm de long dans les muscles squelettiques (chapitre 8). Dans les préparations histologiques de mammifères, les globules rouges (chapitre 7) sont habituellement utilisés comme cellule de référence (en moyenne 7,2 μm) pour estimer la taille des autres cellules.
- La **forme** : certaines sont arrondies, d'autres sont cubiques ou prismatiques, d'autres encore sont fusiformes. Certaines ont des prolongements, ramifiés ou non, leur donnant un aspect étoilé, comme les astrocytes des tissus nerveux (chapitre 9). Notons que les limites cellulaires ne sont pas toujours aisées à identifier. Dans ce cas, la forme des noyaux peut être utilisée pour estimer la forme des cellules (voir ci-dessous).
- Le **noyau** : il représente le plus souvent le compartiment cellulaire le plus visible dans les préparations histologiques. Le nombre, la position au sein de la cellule et la forme de ce compartiment cellulaire varient en fonction du type cellulaire et/ou des conditions physiologiques (figure 1.3). La majorité des cellules possèdent un noyau unique. Cependant, certaines cellules, comme les cellules superficielles de l'épithélium urinaire (chapitre 2) ou les cellules musculaires cardiaques (chapitre 8), peuvent être binucléées. D'autres, comme les cellules musculaires squelettiques (chapitre 8) en renferment une multitude (entre 40 et 500). Généralement, le noyau est central, mais dans certaines cellules notamment celles qui accumulent de grandes quantités de produits de sécrétion, comme les cellules muqueuses de l'épithélium gastrique (chapitre 3), le noyau est décentré (ou excentrique). Dans d'autres cellules remplies par une volumineuse vacuole lipidique (adipocyte blanc, chapitre 4) ou par un abondant cytosquelette contractile (cellule musculaire squelettique, chapitre 8), le ou les noyau(x) est (sont) repoussé(s) à la périphérie de la cellule. Le plus souvent, la forme du noyau affecte la forme de la cellule. Ainsi, dans une cellule ronde (figure 1.3 A), le noyau sera très souvent sphérique tandis que dans une cellule effilée le noyau sera allongé dans le sens du grand axe de la cellule. D'autres noyaux peuvent être triangulaires (noyau des cellules caliciformes, figure 1.3 D, chapitre 3) ou réniformes (noyau en forme de rein des monocytes, figure 1.3 E, chapitre 7) ou présenter plusieurs lobes reliés par de fins ponts (les granulocytes du sang, figure 1.3 F, chapitre 7).