



Service HISTOLOGIE Recommandations de préparation des échantillons

Code du document:

FI

Date d'application :

[27/07/2022]

Version:

[001]

Page 1/2

Préparation des échantillons fixés chimiquement

Les échantillons prélevés doivent être immédiatement plongés dans un fixateur, dans un volume de 10 fois le volume de l'échantillon, en veillant à ce que ce dernier n'adhère pas au fond ou aux parois du contenant.

Le fixateur le plus couramment utilisé est le **formol 10% = paraformaldéhyde 4%**

Information importante : formol ? Formaldéhyde ? paraformaldéhyde ?

Formaldéhyde.

Il s'agit de l'aldéhyde le plus simple. Le formaldéhyde « 100% » est un gaz! (boiling point : -21°C).

Paraformaldéhyde: $HO(CH_2O)_nH$

Le paraformaldéhyde (n=6-100) (polymère solide) est préparé extemporanément car il est moins stable que le formaldéhyde. Paraformaldéhyde 4%, soit 4 gr / 100 ml

La préparation est extemporanée, elle se dégrade en effet au bout de 2-3 semaines, tandis que le formol reste stable.

On solubilise le paraformaldéhyde en poudre dans un tampon phosphate (un mélange aqueux de deux sels de phosphate pour avoir un pH neutre)

Formol: 40% formaldéhyde (w/v) in H₂O, soit 40 gr / 100 ml. Le formaldéhyde est donc appelé formol lorsqu'il est en solution aqueuse. Il s'agit ici du formol commercial. Il est en solution aqueuse, non tamponnée, ce qui serait meilleur pour réaliser des coupes histologiques.

La concentration classique de formaldéhyde utilisée pour la fixation d'un tissu biologique est de 1/10e de la solution pure de formol commercial soit une concentration de 4% de l'agent fixant (formaldéhyde).

La fixation des échantillons de moyenne à grande taille dure entre 24h et 48h maximum à température ambiante ou 4°C en cas de fortes chaleurs.

Au bout de 24h de fixation, les échantillons sont plongés dans l'éthanol 70%, toujours dans un volume 10 fois plus important que le volume de l'échantillon, et ce jusqu'à plusieurs jours en attendant la déshydratation dans l'automate, avant l'inclusion en paraffine.

Pour les échantillons de petites tailles (biopsies, sphéroïdes), contacter le personnel de la plateforme pour discuter des temps de fixation selon l'échantillon.

Préparation des échantillons congelés

La plateforme ne réalise pas la congélation des échantillons.

La congélation des échantillons doit s'effectuer selon un protocole particulier :

- Déposer le prélèvement dans le moule plastique avec l'orientation souhaitée vers le bas.
- Replier l'extrémité plastique du moule pour mieux le saisir.
- Enrober de milieu cryogénique le prélèvement
- Faire refroidir un béccher d'isopentane dans un fond d'azote liquide dans une boîte en polystyrène. La température idéale de l'isopentane pour la congélation des tissus est atteinte (entre -80 et -100°C) lorsqu'il se forme une couronne blanche au fond du béccher d'isopentane qui ne disparaît pas à l'agitation.

	Service HISTOLOGIE Recommandations de préparation des échantillons	Code du document: FI
		Date d'application : [27/07/2022]
		Version: [001]
		Page 2/2

- Une fois l'isopentane refroidi, plonger environ 10 secondes le moule en le maintenant à l'horizontale à l'aide d'une pince.
- Conserver dans la carboglace si besoin en attendant la congélation à -80°C
- Stocker au congélateur -80°C le prélèvement

Cas particulier du **cerveau** (peut s'appliquer au **poumon**)

- Fixation dans le formol au moins 24H
- Puis sucrose 30% pendant 1 à 2 jours (déshydratation permettant une meilleure cryoconservation du tissu = meilleure morphologie des cellules évitant la formation des cristaux lors de la congélation).
- Congélation classique dans l'isopentane, enrobé d'OCT

La plateforme dispose de place pour y déposer les échantillons congelés apportés par les demandeurs en cas de coupes au cryostat réalisées par le personnel de la plateforme. Les demandeurs devront impérativement récupérer leurs échantillons une fois la demande réalisée.