Les étapes de préparation en amont de l'imprégnation en paraffine des échantillons sont critiques. Ces étapes, si mal réalisées, peuvent avoir un impact sur la qualité des coupes, des colorations, des immunomarquages et par conséquent sur l'analyse anatomopathologique et l'interprétation des résultats. Il est donc important de respecter ses règles précisées dans ce document.

I. Principes

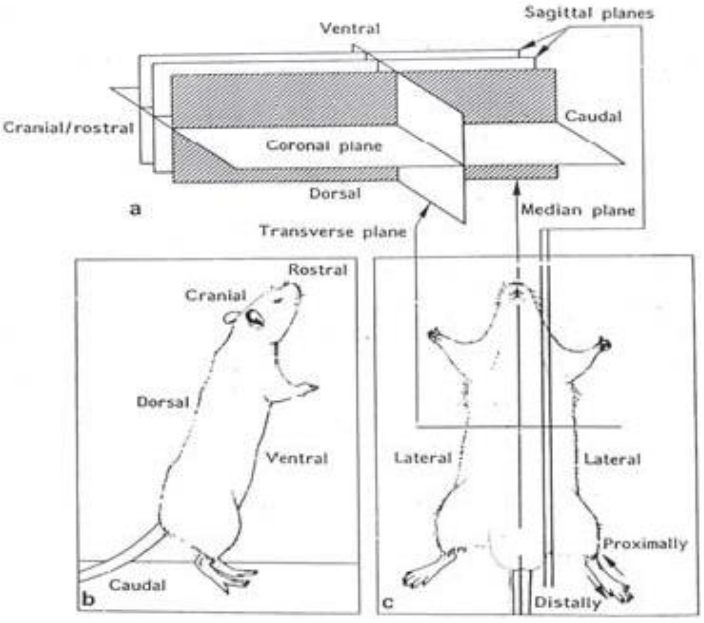
I.1. Prélèvements des échantillons

L'autopsie constitue la 1ère étape cruciale de toute étude histologique et histo-pathologique. Pour chaque projet, un protocole d'autopsie doit être établi et respecté afin de permettre les comparaisons inter-animaux et inter-groupes. Il est important de consigner, au cours de l'autopsie, un maximum d'informations. En effet, elles peuvent être très utiles pour l'analyse anatomopathologique ainsi que pour vos recherches ultérieures de corrélation d'expression de facteurs par exemple.
Il est également important de fixer très rapidement les organes car il y a des risques d'anomalies post-mortem (autolyse). Il est donc préférable de commencer par le prélèvement des organes cibles favoris. La dissection doit être très minutieuse afin d'éviter des artéfacts (coup de pince, ciseaux…).
En fonction de la question biologique posée, il est conseillé de suivre la procédure RITA (« Registry of Industrial Toxicology Animal-data ») pour prélever et recouper les organes. Cette procédure a été mise en place pour permettre la standardisation et la reproductibilité des données histologiques dans des études de toxicité. Elle favorise ainsi les comparaisons intra et inter-études.

Les principaux plans de recoupes et coupes sont les suivants :

- Plan transverse : plan perpendiculaire à l'axe le plus long de l'organe ou de la partie de l'organe ou du corps de l'animal.
- Plan sagittal : plan orienté selon l'axe le plus long de l'organe ou du corps et parallèle à l'axe dorsoventral.
- Plan cortical : plan orienté selon l'axe le plus long de l'organe et perpendiculaire à l'axe dorsoventral.

Schéma des définitions spatiales



Extrait de « Van Dongen JJ et al., Manual of Microsurgery on the Laboratory Rat. Part I. General information and Experimental techniques, 1990, p.54. (Elsevier Science, The Netherlands)

I.2. La Fixation

La fixation est destinée à immobiliser les structures cellulaires et tissulaires, dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. Un bon fixateur doit :

- avoir une pénétration rapide et homogène,
- ne donner aucune rétraction des tissus,
- révéler les organites intra-cellulaires et les structures latentes,
- éviter le déplacement des constituants solubles, tels que le glycogène,
- ménager l'activité de certaines enzyme,
- permettre en principe de retrouver les éléments visibles sur les colorations vitales.

Pour résumer, la fixation ne doit pas créer d'artéfact ainsi qu'assurer une conservation et une image fidèle du tissu et des cellules.

I.3. La déshydratation/imprégnation/inclusion

Cette étape a pour objectif de remplacer l'eau contenu dans les tissus par de la paraffine. La « paraffine », au sens histologique du terme, est un mélange d'hydrocarbures saturés et quelquefois de cire. Son intérêt est d'être chimiquement neutre, soluble dans de nombreux solvants et facile à couper au rasoir.

La paraffine n'étant pas miscible à l'eau, les pièces fixées devront être déshydratées dans des bains d'alcool à degrés croissants puis dans du xylène et pour finir dans de la paraffine chauffée à son point de fusion (+ 1 ou 2°C). La durée du cycle de déshydratation dépend de la nature des échantillons et de leur taille. Pour plus de détails sur le protocole exact de déshydratation, se renseigner auprès du plateau RHEM_IRCM.

Lorsque l'imprégnation à chaud est terminée, les pièces sont mises en bloc où elles peuvent être gardées indéfiniment. C'est au cours de cette étape que l'on place l'organe selon l'orientation désirée.

II. Protocoles

Au sein du plateau RHEM_IRCM, nous prenons en charge UNIQUEMENT les échantillons fixés et, si besoin, décalcifiés et placés dans un récipient fermé rempli d'éthanol 70%.

Les échantillons doivent être placés dans leur cassette avec leur identifiant unique généré par le logiciel 100lims.

- <u>À préparer avant tout prélèvement</u>

Le fixateur : son volume doit correspondre à 10 fois celui de l'échantillon.

Fixateurs les plus couramment utilisés :

- Formaldéhyde 36% dilué extemporanément à 4% dans du PBS 1X. Se conserve à température ambiante pour éviter tout précipitât.
- Formaldéhyde 4% déjà tamponnée. Se conserve à température ambiante.
- Formol 10% tamponné. Se conserve à température ambiante.

- <u>Pendant ou avant la fixation en fonction des pratiques</u>

1) Créer et imprimer sa commande 100lims
2) Graver les cassettes selon la numérotation attribuée par le logiciel 100lims.

ATTENTION **:** En cas d'écriture manuelle, utiliser un <u>crayon papier ou un marqueur insoluble</u> au solvant (ex : tube checker pen de chez Microm).

- Lors du prélèvement

1) Prélever rapidement les organes. La bonne conservation d'un tissu n'excède pas 10 min. Travailler sans lumière directe pour éviter le dessèchement du tissu.
2) Plonger immédiatement les organes dans le fixateur (Volume 10 fois supérieur à celui de l'échantillon) en veillant à ce qu'il n'adhère pas au fond ni aux parois du récipient (agitation possible). Les rincer dans du PBS, s'ils sont recouverts de sang car le sang ralentit la fixation.

Pour certains organes comme le pancréas et la peau ou des petits échantillons, les placer directement dans la cassette entre 1 ou 2 mousses.

3) Placer les échantillons en cassette : de préférence un échantillon par cassette, en particulier pour les gros tissus. Sinon au maximum 4 échantillons. Laisser incuber dans le fixateur à RT, 24 à 48h MAXIMUM suivant la taille et la densité du prélèvement.
4) 2h voire 4h après la fixation, faites une recoupe des organes selon l'orientation souhaitée pour la coupe et afin que les échantillons ne dépassent pas 3-4mm d'épaisseur (cf RITA, conseils auprès de l'équipe du plateau).

- Après fixation

1) Pour tout tissus : Après 24h ou 48h, sortir l'organe du fixateur et le recouper si nécessaire selon l'orientation souhaitée pour la coupe. Travailler sous hotte. Eliminer le fixateur avec les déchets chimiques.
2) Faire 2 lavages au PBS (5min chaque).
3) Puis placer les cassettes dans un récipient fermé contenant de l'EtOH70°, toujours 10 fois le volume des prélèvements, 1h minimum. Les échantillons peuvent se conserver plusieurs jours en EtOH70° à 4°C.
4) Si tissus osseux :
   Décalcification dans EDTA 10% +/- PFA 1% dilué dans du PBS (dans un volume au moins 10x supérieur à celui de l'objet) à RT sous agitation. Le temps de décalcification est fonction de l'objet. La solution décalcifiante est à changer tous les 2/3 jours. Le temps de décalcification est fonction de l'objet : compter 21 jours pour un genou de souris.

   Décalcification en solution TBD-2 (Epredia™ Shandon™ TBD-2™ Decalcifier Products | Fisher Scientific, solution adaptée aux colorations et aux immunomarquages) dans un volume au moins 10x supérieur à celui de l'objet à RT sous agitation. Le temps de décalcification est fonction de l'objet : compter 2 jours pour un genou de souris et une dizaine de jours pour une vertèbre de queue de rat. Cette condition a l'intérêt d'être plus rapide que la précédente et donne de très bons résultats en IHC.

III. Historiques des versions

Version	Rédacteur	Date	Modification
01	Nelly Pirot	13/05/2022	Version initiale
02			
03			