

Analyses morphologiques des cellules et des tissus

**Pr Mariam Naciri
2011**

Intérêt de l'histologie

Histologie: Définition



Anatomie

Structures et organes du corps humain

Physiologie

Fonctionnement des organes

Unités de mesure dans le système international

■ Prefixes:

micro : 10^{-6}

nano : 10^{-9}

pico : 10^{-12}

femto : 10^{-15}

Longueur:

1 μm = 0,001 mm = 10^{-6} m

1 nm = 0,001 μm = 10^{-9} m

1 A (Angstrom) = 0,1 nm = 10^{-10} m

Volume :

1 fl = 1 μm^3

Poids :

1 dalton = 1,67 **10^{-24}** g (masse d'un atome d'hydrogene)

Préparations tissulaires (histologiques)

Fixation :

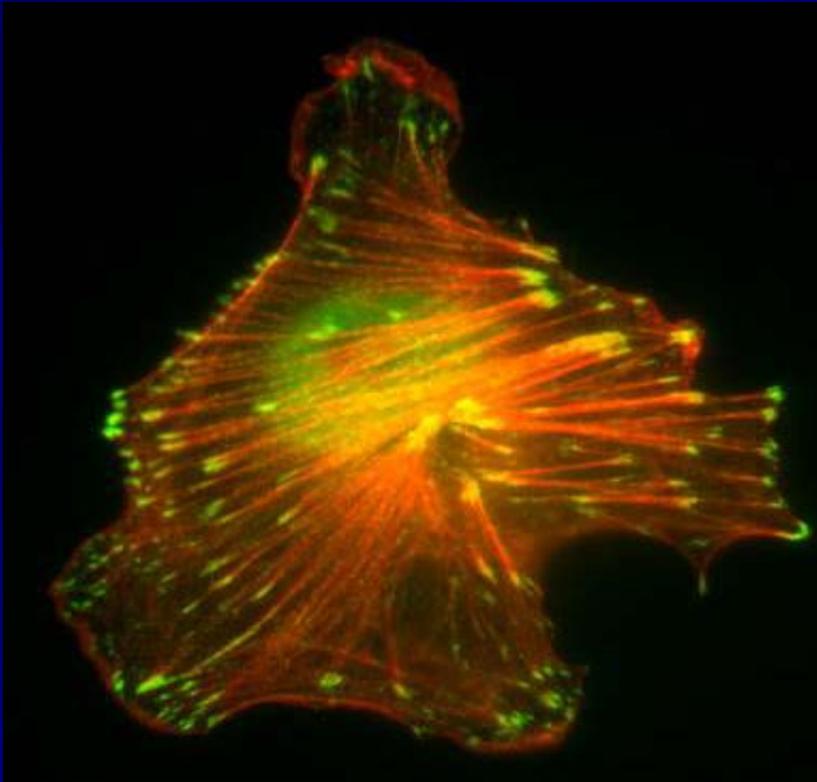
- Evite la décomposition post-mortem, la digestion enzymatique ; préserve l'architecture des tissus ; immobilise les tissus dans un état aussi proche que possible de l'état initial ; doit se faire le plus vite possible après le prélèvement.
- Agents chimiques : formol, acétone, glutaraldéhyde, acide osmique (pénétration non instantanée)
- Agents physiques : congélation - desiccations

Préparations tissulaires (histologiques)

Inclusion :

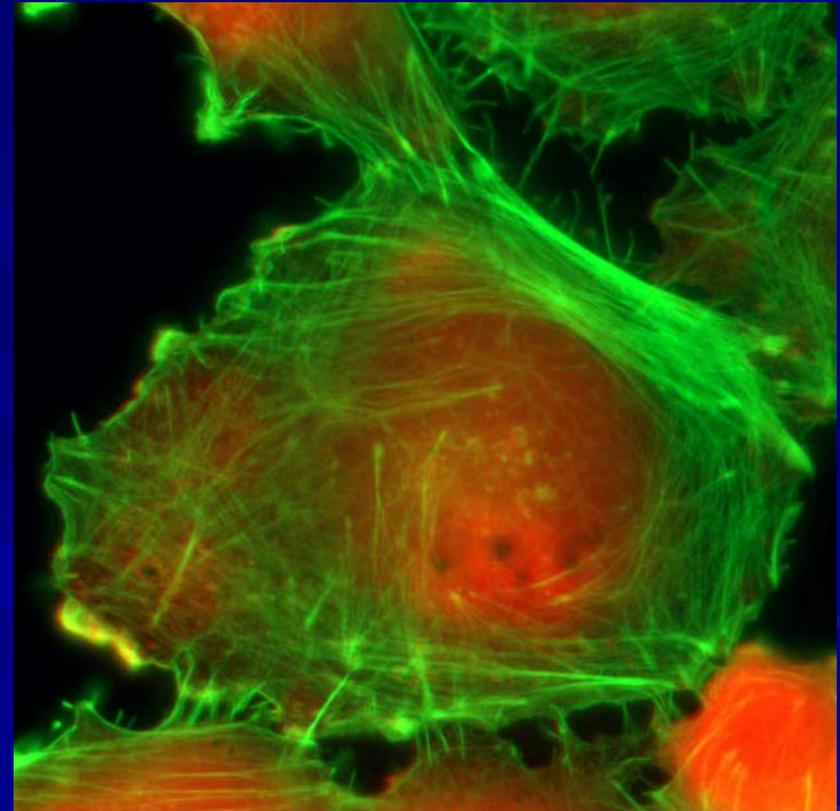
- Donne aux pièces anatomiques fixées la consistance ferme, nécessaire a la coupe.
- Imprégnation des tissus par une substance qui durcit secondairement (paraffine, gélatine, résines, matières plastiques) ; nécessite une déshydratation préalable
- Fixation et inclusion peuvent être remplacées par la congélation (examen extemporanés, étude de structures qui peuvent être altérées par la fixation)

5 - MICROSCOPIE PHOTONIQUE : Immunofluorescence



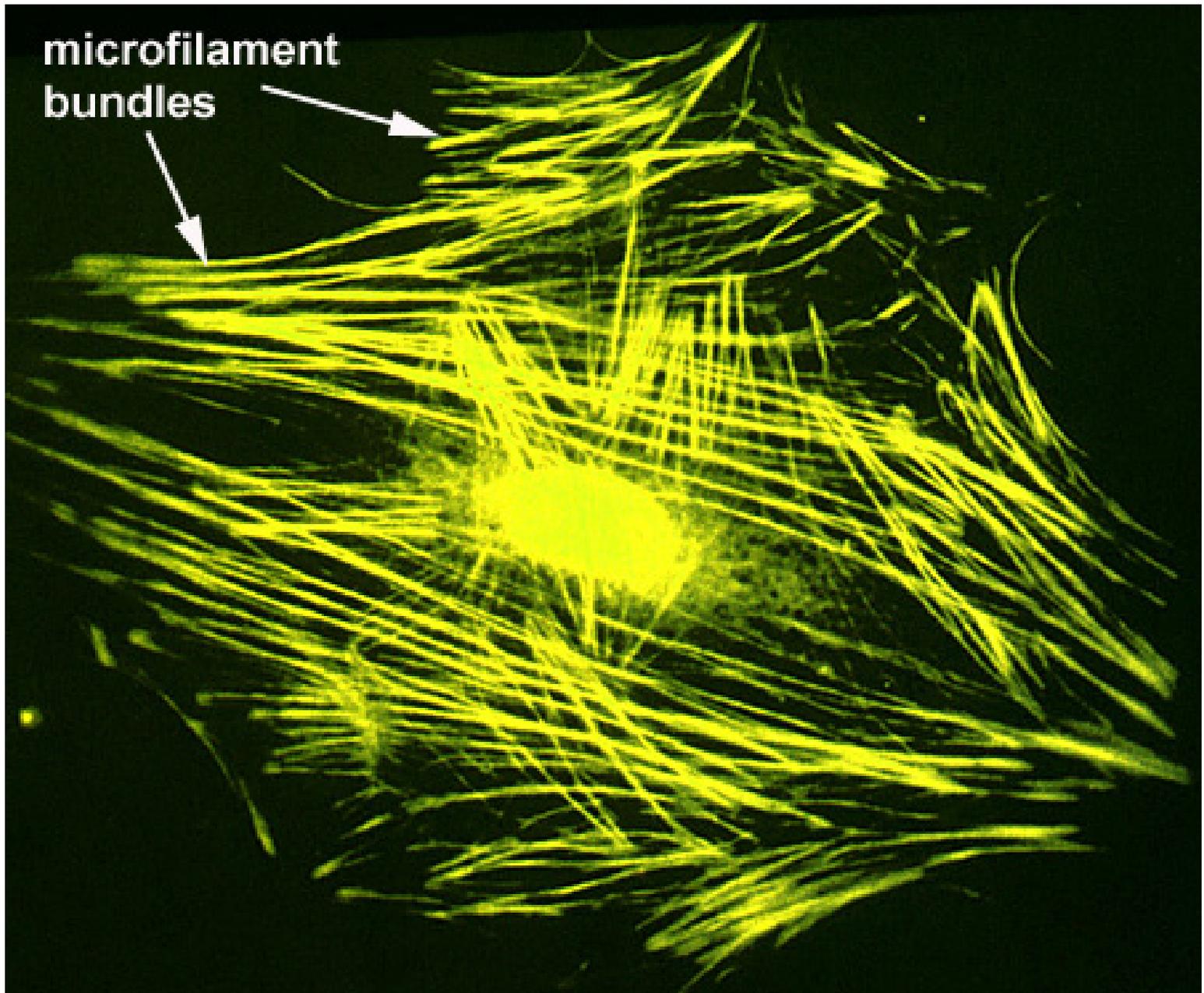
Actine en rouge. Zyxine en vert

Disposition sous la forme de
FIBRES de TENSION
(cellule immobile)



Actine en vert. Noyau en rouge

Réseau plus diffus :
Cellule faiblement mobile



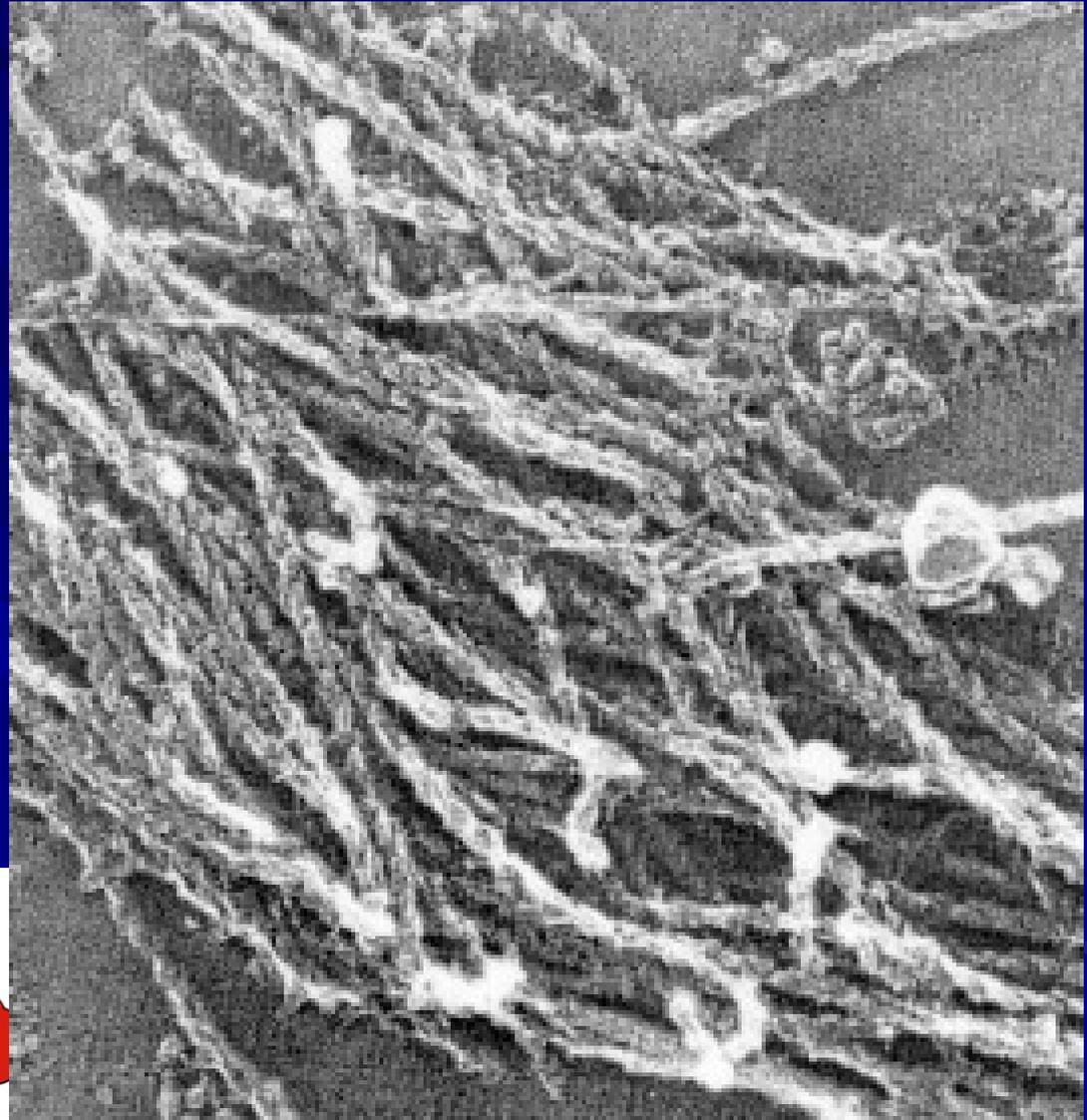
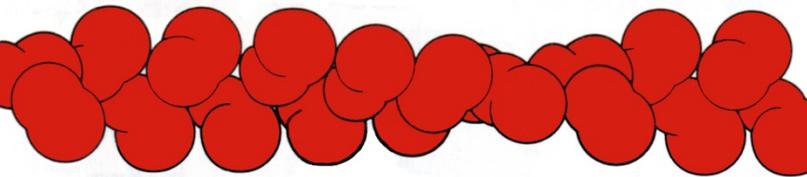
Fibres de tension dans une cellule immobile

6 - MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE :

Filament *apparemment*
bicaténaire
torsadé



En fait :
monocaténaire



PEAU et KÉRATINOCYTES

(épithélium malpighien kératinisé)

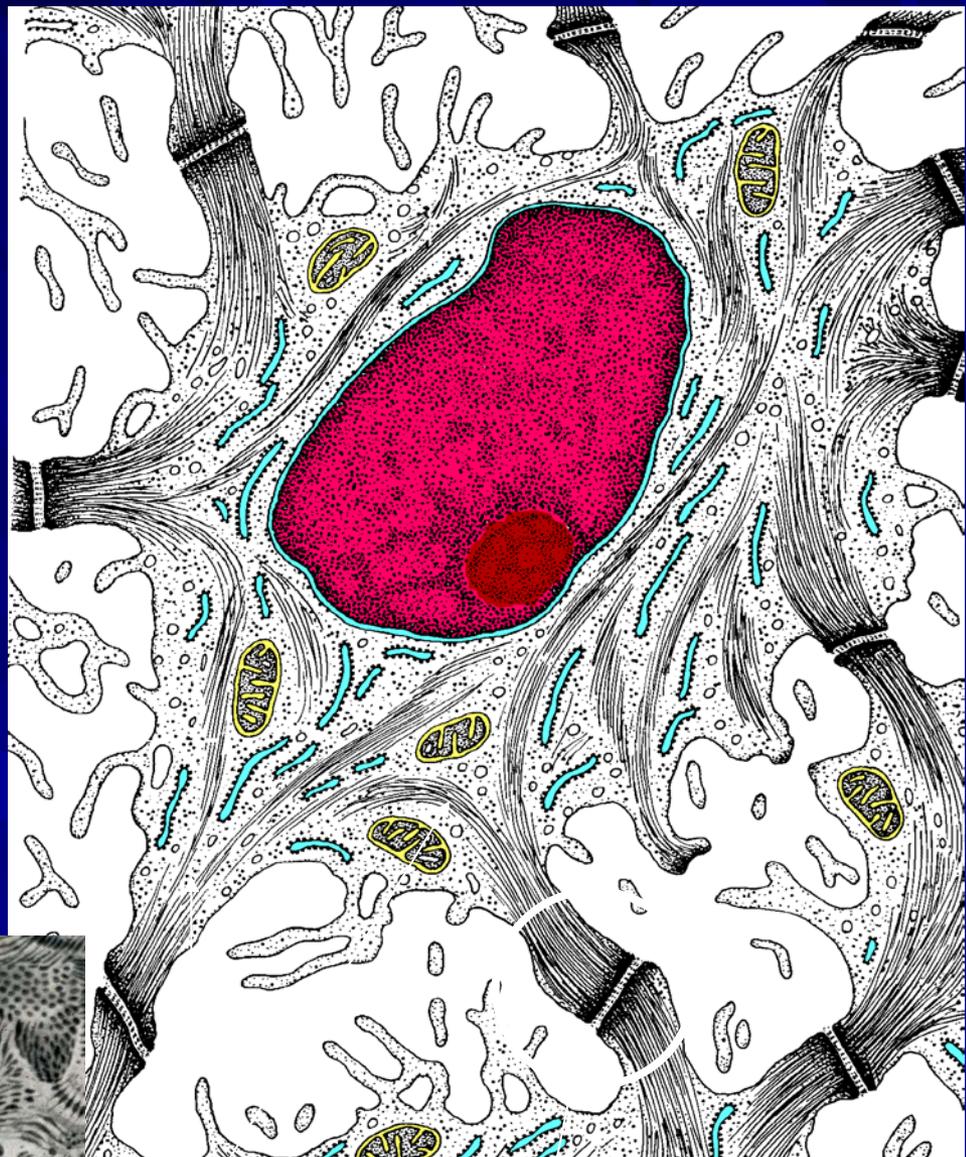
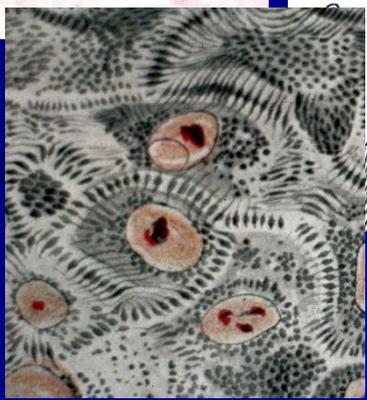
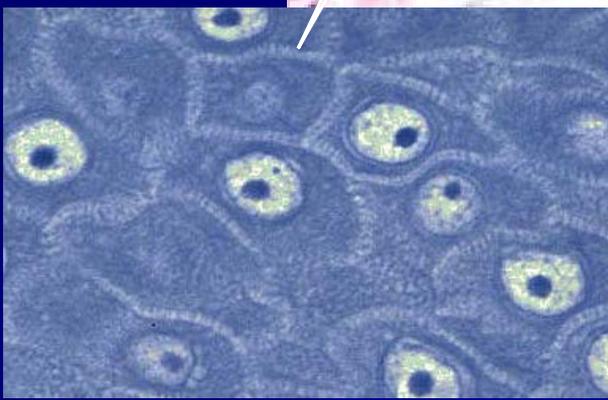
Couche desquamante

Couche cornée

Couche granuleuse

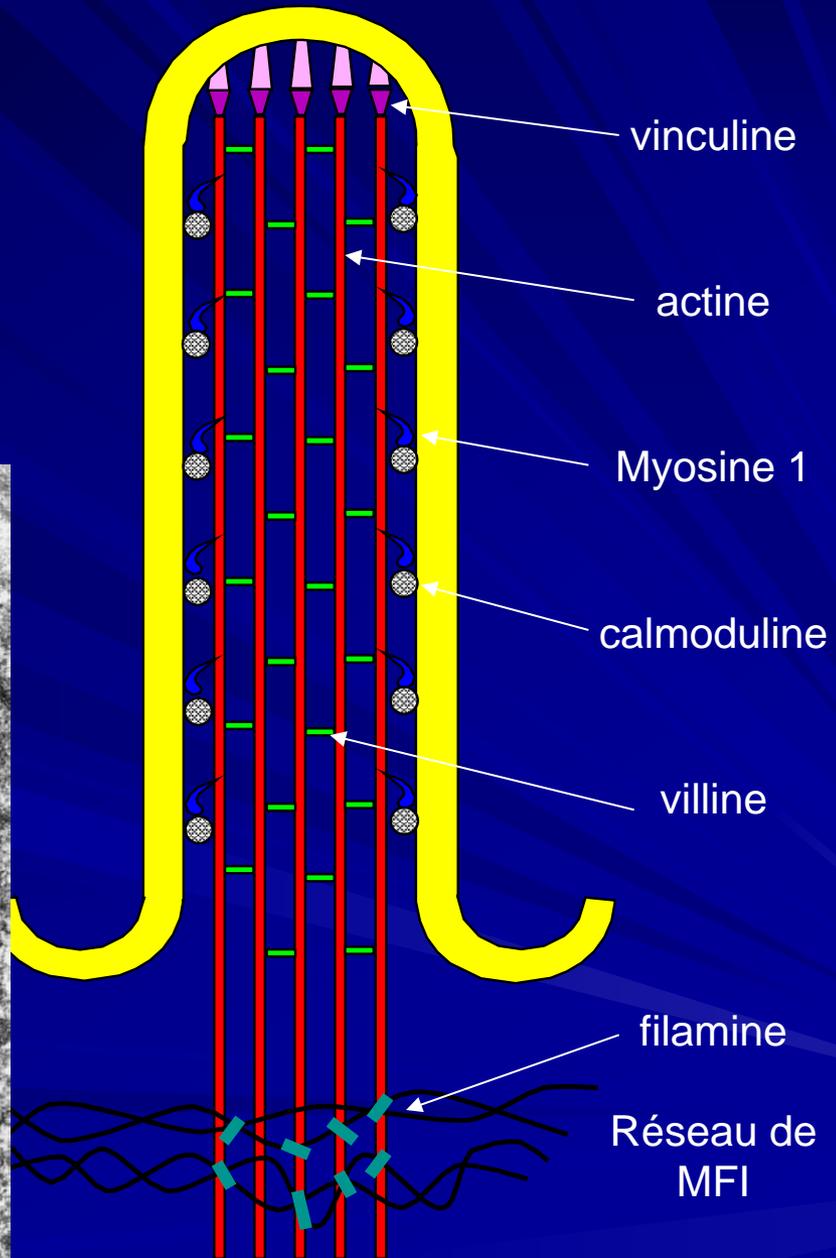
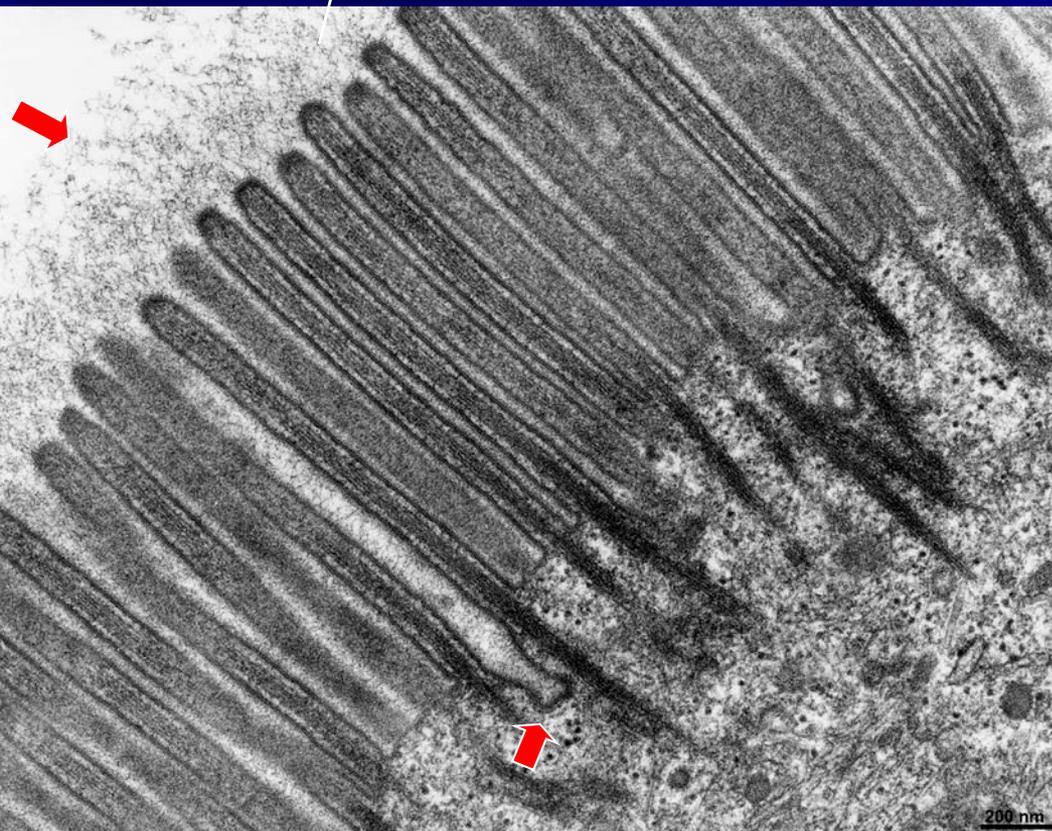
Stratum spinosum

Couche germinative



Tonofilaments

Desmosome



Préparations tissulaires histologiques

- **Étalement des cellules sur une lame de verre :**
 - cellules en suspension dans un liquide organique ou obtenues par grattage, ponction
 - étalement entre lame et lamelle, par apposition, après concentration par centrifugation....
- **Fixation :**
 - par séchage à l'air (agitation énergique)
 - par fixateurs chimiques (formol, méthanol, acétone...)
- **Coloration :**
 - colorants anioniques, cationiques
 - coloration de May-Grundwald-Giesma
 - coloration de Papanicolaou
- **Montage des lames :**

Préparations tissulaires histologiques

■ Coupe :

- microtome : tranches de 2 à 5 μm d'épaisseur
- ultramicrotome : tranches de 0,002 à 0,1 μm
- cryotome : dépôt de la tranche de tissu sur une lame de verre

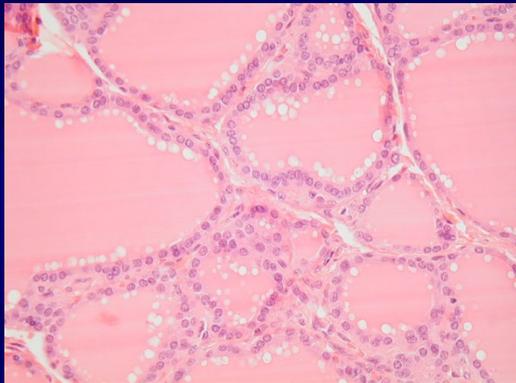
■ Coloration :

- colorants anioniques, cationiques (éosines, orange G ; bleu de toluidine, hématoxyline)
- mordants (alumine, sels de fer) (hématéine.....)
- **imprégnation métallique**

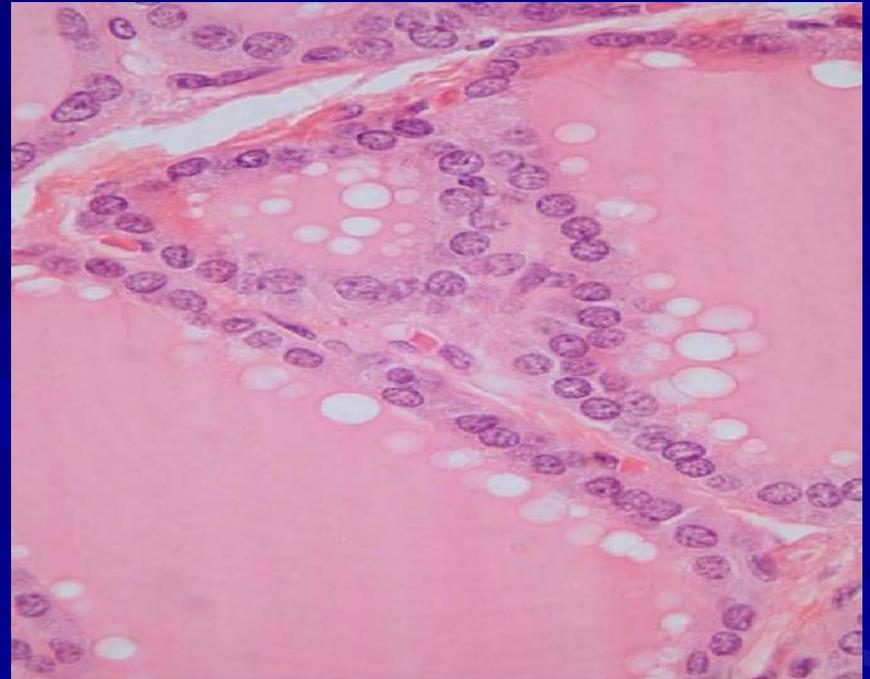
■ Montage des coupes

Thyroïde

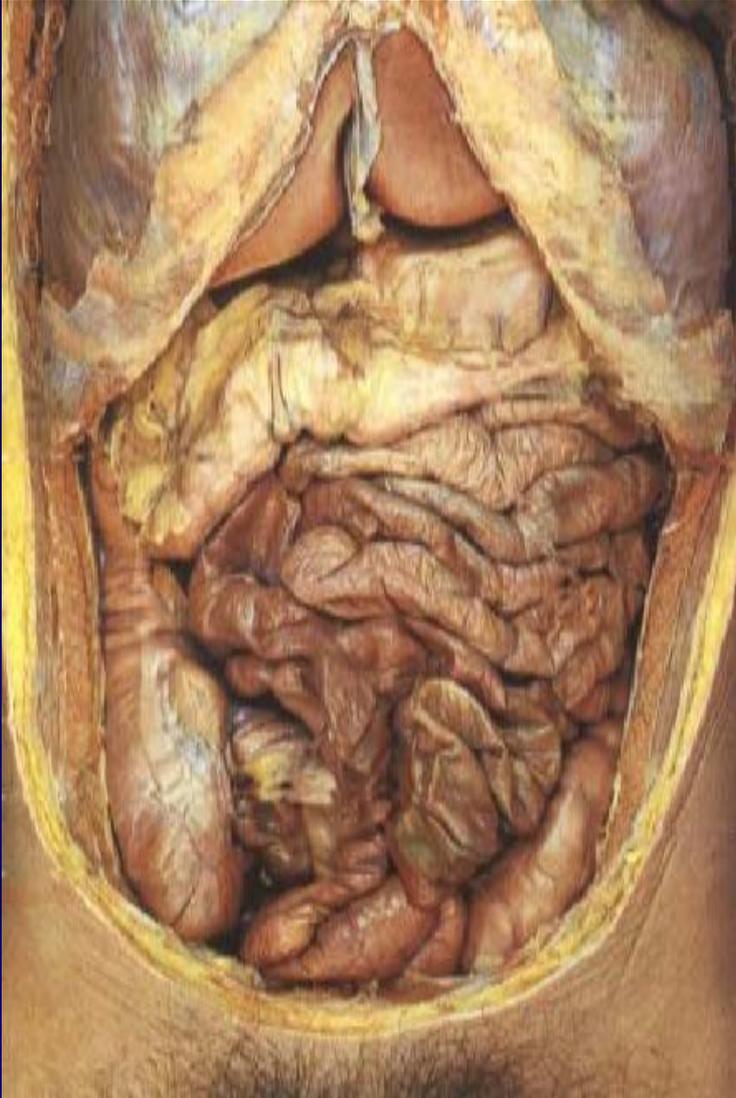
■ Coupe tissulaire



■ Etallement cellulaire



Anatomie



Dissection

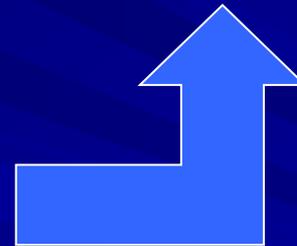
Observation à différents niveaux

- Macroscopie (Anatomie)
- Microscopie optique
- Microscopie électronique
- Biologie moléculaire



Compréhension du fonctionnement

Compréhension des structures



Considérer la fonction pour comprendre la structure

- Structures anatomiques
- Structures histologiques
 - Architecturales
 - Cellulaires

Fonction d'un organe:

- Assurée par un assemblage de cellules spécialisées
- Arrangement spatial caractéristique: architecture
- Cellules épithéliales
 - Cellules mésenchymateuses:
 - . Communes
 - . Spécialisés
- Cellules nerveuses

Cellules adoptent des caractères morphologiques
microscopiques et moléculaires relatif à la fonction à assurer



Différenciation cellulaire

L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE : INTRODUCTION, DEFINITIONS ET METHODES

Histologie
Faculté de Sciences de Rabat
Pr. M. Naciri

2010

I. DEFINITION ET PLACE DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE DANS LA MEDECINE

DÉFINITION DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

- en anglais « Pathology »
- spécialité médicale basée sur la morphologie
- repose sur la mise en évidence des lésions
- Les lésions sont étudiées par différents moyens :
 - **macroscopiques** (œil nu),
 - **histologiques** (microscope optique),
 - **ultrastructurales** (microscope électronique)
 - **biologie moléculaire in situ.**

DEMARCHE ANATOMOPATHOLOGIQUE

- **La lésion :**
- – **lésion élémentaire** : unité lésionnelle correspondant à l'altération morphologique d'une structure considérée isolément (par ex : vaisseaux).
- – Les **lésions élémentaires** s'organisent en un **ensemble lésionnel** qui permet de formuler un diagnostic.
- **Les quatre grandes familles lésionnelles** sont:
 - les **malformations**,
 - les phénomènes **immunitaires et inflammatoires**,
 - les troubles **circulatoires**
 - les **tumeurs**.

APPLICATIONS DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

- 1 – Le diagnostic de maladie (et les indications thérapeutiques)**
 - 2 – L'évaluation du pronostic et de l'évolutivité des lésions/maladies**
 - 3 – La Vérification du diagnostic clinique par l'autopsie**
 - 4 – La Recherche anatomo-clinique et appliquée**
 - 5 – Une meilleure connaissance des mécanismes physio-pathologiques et causes des maladies**
- Le diagnostic requiert des informations cliniques et biologiques pour l'interprétation des lésions**

LES GRANDS CHAPITRES DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

- **L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE GÉNÉRALE :**

- – grands processus pathologiques

- • **L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE SPECIALE :**

- – Partie de l'anatomie pathologique qui traite des lésions propres à chaque tissu ou organe.

METHODES ET TECHNIQUES DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

- **A. LES PRÉLÈVEMENTS ÉTUDIÉS PAR L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE.**

- **1. La biopsie**

- Prélèvement d'un échantillon tissulaire sur un être vivant en vue d'un examen anatomo-pathologique
- **Biopsie** sous contrôle de la vue
- **Ponction-biopsie:**
- Ponction biopsie guidée par l'imagerie (échographie, TDM)
- **Biopsie-exérèse** : **double objectif** de traitement et de diagnostic par ex. :
 - petite tumeur cutanée.
 - **Curetage biopsique:** Matériel obtenu par curetage d'une cavité naturelle (cavités sinusienne, utérine).

METHODES ET TECHNIQUES DE L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE

- ***A. LES PRÉLÈVEMENTS ÉTUDIÉS PAR L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE.***

2. Pièce opératoire

- **étape macroscopique +++** : préciser les lésions et sélectionner des échantillons tissulaires en vue de l'examen **histologique.**

La cytologie

- **Étude de cellules isolées de leur contexte tissulaire.**
- Ce matériel cytologique provient de :
 - **ponction** d'un épanchement,
 - **recueil** (urines),
 - **raclage** : (frottis du col utérin)
 - **brossage** (bronches, oesophage),
 - **aspiration** dirigée sous endoscopie (petites bronches),
 - **apposition** (empreintes ganglionnaires)
 - **lavage** : vésical, broncho-alvéolaire (exploration de la partie distale du poumon).
 - **cyto-ponction**

- Techniques cytologiques :
 - apposition ou étalement
 - cytocentrifugation : projection d'un spot sur une lame
 - cytologie en couche mince («mono-couche»)
- BUTS DE LA CYTOLOGIE :
 - **Dépistage**
 - **Cyto-diagnostic** couplé ou non à l'histologie (ponction-biopsie).

Visualisation *in situ* de substances chimiques

■ Autoradiographie

■ Cyto-histochimie

- réaction chimique +/- spécifique dont le résultat est appréciable à l'observation microscopique sous forme d'un précipité coloré
- PAS (glycogène) ; noir Soudan (graisses) ; bleu de Prusse

■ Immuno-cyto-histochimie (immunofluorescence)

■ Hybridation *in situ*

Visualisation in situ de substances chimiques

■ Immuno-cyto-histochimie (Immunofluorescence)

- mettre en évidence et localiser à l'échelon tissulaire, cellulaire ou sub-cellulaire toutes sortes d'antigènes, révélés par leurs anticorps spécifiques

- le complexe antigène-anticorps est révèlé par l'adjonction de molécules enzymatiques sur lesquelles on fait agir leur substrat spécifique (microscopie en lumière blanche) ou de fluorochromes (microscopie en lumière ultra violette) ou de corps opaques aux électrons (microscopie électronique)

Reaction immunocytochimique

- L'immunohistochimie (ou IHC) est une technique qui permet de mettre en évidence des sites antigéniques sur des cellules grâce à des anticorps spécifiques et à une mise en évidence utilisant un procédé colorimétrique (on utilise généralement une enzyme : la peroxydase).

Syn. : **immunocytochimie**. Même type de réaction sur des cellules

Principe d'une réaction immunohistochimique

- Une immunoréaction est composée de trois éléments principaux :
 1. la préparation (tissu, cellule, organite subcellulaire, virus ...) contenant l'antigène à étudier ;
 2. un anticorps dirigé contre l'antigène recherché ;
 3. le système révélateur qui permet de visualiser l'immunoréaction.

La qualité des résultats dépend de l'utilisation judicieuse de ces trois éléments.

- a/ Les termes :
 - immunohistologie et immunohistochimie (immunoréactions sur tissus)
 - immunocytologie et immunocytochimie (immunoréactions sur cellules)ont des significations très voisines et sont souvent employés indifféremment l'un pour l'autre.

Cependant, aujourd'hui, immunocytologie est plutôt employé pour la cytométrie en flux et immunohistologie plutôt réservé aux immunomarquages sur tissus et coupes de tissus.

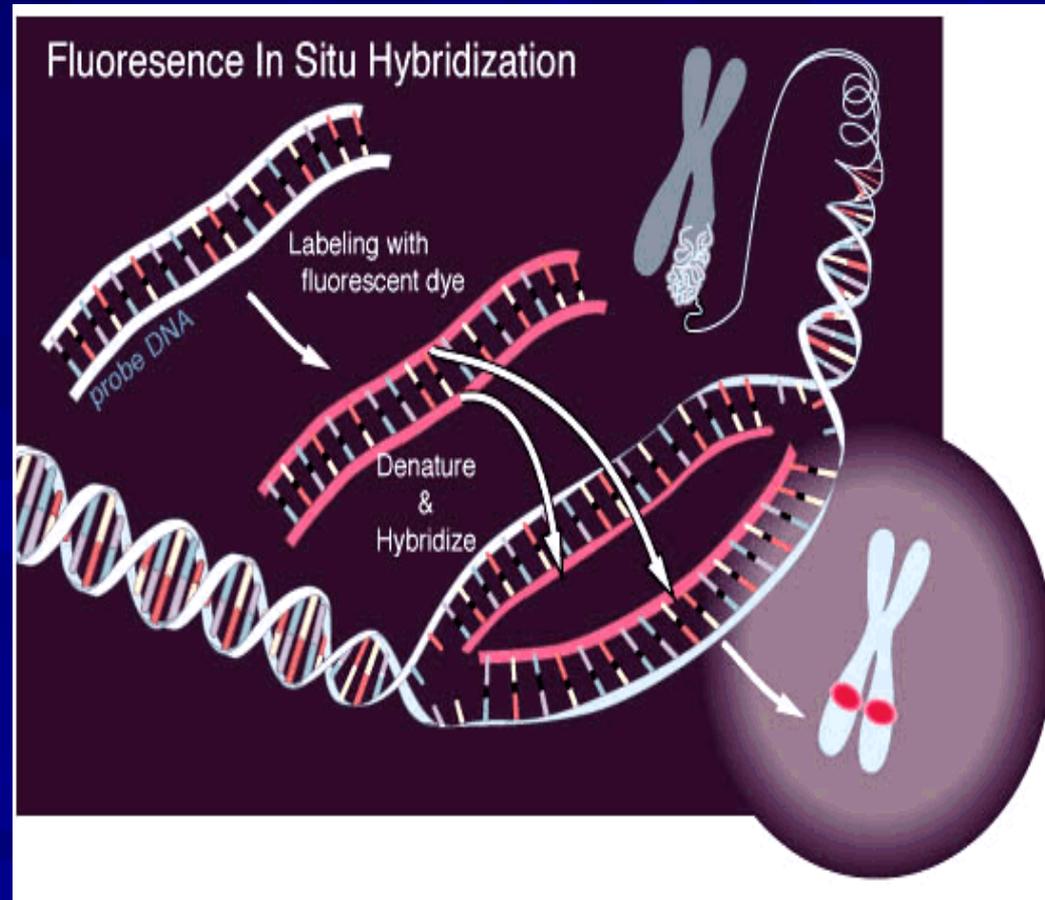
- b/ L'anticorps dirigé contre l'antigène recherché est souvent appelé anticorps primaire : une immunoréaction est en effet la plupart du temps réalisée au moyen d'une cascade d'anticorps (anticorps primaire, secondaire, éventuellement tertiaire...), voir par exemple page 93 et suivantes.

Visualisation *in situ* de substances chimiques

■ Hybridation *in situ* (FISH)

La technique du FISH (hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes - "*Fluorescence In Situ Hybridization*") sert à marquer des séquences d'un gène ou d'une partie du génome par appariement d'une sonde nucléotidique avec sa séquence homologue sur le chromosome.

Elle est utilisée pour déceler les anomalies chromosomiques (recombinaison chromosomique) et faire de la cartographie des gènes.



Visualisation *in situ* de substances chimiques

■ Hybridation *in situ* (FISH)

mettre en évidence et localiser à l'échelon tissulaire ou cellulaire des acides nucléiques (ARN ou fragments d'ADN), révélés par leurs sondes moléculaires complémentaires.

le complexe réalisé entre la sonde et la séquence complémentaire que l'on cherche à mettre en évidence est révélé par l'adjonction de molécules enzymatiques sur lesquelles on fait agir leur substrat spécifique (microscopie en lumière blanche) ou de fluorochromes (microscopie en lumière ultra violette)

Quantification a l'échelon cellulaire ou tissulaire

■ Cytométrie par analyses d'images microscopiques

Le microscope devient un instrument de mesure

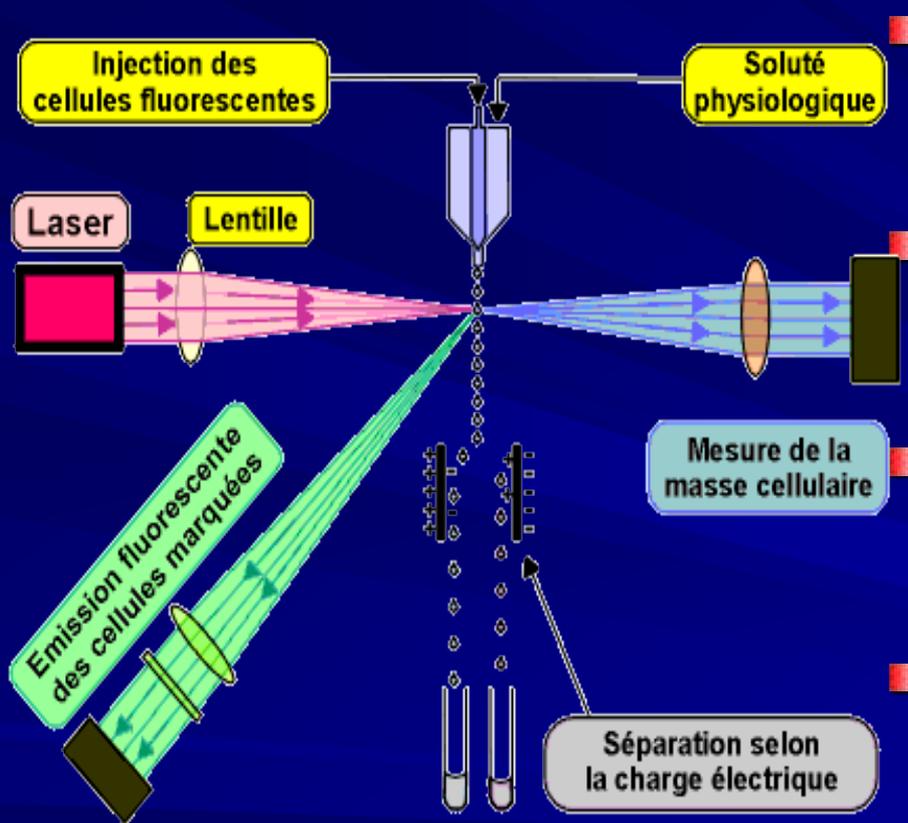
Les cellules sont caractérisées par un ensemble de paramètres dont on peut mesurer les valeurs et qui représentent la morphologie, la couleur, la densitométrie...

Applications : dosage in situ (ADN, récepteurs, antigènes) ; identification des cellules (évolution possible vers l'automatisation de la lecture cytologique)

■ Cytométrie en flux

les cellules en suspension sont colorées par des fluorochromes, illuminées par un faisceau laser ; l'analyse des interactions entre cellules et faisceau permet de les caractériser et de les compter ; on mesure également la quantité de substance fluorescente, ce qui permet le dosage in situ des molécules sur lesquelles elles se sont fixées.

Cytométrie en flux



- Les cellules sont dispersées dans du sérum physiologique et passent à travers un faisceau de lumière laser.
- La diminution de l'intensité du faisceau direct permet de mesurer la masse cellulaire ou la masse de DNA.
- Les cellules qui émettent de la fluorescence sont reconnues par une cellule photoélectrique particulière.
- Enfin, on peut éventuellement séparer les cellules selon leur charge électrique : séparateur de cellules

Description sommaire d'un appareillage de cytométrie de flux.

Conclusions

- Evolution des techniques de la microscopie
 - taille des objets visualisables
 - visualisation en trois dimensions

- Interprétation des images
 - reconnaître des formes, des contrastes, des couleurs, des « patrons », pour donner du sens, une signification, à ce qui est visualisé
 - mais les images que l'on examine sont artificielles, créées par la technique et dépendant d'elle, éventuellement déformées par nos moyens optiques d'observation et le plus souvent ce que l'on observe est un monde imaginaire à 2 dimensions qu'il faut transposer pour imaginer le monde réel