

Living up to Life



Blocs difficiles et retraitement

Que faire si vous ne parvenez pas
à couper vos blocs tissulaires

Geoffrey O Rolls

Scientia

Leica Microsystems' Education Series

Auteur

Geoffrey O Rolls BAppSc, FAIMS
Consultant en histologie
Leica Microsystems
Ancien conférencier principal en histopathologie
Département de biologie médicale
Université RMIT
Melbourne, Australie

Contributions

Fiona Tarbet

Kerrie Scott-Dowell

Alison Hopkins

Neville Farmer

Grant Taggart

Dans tous les laboratoires d'histopathologie, il y a de temps à autre, des blocs de paraffine qu'il est plus difficile, voire même impossible, à couper. Dans certains cas, cela peut provenir de la nature même d'un type d'échantillon en particulier et des éléments tissulaires qu'il renferme. Même s'ils sont correctement fixés et préparés, ces éléments peuvent poser problème. Les échantillons de fibrome, de thyroïde, de peau fortement kératinisée, d'ongle et de caillots sanguins sont des exemples d'échantillons complexes pouvant engendrer des blocs problématiques. Il se peut que certains blocs problématiques résultent d'une fixation inadéquate, d'un traitement inapproprié ou incorrect, voire même d'un sur-traitement, ou d'une défaillance de l'instrument pendant le traitement. Dans ce genre de situations, ce sont des blocs problématiques isolés ou, dans le pire des cas, le lot complet d'échantillons qui sont affectés.

Généralement, quand un problème survient avec des blocs tissulaires, une première analyse est exécutée afin de découvrir d'où vient le problème, puis l'on tente de réaliser les coupes par tous les moyens possibles. La partie 1 du présent ouvrage répertorie les questions pouvant vous orienter afin de découvrir l'origine du problème. Afin de vous soutenir encore davantage, la partie 2 intègre les descriptions des blocs problématiques liées aux causes possibles et fournit, en outre, quelques exemples de blocs difficiles pour lesquels l'origine du problème était connue. Ceci devrait vous permettre de vous orienter dans la découverte du problème lié à votre bloc. La partie 3 (solutions 1 à 6) présente quelques suggestions permettant de couper des blocs difficiles sans qu'il soit nécessaire de procéder à un retraitement.

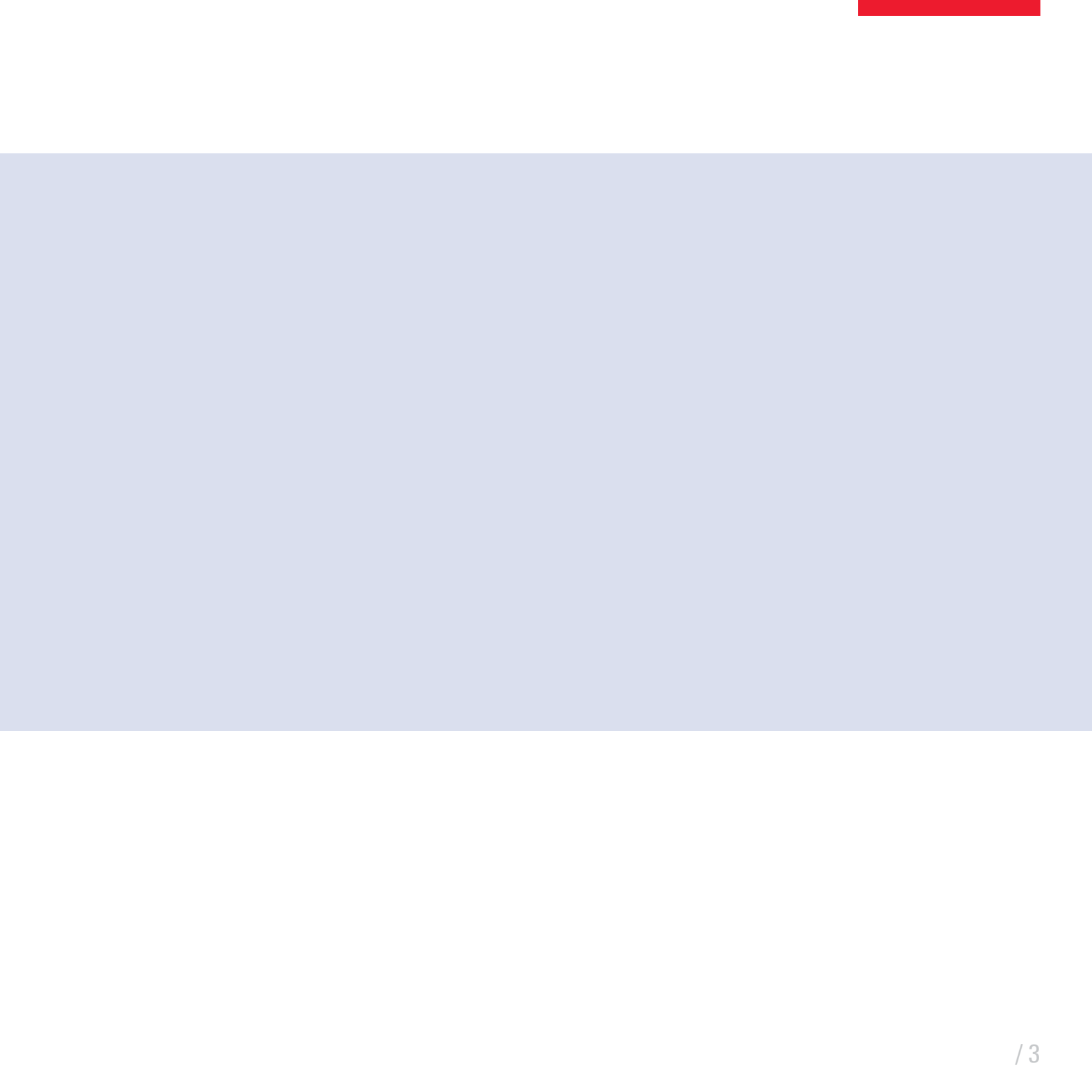
Il peut être nécessaire d'envisager un retraitement quand il n'est pas possible de procéder à des coupes ou quand plusieurs blocs sont affectés. Les méthodes de retraitement sont décrites et évaluées dans la partie 3 (solutions 7 à 10). Quand un retraitement est envisagé, il est essentiel de procéder à une recherche approfondie de l'origine du problème auparavant, car le retraitement ne convient pas à toutes les situations (par ex. quand le tissu est sur-traité). Il est également important de s'assurer, autant que possible, que le problème n'est pas récurrent.

La partie 4 traite plus en détail des effets et des causes d'un traitement médiocre et aborde le thème du compromis lors de la décision portant sur un programme de retraitement. Comme chaque laboratoire doit disposer d'une méthode de retraitement fiable, intégrée à ses procédures de fonctionnement standard, la partie 5 décrit une méthode avancée pour la validation des protocoles de retraitement.

Scientia

Connaissance. Science. Compétence.

La série éducative Scientia de Leica Microsystems témoigne de notre engagement à l'amélioration de la théorie et de la pratique en histologie via l'éducation, la formation et le discours scientifique.



Partie 1

L'évaluation initiale

Pourquoi mon bloc est difficile ou impossible à couper ?

L'évaluation initiale : pourquoi mon bloc est difficile ou impossible à couper ?

Si vous êtes en présence de blocs très difficiles, voire impossibles à couper, il est important de tenter de découvrir pourquoi cela n'a pas fonctionné avant de décider des mesures à adopter. Voici les premières questions à se poser :

1. Quel est le problème des échantillons traités ? Sont-ils trop durs, trop mous, friables, pâteux, etc. Les descriptions fournies dans la partie 2 vous permettront d'en juger.
2. Quelle est la différence entre la procédure de traitement qui a engendré les échantillons problématiques et les procédures précédentes réussies ?
3. Le programme prévu a-t-il été utilisé ?
4. Mon problème affecte-t-il tous les échantillons du lot, ou seulement un petit nombre ? Sont-ils tous de type similaire ?
5. Mes échantillons se trouvaient-ils tout en haut dans la chambre de réaction, est-il alors possible qu'ils n'aient pas été entièrement immergés dans tous les réactifs ?
6. Mes échantillons ont-ils été traités selon le programme habituel qui crée d'ordinaire de bons résultats pour les échantillons de cette taille et de ce type ?
7. Est-il possible que le programme ait été trop long ou trop court pour mes échantillons problématiques ? Un programme trop long risque de générer des tissus "sur-traités", tandis qu'un programme trop court produira au contraire un "sous-traitement". Les tissus sur-traités ne doivent pas subir de retraitement.
8. Le logiciel a-t-il présenté, au cours de la procédure, une erreur qui pourrait indiquer un dysfonctionnement du système ?
9. Le contrôle visuel des flacons de réactifs a-t-il apporté une aide (niveaux, contamination, positionnement et scellage) ?
10. Est-il possible qu'une erreur ait été commise lors du remplacement des solvants dans le préparateur ou que des réactifs se soient trouvés en dehors du seuil de pureté recommandé ? Des réactifs défectueux ou une séquence de réactifs incorrecte peuvent produire un "sous-traitement". Si l'instrument approprié est disponible, une mesure de la concentration des réactifs de déshydratation peut être effectuée.
11. Avez-vous appliqué une fixation normale aux échantillons problématiques ?
12. Est-ce que je sais avec certitude ce qui n'a pas fonctionné ?

Toutes ces questions ont pour objectif de vous aider à déterminer ce qui n'a pas fonctionné. Si vous n'êtes toujours pas certain d'avoir déterminé la cause du problème, il est recommandé d'examiner vos échantillons méticuleusement afin de récolter autant d'informations que possible. Un examen plus approfondi des blocs peut confirmer vos soupçons quant à l'origine du problème. Votre odorat peut permettre de déterminer s'il reste du solvant dans le tissu.

Partie 2

Informations supplémentaires :

exemples de problèmes typiques, et leurs causes

Informations supplémentaires : exemples de problèmes typiques, et leurs causes

Le tableau 1 fournit un référentiel succinct permettant de traiter les problèmes ; il répertorie certains termes descriptifs fréquemment utilisés par les histologistes confrontés à des blocs difficiles et à des coupes non satisfaisantes. Pour chaque cas, une cause possible est suggérée. Les paragraphes suivants décrivent chaque problème en détail avec un exemple d'illustration. Les solutions répertoriées sont expliquées dans la partie 3 (solutions 1 à 10). Une aide supplémentaire est fournie dans les arbres de décision de retraitement joints en annexe.

Tableau 1. Description des blocs problématiques et causes possibles

Nombre	Problème	Cause possible	Solution (voir partie 3)
1	Tissu craquelé, cassant ou friable.	Sur-traitement	1, 3
2	Tissu rétracté.	Sous-traité	8, 9
3	Tissu "cuit".	Sur-traité	1, 2, 3
		Échantillon desséché	7,
4	Tissu poisseux, pâteux ou gras.	Sous-traité	9, 10
5	Tissu sec et poudreux.	Sur-traitement	1, 2, 3
6	Le tissu a une odeur d'agent éclaircissant.	Sous-traité	8, 9
7	Tissu mou et compressible.	Sous-traité	9, 10
8	Le tissu contient des fragments durs.	Présence de calcium ou d'autres matières	6, 3, 5
9	Bord extérieur du tissu satisfaisant mais impossible de couper la zone centrale.	Sous-traité	9, 10
		Infiltration de paraffine incomplète	8
10	Le tissu manque d'homogénéité.	Fixation médiocre, traitement incorrect	9, 10
11	Bord extérieur du tissu friable et impossible à couper, mais la zone centrale est satisfaisante.	Sur-traitement	1, 2, 3
12	L'échantillon présente des zones distinctes n'étant pas coupées, elles correspondent à des types de tissu particuliers, tels que les muscles, les tissus conjonctifs denses ou la graisse.	Sous-traitement	3, 4, 5, puis 9
13	Séparation entre la surface de l'échantillon et la paraffine qui l'entoure. L'échantillon risque d'être arraché de la face du bloc lors du dégrossissage.	Enrobage incorrect	8
		Sous-traitement	9,10
14	Rétraction de l'échantillon entraînant la formation d'une face de bloc concave.	Sous-traitement	9,10
15	Le tissu se trouvant au milieu du bloc n'est pas maintenu correctement, les coupes présentent une "teinte bleue" et un noyau diffus.	Sous-traitement ou traitement incorrect	9
16	Les coupes "suent" pendant la flottation.	Sous-traitement ou traitement incorrect	9d
17	Les coupes se dissocient rapidement pendant la flottation.	Sous-traitement (rétention du solvant)	9

Problème 1. Tissu craquelé, cassant ou friable.

Le tissu a probablement été sur-traité. Un retraitement ne sera probablement d'aucune efficacité. Le fait de tremper la face exposée du bloc dans de l'eau glacée ou dans un assouplissant agent pour procéder ensuite à une nouvelle coupe méticuleuse peut permettre d'obtenir un résultat acceptable (utiliser les solutions 1 et 3).

Exemple

Les coupes de foie de la figure 1 présentées pendant la flottation, étaient très friables lors de la coupe. Il n'a donc pas été possible d'obtenir de coupe cohésive au début. Le tissu a été préparé lors d'un cycle éthanol/xylène de 12 heures, ce qui est trop long pour ce type de tissu et pour un échantillon de cette taille. De meilleures coupes ont pu être obtenues après l'utilisation brève d'un agent assouplissant sur la face du bloc (une solution d'eau et de détergent), le refroidissement et la reprise de la coupe. (solutions 2 et 3)

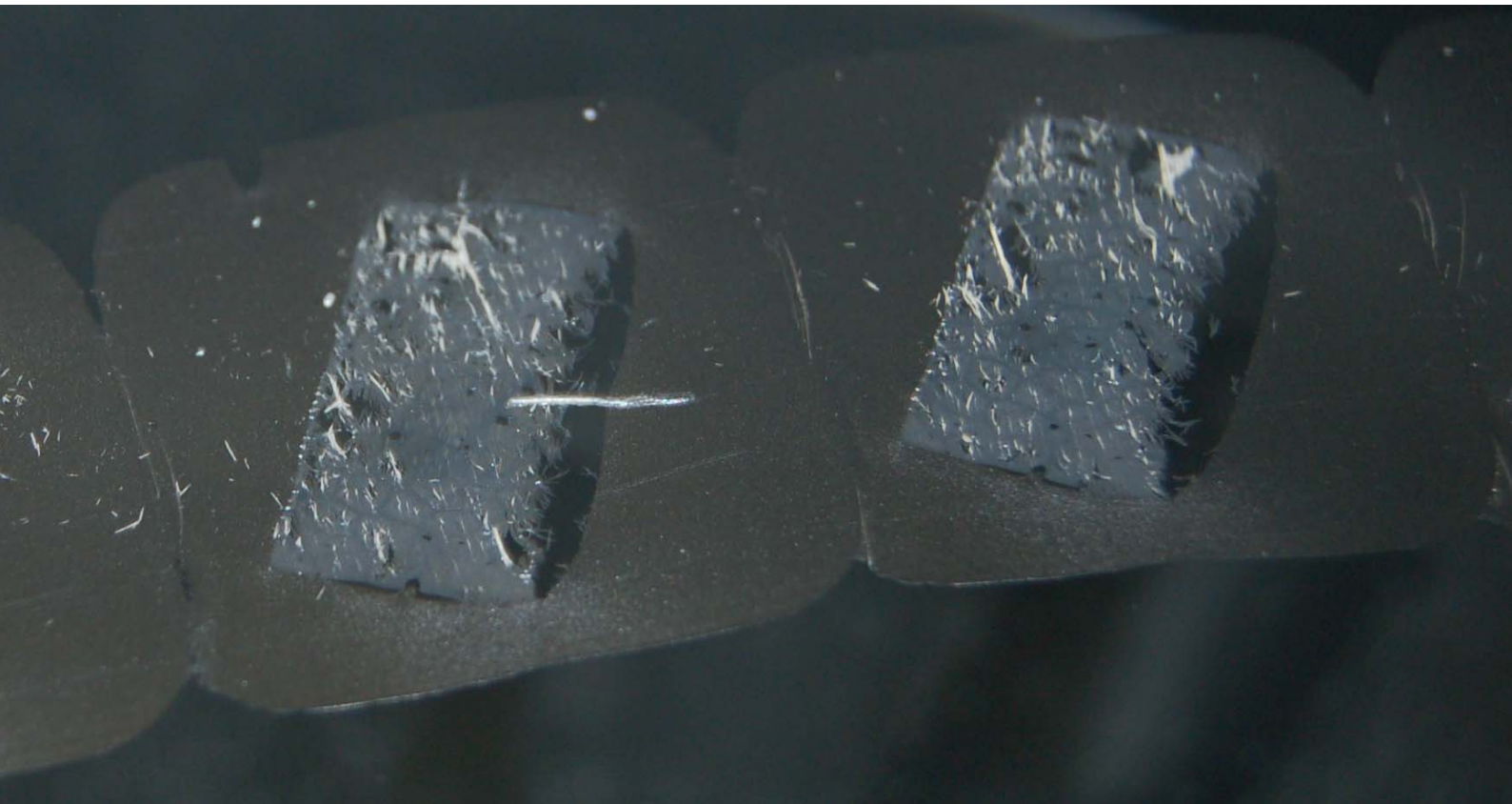


Figure 1

Coupes d'un bloc de foie friable

Problème 2. Tissu rétracté.

Un tissu sous-traité se rétracte dans le bloc en raison de l'évaporation du solvant résiduel. Un retraitement peut résoudre le problème. Après la coupe, les tissus correctement traités ne se rétractent pas parce que tous les solvants ont été remplacés par la paraffine. (Utiliser la solution 8 ou 9)

Exemple

Le bloc illustré à la figure 3 est un myocarde sous-traité, coupé 24 heures auparavant. La face du bloc s'est recontractée suite à la rétraction du tissu due à l'évaporation du solvant résiduel persistant après le traitement. Cette photographie a pour but d'illustrer l'étendue de la rétraction par le biais d'un rétroéclairage (vert) derrière un miroir incliné, tel qu'illustré à la figure 4. La meilleure coupe pouvant être préparée à partir de ce bloc, immédiatement après l'enrobage, est illustrée à la figure 2.

L'étendue à laquelle la surface d'un bloc se contracte après la coupe constitue un bon indicateur de la qualité du traitement. Par ailleurs, le tissu exposé dans ce bloc a une odeur d'agent éclaircissant. Le cycle de traitement était trop court pour un échantillon de cette taille et de ce type. L'utilisation de la solution 9A peut permettre d'obtenir une coupe complète.



Figure 2

Coupe de mauvaise qualité du bloc de myocarde sous-traité illustrée à la figure 2

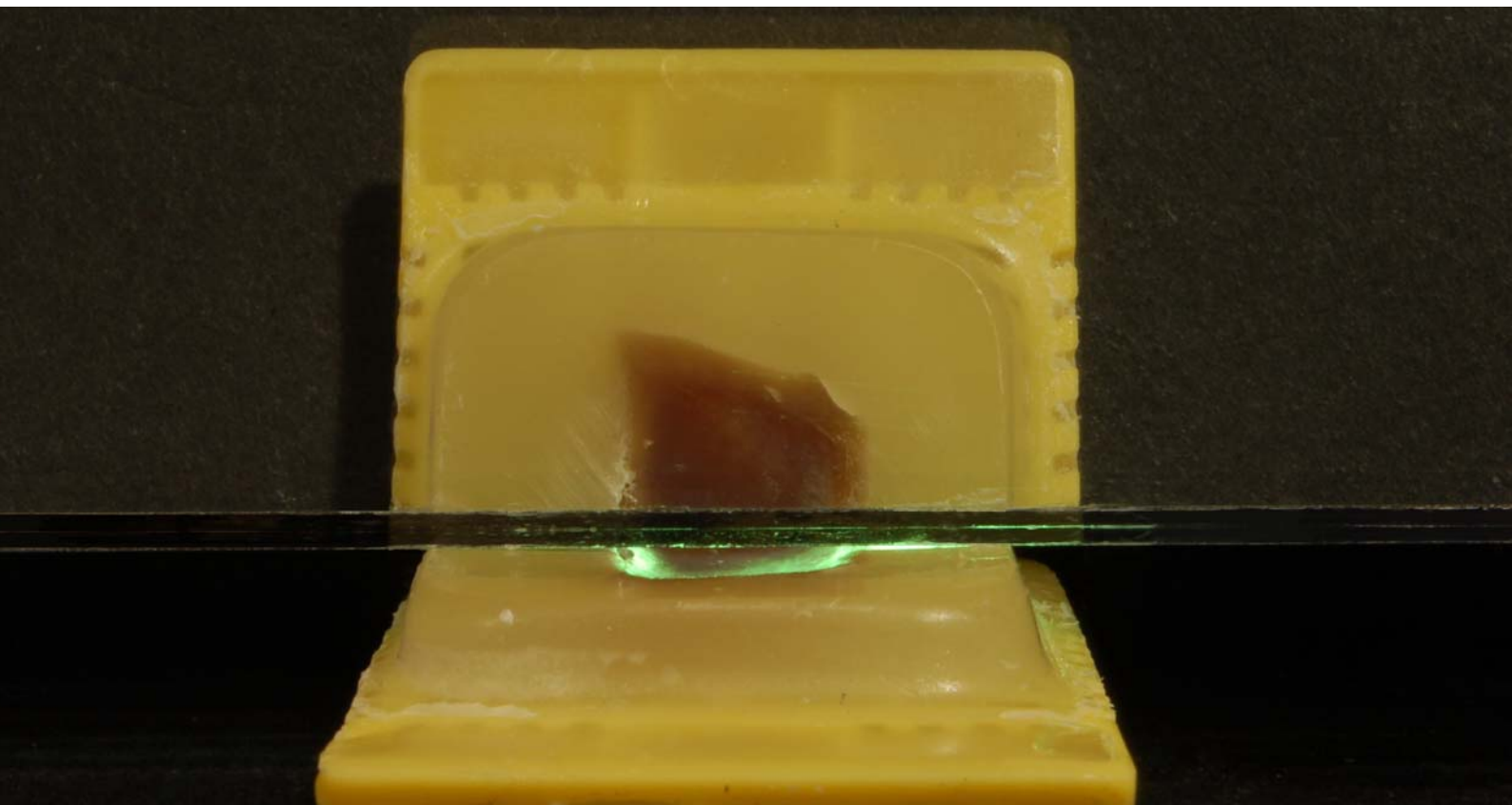


Figure 3

Bloc présentant une rétraction extrême

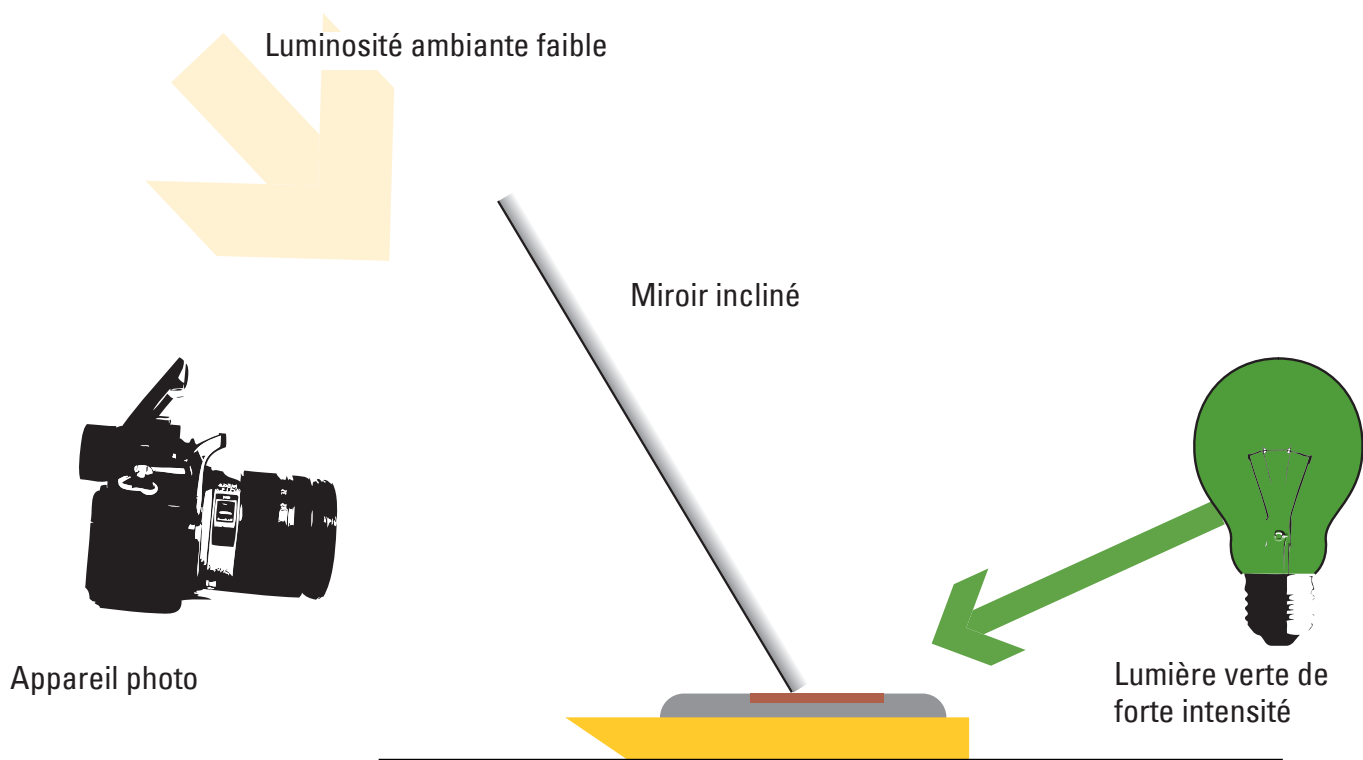


Figure 4

Positionnement de l'appareil photo permettant de démontrer la rétraction de l'échantillon

Problème 3. Tissu "cuit".

Le tissu ainsi décrit est généralement sur-traité (ou a été soumis à des conditions extrêmes, par ex. une chaleur excessive). Le dommage peut être irréversible. Il est parfois possible d'obtenir des coupes en trempant la face du bloc dans de l'eau glacée ou dans un agent assouplissant pour procéder ensuite à une reprise méticuleuse de la coupe. (Utiliser les solutions 1, 2 et 3). Voir également l'exemple du problème 1.

Ce phénomène peut également provenir d'un séchage complet de l'échantillon avant ou pendant le traitement. L'utilisation d'une solution de reconstitution suivie d'un retraitement peut s'avérer efficace. (Utiliser la solution 7)

Exemple

Un échantillon de langue a séché pendant une semaine avant le traitement de routine. Lors de l'enrobage, il apparaissait flétri et très dur, et était décrit par l'enrobeur comme étant "cuit". Après avoir appliqué les solutions 1, 2 et 3, la meilleure coupe ayant pu être obtenue est illustrée à la figure 5.

Le résultat de l'application de la solution 7, utilisant la solution de Sandison pour la reconstitution de l'échantillon suivie du retraitement et de la reprise de la coupe, est illustré à la figure 6. Bien que la morphologie soit juste acceptable, il a été possible d'obtenir une coupe bien plus cohésive.

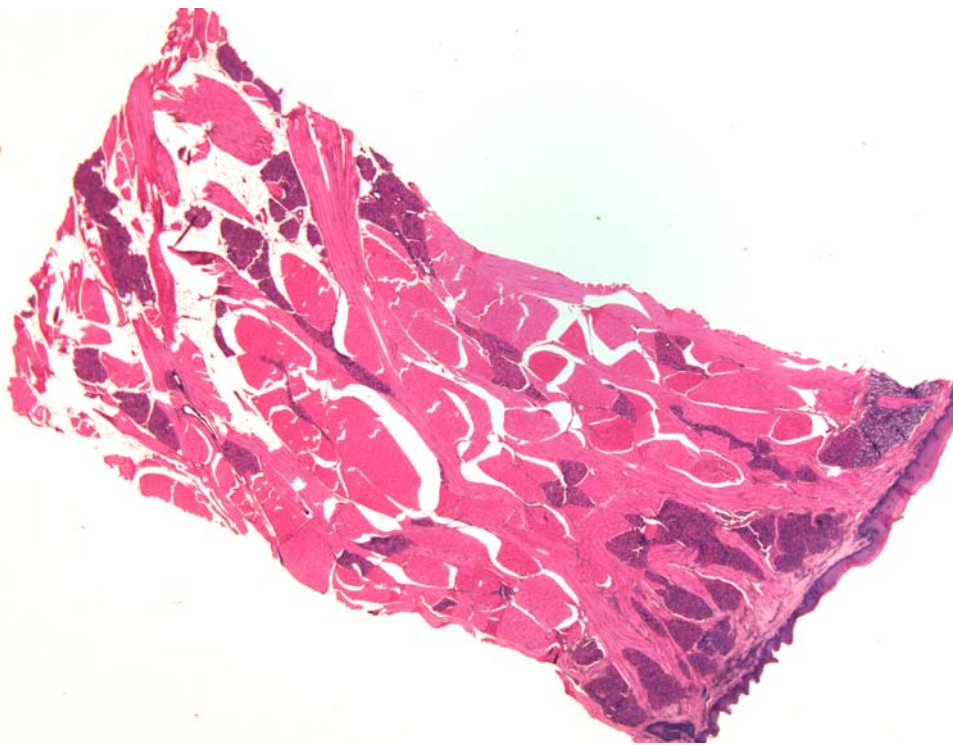


Figure 5

Coupe de langue avant
la reconstitution et le
retraitement

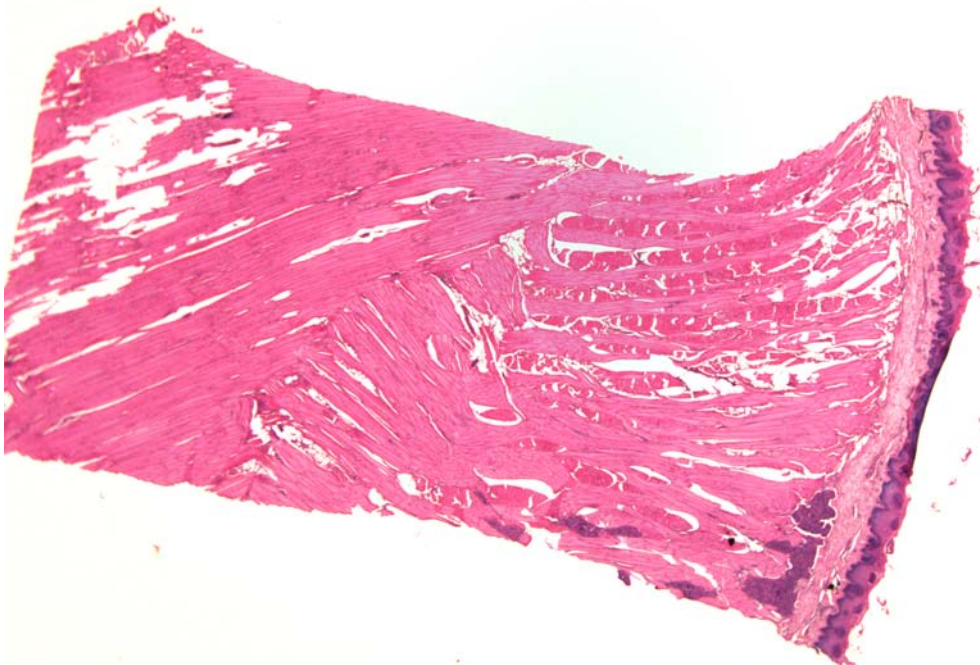


Figure 6

Coupe de langue après
la reconstitution et le
retraitement

Problème 4. Tissu poisseux, pâteux ou gras.

La graisse est la cause habituelle des blocs présentant ces propriétés. Le traitement n'a pas permis d'éliminer les lipides de certaines zones de l'échantillon; la paraffine ne s'infiltre pas correctement dans ces zones qui ne sont donc pas maintenues pour la coupe. Ce phénomène est très courant dans le cas d'échantillons mammaires de grande taille ayant été traités dans le cadre d'un cycle trop court. Le retraitement, utilisant un programme de durée suffisante, doit produire des blocs pouvant être coupés. (Utiliser la solution 9 ou 10)

Exemple

La figure 7 présente un échantillon mammaire graisseux sous-traité constitué d'une grande zone centrale d'apparence grasse. Seul un bord de tissu fragmenté peut être transféré vers la lame (figure 8). Le tissu n'est ni déshydraté ni éclairci (contient de la graisse insoluble) et doit être retraité. Il est suggéré d'appliquer la solution 9a comprenant un cycle de 8 heures.



Figure 7

Échantillon mammaire sous-traité



Figure 8

Bord de tissu fragmenté
provenant d'un bloc de tissu
mammaire sous-traité

Problème 5. Tissu sec et poudreux.

Les tissus secs et poudreux peuvent résulter d'un sur-traitement, en particulier si le tissu contient beaucoup de sang. Ceci s'observe aussi fréquemment quand le tissu est traité dans le cadre de programmes trop longs. Un retraitement ne résoudra pas le problème.

Le fait de tremper le bloc dans de l'eau glacée avant de procéder à la coupe est efficace. Le fait de couper le bloc lentement après l'avoir laissé réchauffer peut permettre d'obtenir des coupes. Le fait de couper plus finement peut résoudre le problème. (Utiliser la solution 2 ou 3)

Exemple

La figure 9 présente la coupe d'un bloc tissulaire sur-traité d'un foie de rongeur (colorant de la réticuline). Le tissu a été traité lors d'un cycle de 12 heures. Le bloc en résultant était extrêmement friable, sec et poudreux. Il présentait, par ailleurs, d'importantes micro-fissurations. Le fait de tremper la face du bloc dans de l'eau glacée avant de reprendre la coupe peut permettre d'obtenir des coupes de meilleure qualité (solution 3).

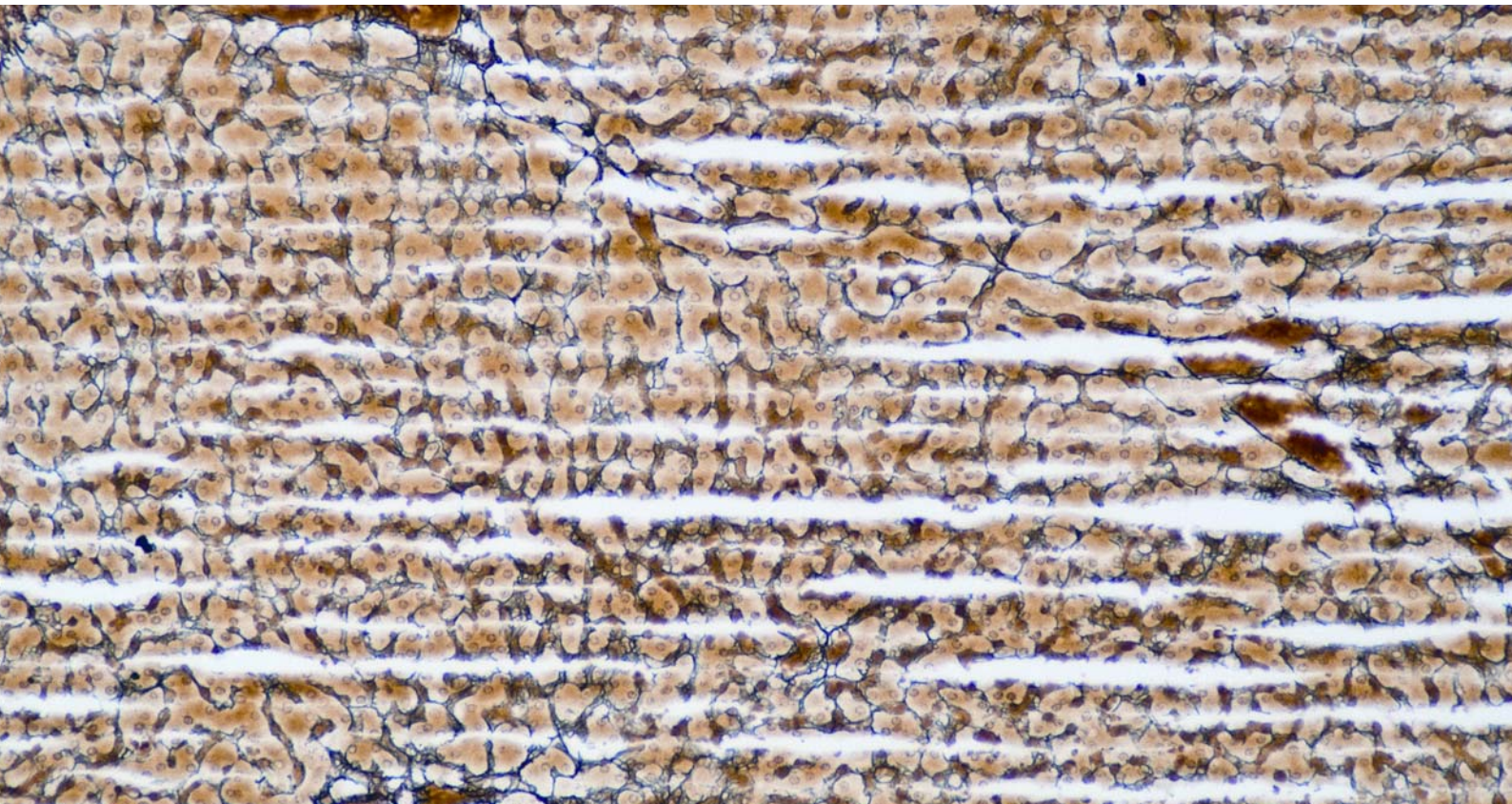


Figure 9

Foie de rongeur sur-traité (coloration de la réticuline)

Problème 6. Le tissu a une odeur d'agent éclaircissant.

Les blocs qui ont une odeur d'agent éclaircissant sont sous-traités. La paraffine n'a pas remplacé le solvant. Une nouvelle infiltration de l'échantillon risque de produire des blocs ne pouvant pas être coupés. Toutefois, un retraitement complet peut être la meilleure option car les échantillons comme celui-ci contiennent souvent des traces d'eau. (Utiliser la solution 8 ou 9)

Exemple

La coupe d'un bloc de tissu fibreux (figure 10) se désintègre dès qu'elle est placée à la surface de l'eau. Bien que le microtomiste ait réussi à obtenir une coupe, celle-ci a été largement perturbée. La face du bloc avait une odeur de xylène qui n'avait pas été remplacé par la paraffine. La solution 8 devrait améliorer les propriétés du bloc et permettre d'obtenir des coupes cohésives.



Figure 10

Les coupes se trouvant à la surface de l'eau se dissocient en raison du solvant résiduel

Problème 7. Tissu mou et compressible.

Un bloc de tissu mou et compressible indique que, pour certaines raisons, l'infiltration de la paraffine est incomplète. Cela provient souvent de la présence de lipides insolubles n'ayant pas été retirés lors du traitement (tissu sous-traité) mais il peut aussi s'agir d'une infiltration insuffisante de la paraffine. Cela provient souvent de lipides insolubles mais il peut également s'agir d'une infiltration incomplète. Un retraitement constitue la meilleure option. (Utiliser les solutions 9 et 10)

Exemple

Le bloc de pancréas illustré à la figure 11, présente quelques-uns des effets typiques résultant d'un temps de fixation court suivi d'un important sous-traitement. Les micrographies (figures 12 et 13) illustrent les conséquences radicales en termes de morphologie apparaissant dans les coupes de ce bloc. Il est surprenant qu'il ait été possible d'en obtenir des coupes dès le début. La face du bloc s'est contractée, s'éloignant de la surface sur plusieurs jours après la coupe du tissu en raison de l'évaporation des solvants qui n'ont pas été éliminés pendant le traitement.

Le craquèlement typique qui se produit dans le centre d'un bloc sous-traité est illustré à la figure 12. Le bord extérieur du tissu est mieux préservé.

Une zone centrale dans laquelle les cellules sont gonflées et présentent une "teinte bleue" comme l'illustre la figure 13. La rétention de solvant est l'une des causes de ce problème : le tissu n'a pas été suffisamment déshydraté ni éclairci, et la paraffine n'a pas remplacé l'agent éclaircissant.¹ La solution 10 permettait d'obtenir de meilleures coupes mais elle risque de compromettre la morphologie dans une certaine mesure.



Figure 11

Bloc de pancréas mal fixé et sous-traité

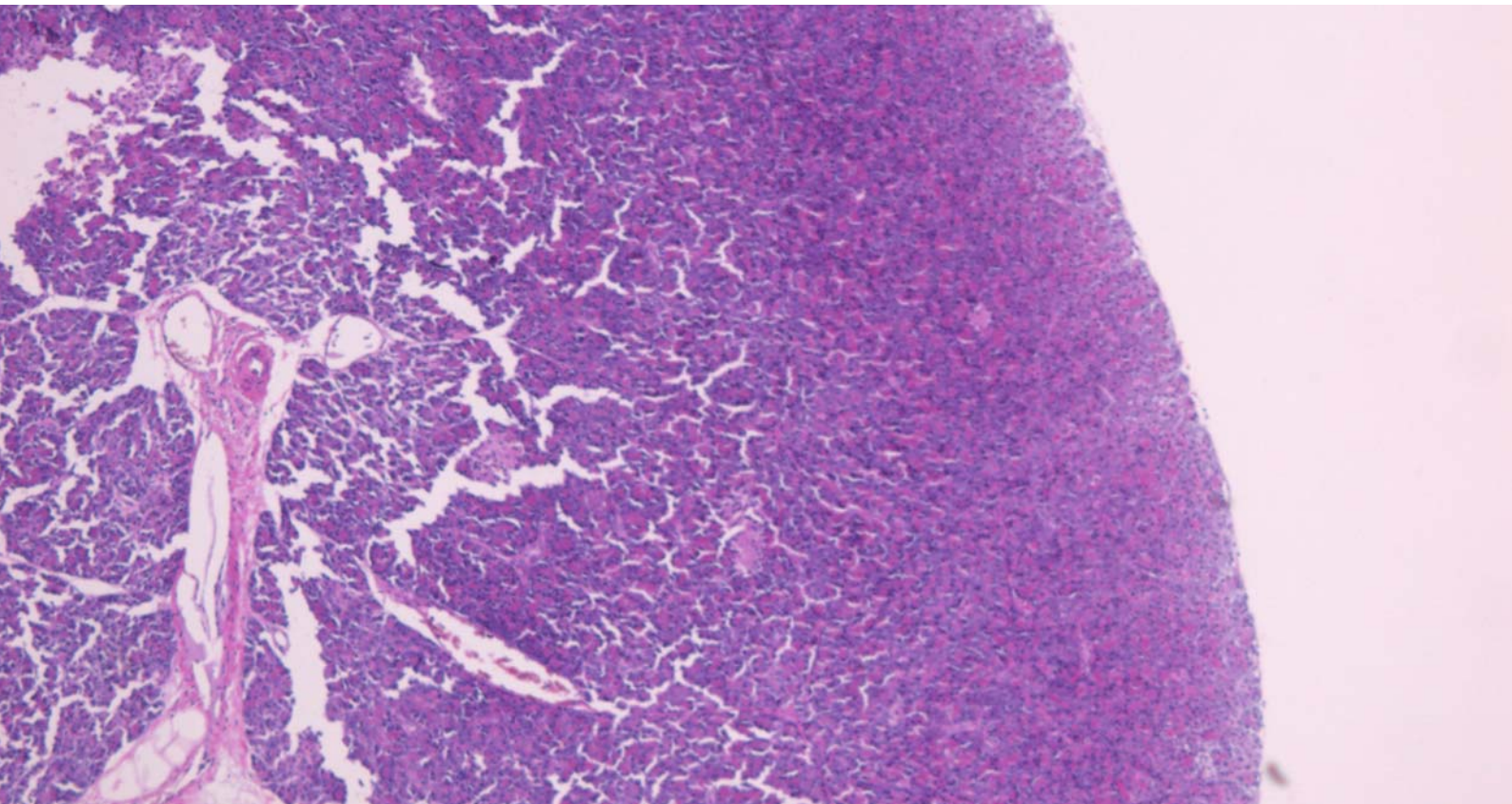


Figure 12

Vue à faible grossissement d'un pancréas mal fixé et sous-traité

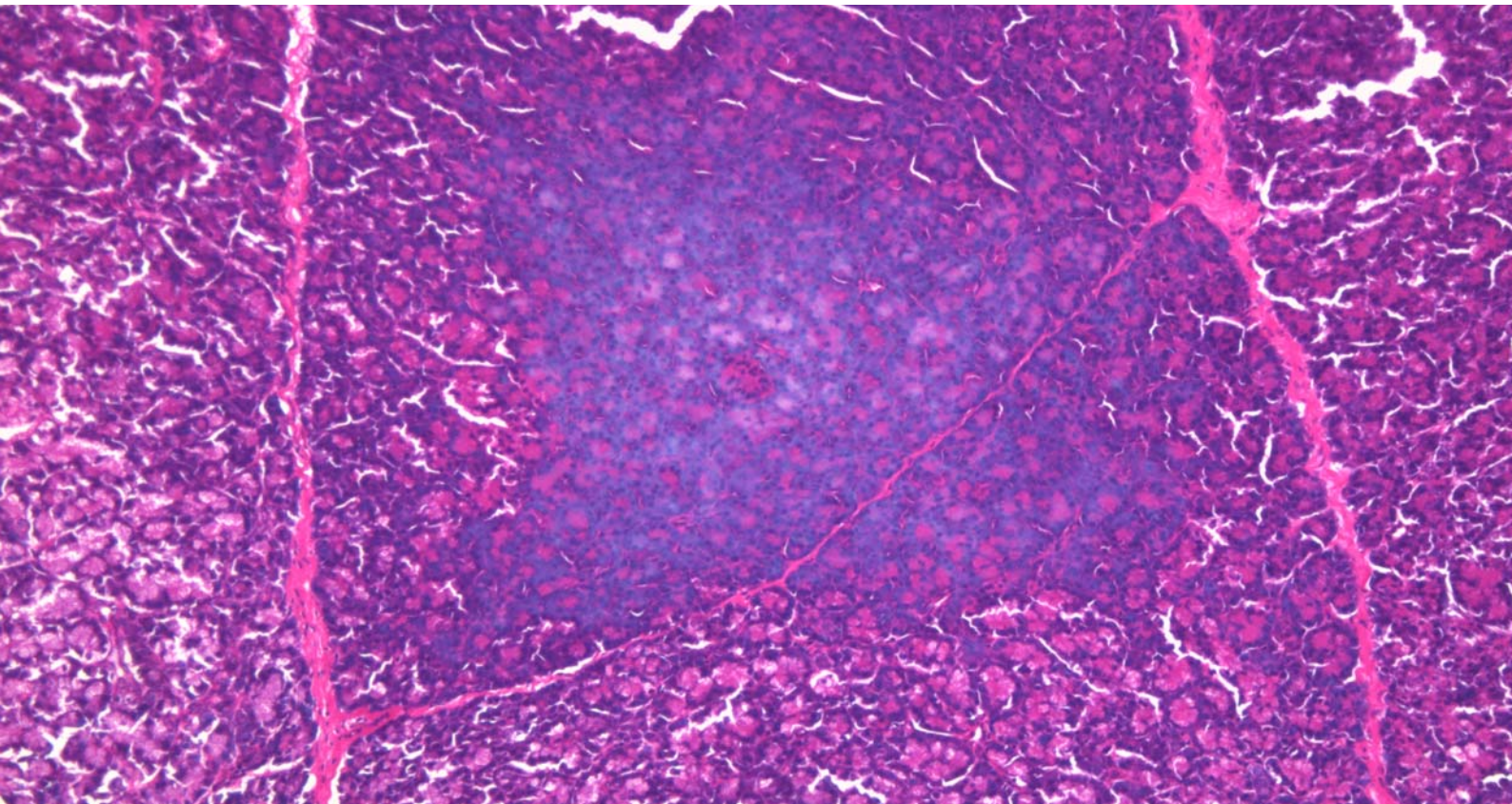


Figure 13

Une zone centrale du pancréas mal fixé et sous-traité présentant une "teinte bleue".

Problème 8. Le tissu contient des fragments durs.

La question est d'abord de savoir ce que ces fragments peuvent être. En cas de présence de calcium, la décalcification de la surface suivie d'un lavage complet du bloc et d'une reprise de la coupe pourrait produire des coupes exploitables. Il y a de nombreuses autres possibilités, notamment les plaques d'athérome. Le fait de tremper la face du bloc avant de reprendre la coupe peut leur être bénéfique. D'autres dépôts minéraux, généralement sur les tissus pulmonaires, peuvent poser problème. Le retrait physique local de particules fautives ou de corps étrangers doit constituer le dernier recours (par ex. les agrafes chirurgicales, les fragments de verre, de bitume, etc.). (Utiliser les solutions 6, 3 et 5).

Exemple

La matière basophile présente dans le granulome illustré à la figure 14 est du calcium. La plus grande partie s'est fragmentée et détachée de la coupe. Cette micrographie a été réalisée à partir de la meilleure partie préservée de la coupe. Le reste a été mal broyé. Il se peut que la décalcification de la surface (solution 6) ait permis d'obtenir quelques coupes cohésives. Un retraitement serait peu efficace à moins qu'il n'intègre une étape de décalcification.

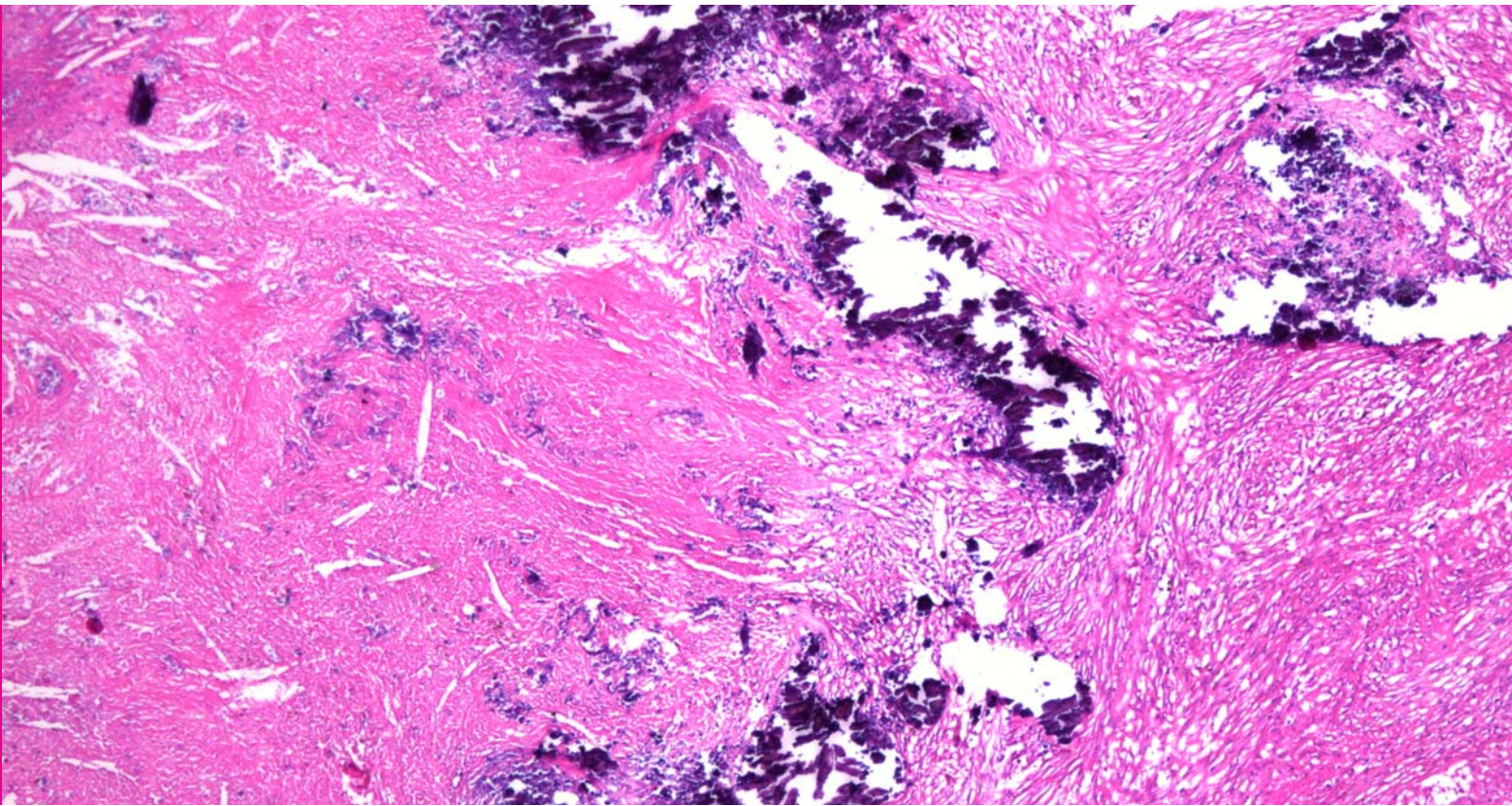


Figure 14

Granulome contenant du calcium basophile (H&E)

Problème 9. Bord extérieur du tissu satisfaisant mais impossible de couper la zone centrale.

Indique un sous-traitement. Le tissu n'est pas complètement déshydraté et/ou éclairci et n'est donc pas correctement infiltré (la paraffine n'a pas pu pénétrer en raison de la présence d'eau). Un retraitement devrait résoudre le problème. (Utiliser la solution 9 ou 10)

Autre possibilité : l'échantillon a été déshydraté et éclairci correctement mais n'a pas été suffisamment exposé à la paraffine pour produire une infiltration complète. Faire fondre le bloc et appliquer une infiltration supplémentaire. (Utiliser la solution 8)

Exemple

Le bloc de foie illustré à la figure 15 contient une zone centrale qui ne sera pas coupée. Le tissu n'est pas maintenu et tombe lors du passage de la lame.

Après un examen plus approfondi, l'on constate que la zone centrale est sèche et poudreuse et qu'elle n'a pas été infiltrée par la paraffine (figure 16). Le tissu a été parfaitement fixé mais a été soumis à un cycle de traitement court de deux heures et n'a pas été déshydraté ni éclairci correctement. Si une coupe cohésive complète doit être obtenue, un retraitement sera requis. La solution 9d devrait être utilisée pour le retraitement dans le cadre d'un programme de six heures.

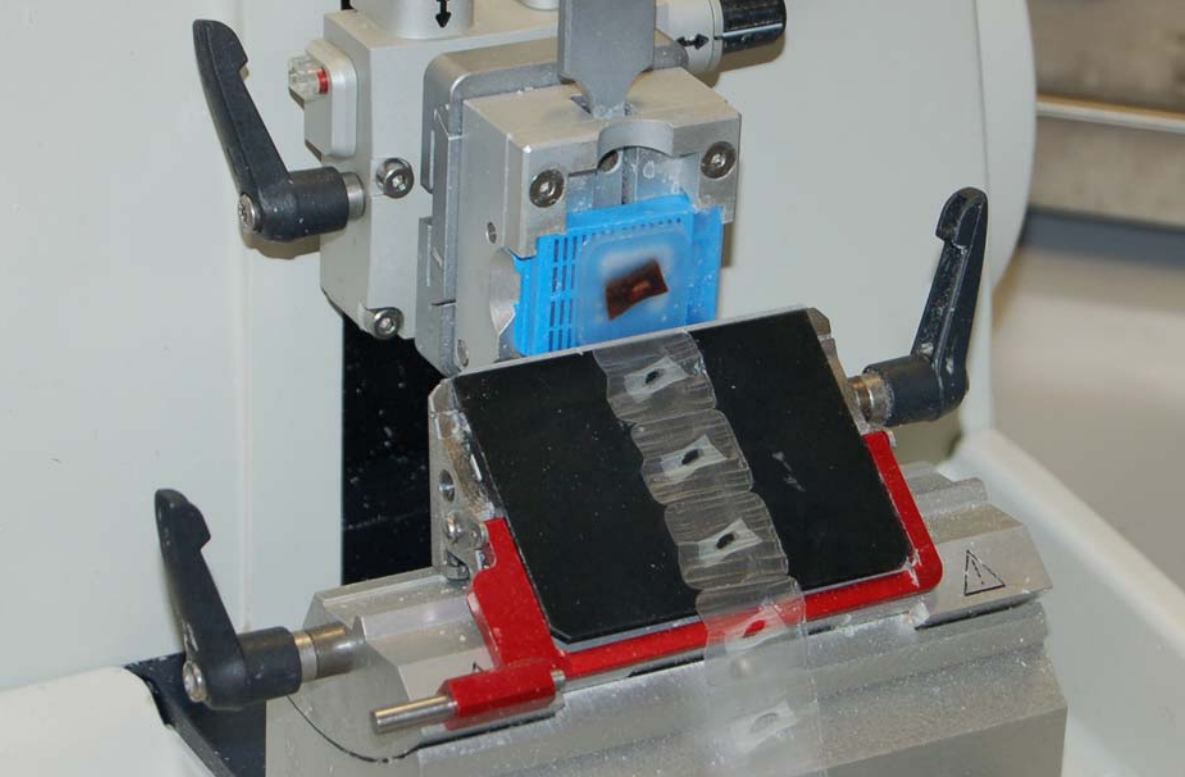


Figure 15

Foie soumis à un traitement médiocre qui ne pourra pas produire de coupe cohésive

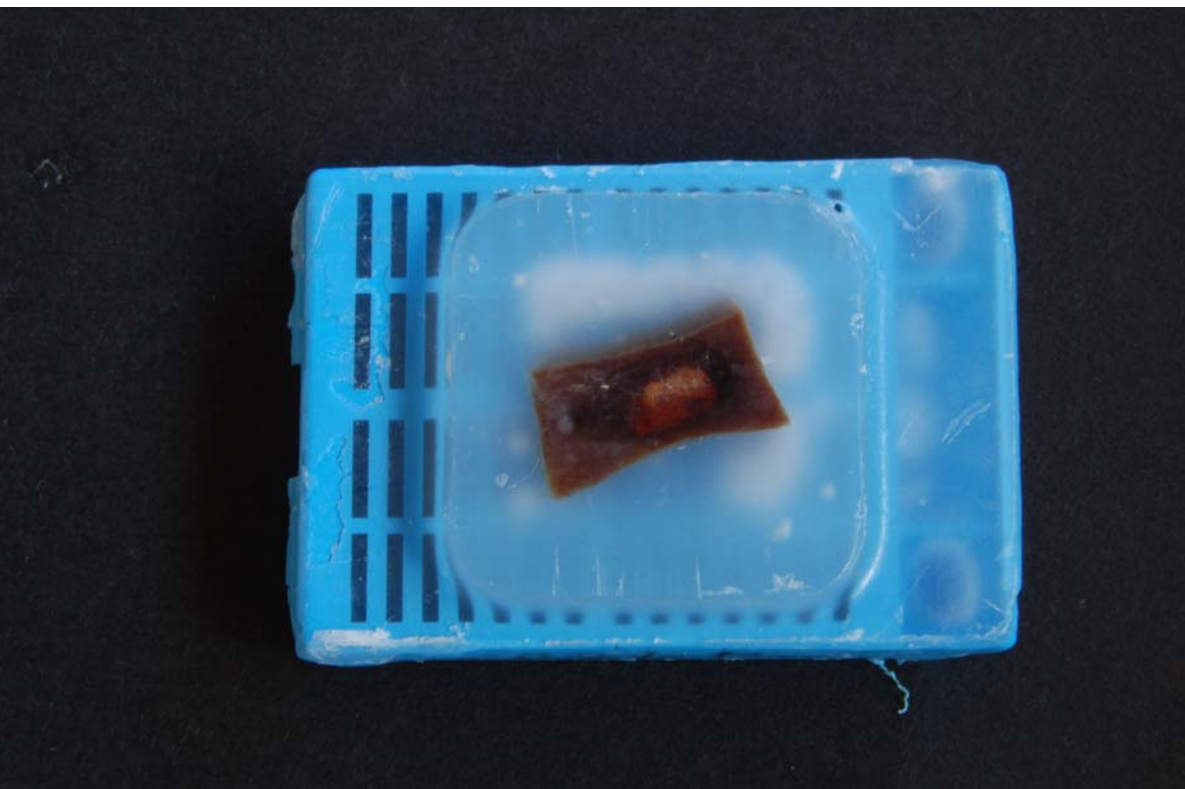


Figure 16

Bloc tissulaire de foie dont la zone centrale n'est pas maintenue

Problème 10. Le tissu manque d'homogénéité.

Il faut rappeler qu'une mauvaise fixation initiale de l'échantillon peut occasionner ce problème. Cela peut également être dû à un problème de traitement mais n'est pas nécessairement lié à un simple sous-traitement (programme trop court). Le problème découle plus probablement d'une mauvaise qualité, de réactifs contaminés (dépassement de seuil) ou mal ordonnés. Les solvants ont-ils été remplacés récemment ? Un retraitement peut résoudre le problème. (Utiliser la solution 9 ou 10)

Exemple

L'échantillon de cortex cérébral illustré à la figure 17 a été traité dans le cadre d'un programme éthanol/xylène conventionnel de 12 heures. Bien que ce programme convienne plutôt à un échantillon de ce type et de cette taille, la texture du bloc est médiocre. Les examens ont révélé que la déshydratation finale de l'éthanol était fortement contaminée par la présence d'eau. De ce fait, l'échantillon est mal préparé. La solution 9 (retraitement) peut améliorer la qualité des coupes obtenues.



Figure 17

Une déshydratation incorrecte dans
un bloc tissulaire de cerveau

Problème 11. Bord extérieur du tissu friable et impossible à couper, mais la zone centrale est satisfaisante.

Cela peut indiquer un sur-traitement dans des tissus sensibles, tels que les tissus hématopoïétiques ou lymphoïdes où la couche extérieure du tissu est la première affectée. Un retraitement ne sera probablement d'aucune efficacité. Le fait de tremper la face exposée du bloc dans de l'eau glacée ou dans un agent assouplissant pour procéder ensuite à une reprise méticuleuse de la coupe peut permettre d'obtenir un résultat acceptable. (Utiliser les solutions 1, 2 et 3)

Exemple

Les micrographies illustrées aux figures 18 et 19 représentent différentes zones d'une même coupe de rate. La figure 18 illustre la zone centrale qui se coupait correctement, tandis que la figure 19 illustre une zone friable du bord de l'échantillon. La partie centrale est assez bien préservée, le cytoplasme et le noyau de lymphocytes présentent clairement une rétraction minimale tandis que la partie extérieure présente un craquèlement, des détails cytoplasmiques et nucléaires médiocres et une rétraction considérable. Le bloc, étant sur-traité, fait apparaître les conséquences morphologiques dans la partie extérieure en raison de l'exposition prolongée aux réactifs de traitement. La zone centrale a été moins exposée aux réactifs de traitement et est mieux préservée. Les solutions 1, 2 et 3 peuvent permettre d'obtenir des coupes de meilleure qualité mais le retraitement ne sera d'aucune efficacité.

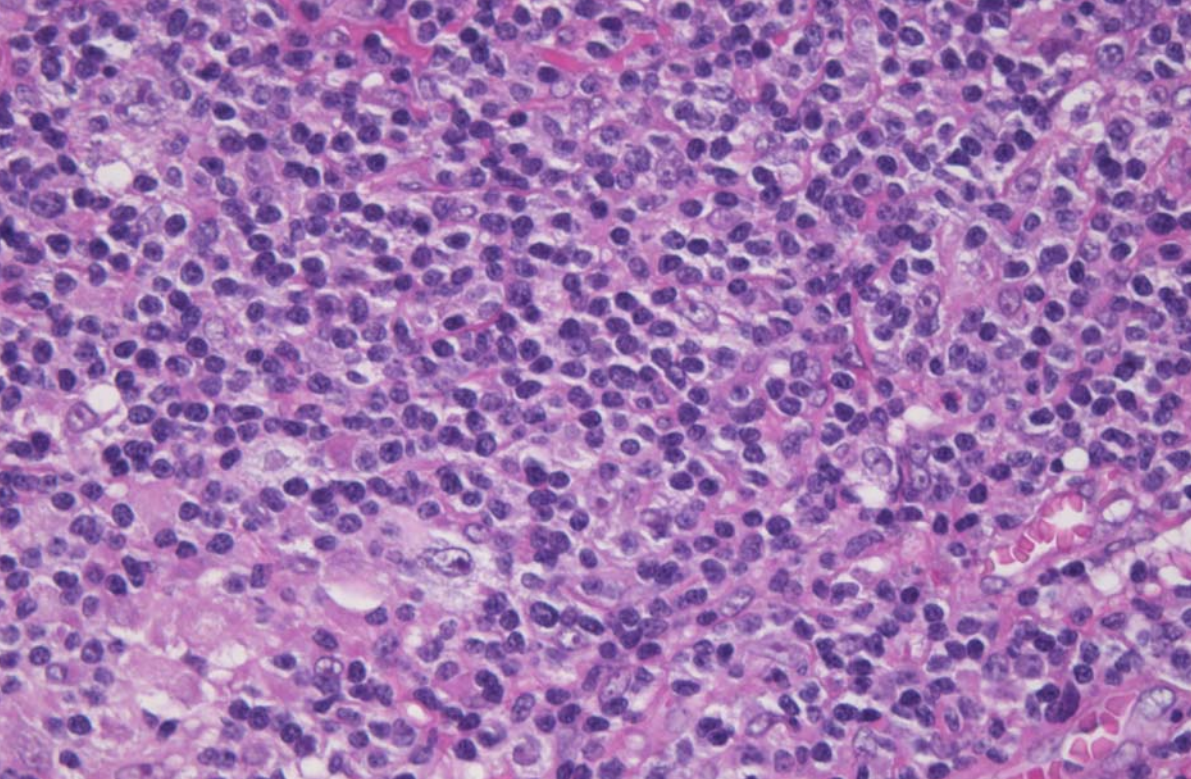


Figure 18

Traitement adéquat dans la zone centrale de l'échantillon de rate

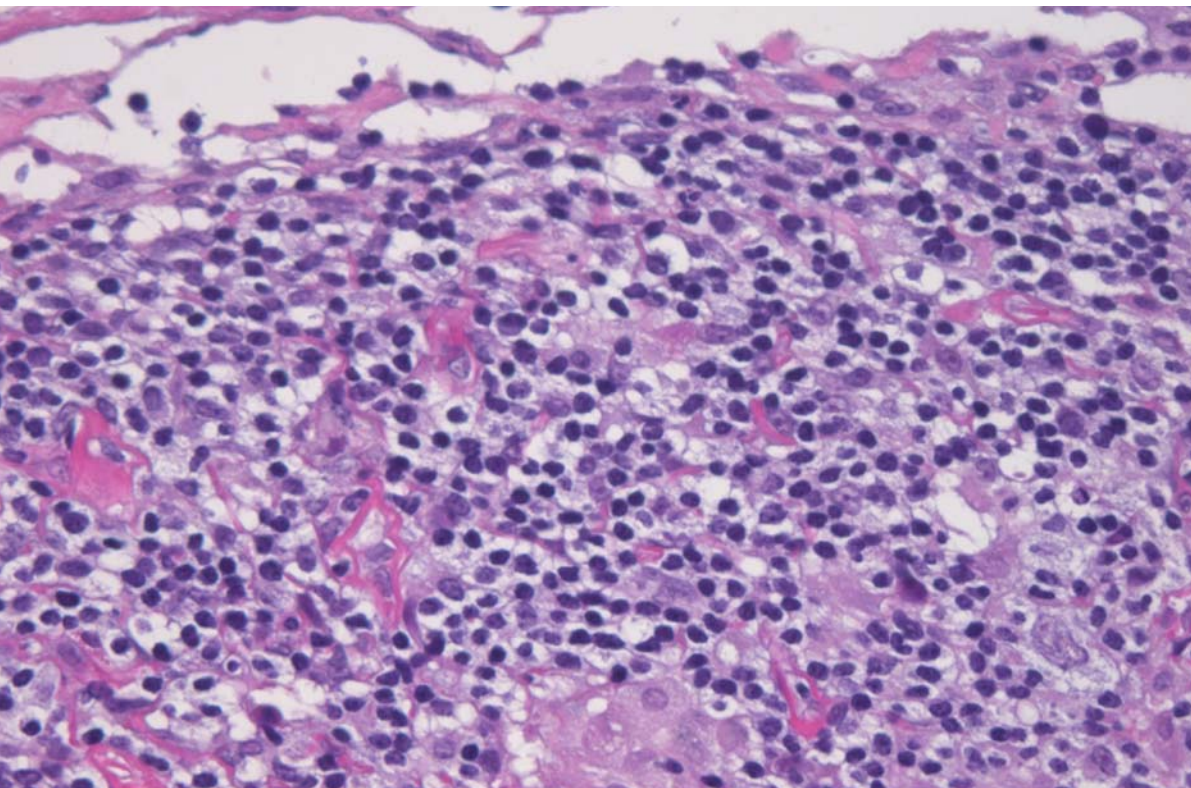


Figure 19

Sur-traitement du périmètre extérieur de l'échantillon de rate

Problème 12. L'échantillon présente des zones distinctes n'étant pas coupées, elles correspondent à des types de tissus particuliers, tels que les muscles, les tissus conjonctifs denses ou la graisse.

Cela indique un sous-traitement des tissus sensibles en raison de leurs caractéristiques uniques (telles que leur densité extrême). Il peut être avantageux de commencer par tester les techniques d'assouplissement et de coupe détaillées dans les solutions 1 à 5. En cas d'échec, un retraitement peut résoudre le problème (solution 9).

Exemple

La figure 20 illustre un bloc tissulaire de foie de porc bien fixé mais sous-traité. Celui-ci était extrêmement creux en raison de la rétraction du tissu. Un examen minutieux montre également que le tissu conjonctif interlobulaire est sec et n'est pas maintenu au centre du bloc.

La coupe de ce bloc (figure 21) présente une grande zone de tissu manquant et est plutôt insatisfaisante. Cet échantillon a été soumis à un cycle de traitement trop court. Il est mal déshydraté et éclairci. L'utilisation de la solution 9A peut permettre d'obtenir une coupe complète mais la qualité morphologique finale sera probablement juste acceptable.



Figure 20

Bloc de foie de porc
présentant un tissu conjonctif
interlobulaire mal maintenu



Figure 21

Foie de porc sous-traité
dont la zone centrale est
insatisfaisante

Problème 13. Séparation entre la surface de l'échantillon et la paraffine qui l'entoure. L'échantillon risque d'être arraché de la face du bloc lors du dégrossissage.

Cela pourrait indiquer un simple problème d'enrobage. La paraffine présente sur l'échantillon a pu se solidifier avant le placement de l'échantillon dans le moule d'enrobage. Un nouvel enrobage minutieux devrait permettre de résoudre le problème.

Un sous-traitement extrême peut également produire cet effet car l'échantillon se rétracte quand le solvant s'évapore de la face du bloc, ce qui entraîne la séparation entre la paraffine et la surface de l'échantillon (voir l'exemple illustrant le problème 7). Un retraitement minutieux peut résoudre le problème.

Exemple

L'échantillon illustré à la figure 22 s'est séparé de la paraffine qui l'enrobait. Cette situation peut provenir du fait que l'échantillon soit arraché de la face du bloc pendant la microtomie (en particulier pendant l'ébauche). Ceci peut résulter de la solidification de la paraffine présente sur l'échantillon avant que celui-ci ait été placé dans le moule lors de l'enrobage. Un nouvel enrobage minutieux devrait permettre de résoudre le problème. Dans ce cas, le problème ne découle pas d'un mauvais traitement.



Figure 22

Échantillon de tumeur présentant un mauvais enrobage

Problème 14. Rétraction de l'échantillon entraînant la formation d'une surface de bloc concave.

Le sous-traitement (ou traitement incorrect) produit cet effet car l'échantillon se rétracte quand le solvant s'évapore de la face du bloc. Un retraitement minutieux peut résoudre le problème. Cet effet se produit sur plusieurs jours après l'enrobage et se retrouve parfois dans des blocs ayant été coupés et classés. Voir exemples 2, 7 et 12. (Utiliser la solution 9 ou 10)

Problème 15. Le tissu se trouvant au milieu du bloc n'est pas maintenu correctement, les coupes présentent une "teinte bleue" et un noyau diffus.

Si le problème est lié à un sous-traitement résultant de la rétention de solvant dans le bloc, un retraitement peut être efficace. Si une faible démonstration nucléaire découle d'autres causes (par exemple de la contamination par du formol ou de la paraffine), il est peu probable qu'un retraitement améliore la morphologie, mais il peut permettre de préparer une meilleure coupe. (Utiliser la solution 9 ou 10)

Le noyau diffus (bullage) fait partie des noms descriptifs attribués à un groupe d'artefacts caractérisés par un noyau de cellule à faible démonstration. Les causes de ces artefacts sont mal comprises, elles font l'objet de débats depuis de nombreuses années.^{2, 3} Étant donné qu'il existe un grand nombre de facteurs contribuant potentiellement à cet effet, il est quasiment impossible de déterminer avec certitude la cause exacte.

Les caractéristiques du noyau diffus peuvent inclure :

- Des membranes nucléaires mal définies.
- La chromatine dont la définition est insuffisante (elle peut avoir une apparence amorphe comme du verre coupé, ou floue, et peut être très pâle à plutôt dense).
- La présence d'une teinte bleue ou d'un voile bleu (tirant davantage sur le bleu royal que le pourpre/bleu d'un noyau de la même coupe coloré correctement).
- Une répartition clairsemée ne pouvant affecter que de petites parties de la coupe (par exemple, dans une coupe d'intestin ou de peau, ne sera présente que dans certaines parties de l'épithélium présentant des tissus sous-jacents non affectés).
- Apparition d'un nombre variable d'échantillons dans un lot composé d'un ou deux échantillons jusqu'à un nombre important d'échantillons.
- Apparition de types d'échantillons particuliers seulement. Les échantillons généralement affectés sont : le tractus gastro-intestinal (en particulier les endoscopies), le tissu lymphoïde et la moelle osseuse, la rate, la peau et l'endomètre. Les tissus épithéliaux et lymphoïdes paraissent les plus sensibles.
- Occurrences périodiques, perturbant un laboratoire pendant un certain laps de temps, puis disparaissant mystérieusement pour ne réapparaître que quelques semaines ou quelques mois plus tard.

Ci-après, quelques-unes des causes ayant été suggérées :

- Laisser un échantillon sécher avant la fixation⁴ (par ex. en plaçant un tissu frais non fixé sur une surface absorbante sèche). Cela peut certainement constituer un problème avec les petits échantillons endoscopiques.
- L'utilisation du xylène contaminé par de l'eau pendant l'étape d'éclaircissement lors du traitement. Dans cette situation, il est suggéré de retraiter l'échantillon⁵ afin de résoudre le problème.

- L'utilisation de paraffine contaminée par du formol ou du formol et de l'éthanol pendant le traitement⁵. Ce problème peut être causé par un préparateur de tissu défaillant (en particulier un système de transfert de fluide) et endommager le tissu de façon permanente.
- Lorsque le solvant n'a pas pu être entièrement remplacé par la paraffine lors du traitement (rétention du solvant). Ceci peut provenir de l'utilisation d'un protocole trop court, de l'utilisation de réactifs expirés ou contaminés ou d'un préparateur de tissu défaillant. Dans ce cas, un retraitement de l'échantillon peut permettre de résoudre le problème.
- Une surchauffe de la coupe au séchage avant la coloration (sécheur de lames défaillant produisant des points chauds dans la coupe).
- L'altération de la coloration du noyau par un déparaffinage inefficace des coupes avant coloration avec des traces de paraffine restantes dans la coupe. Le noyau ne peut pas être coloré correctement avec l'hématoxyline et peut absorber l'éosine, produisant ainsi ce que l'on appelle le "pink disease"^{6, 7}. Une prolongation de la durée de déparaffinage et un solvant frais peuvent permettre d'éradiquer la cause du problème.

Exemple

La figure 23 présente les caractéristiques typiques d'un noyau diffus avec la chromatine faiblement définie par la présence d'un voile de teinte bleue. Une partie de la muqueuse a été affectée de cette manière avec certaines zones adjacentes normalement préservées. L'échantillon était une matière post-mortem bien fixée traitée lors d'un cycle de quatre heures. Nous pensons que, dans ce cas, le problème découle de la rétention de solvant dans le tissu (sous-traitement grave). La solution 9E devrait produire une coupe plus cohésive et une meilleure coloration.

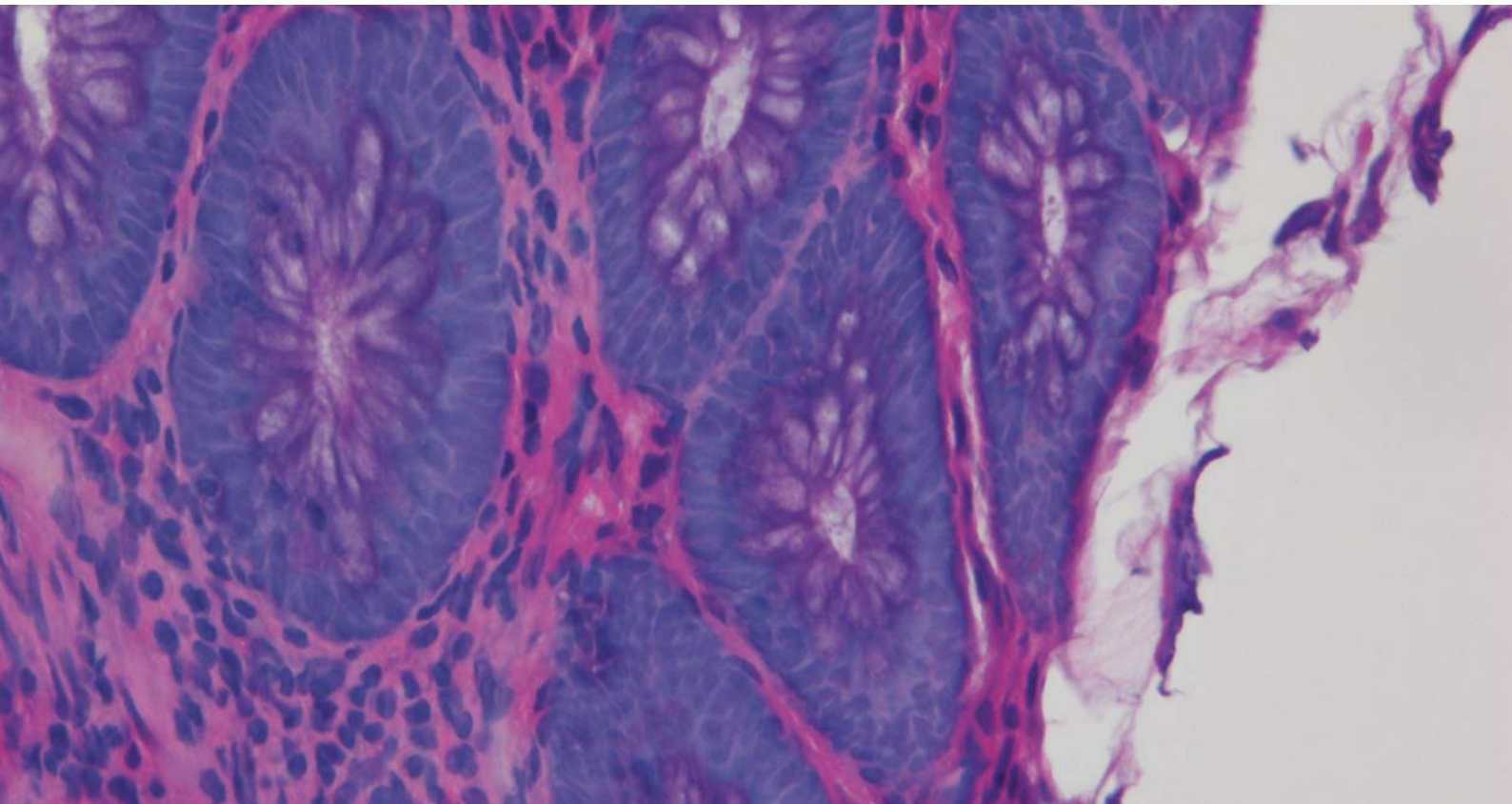


Figure 23

Tissu muqueux faisant apparaître une "teinte bleue" typique

Problème 16. Les coupes "suent" pendant la flottation

La "sudation" décrit un phénomène translucide parfois observé dans les coupes pendant la flottation. Ce phénomène est parfois associé à de minuscules gouttelettes grasses d'agent éclaircissant apparaissant à la surface de la coupe. Ceci est fréquemment observé dans le cas de blocs de cerveau et de moelle épinière n'ayant pas été entièrement déshydratés ni éclaircis. Les coupes ayant cette apparence ont également tendance à se fragmenter après une brève flottation. Un retraitement peut résoudre le problème s'il n'est pas possible d'obtenir des coupes. (Utiliser la solution 9d)

Exemple

La figure 24 présente des coupes d'un bloc de cerveau faisant apparaître une "sudation", ce qui indique que le tissu n'a pas été entièrement déshydraté ni éclairci pendant le cycle de six heures appliqué. Dans cette zone, la coupe fait apparaître un craquèlement et une rupture microscopiques. Le cerveau est un tissu difficile et délicat à traiter. La solution 9d peut produire de meilleures coupes, mais dans ce cas, une amélioration serait marginale.

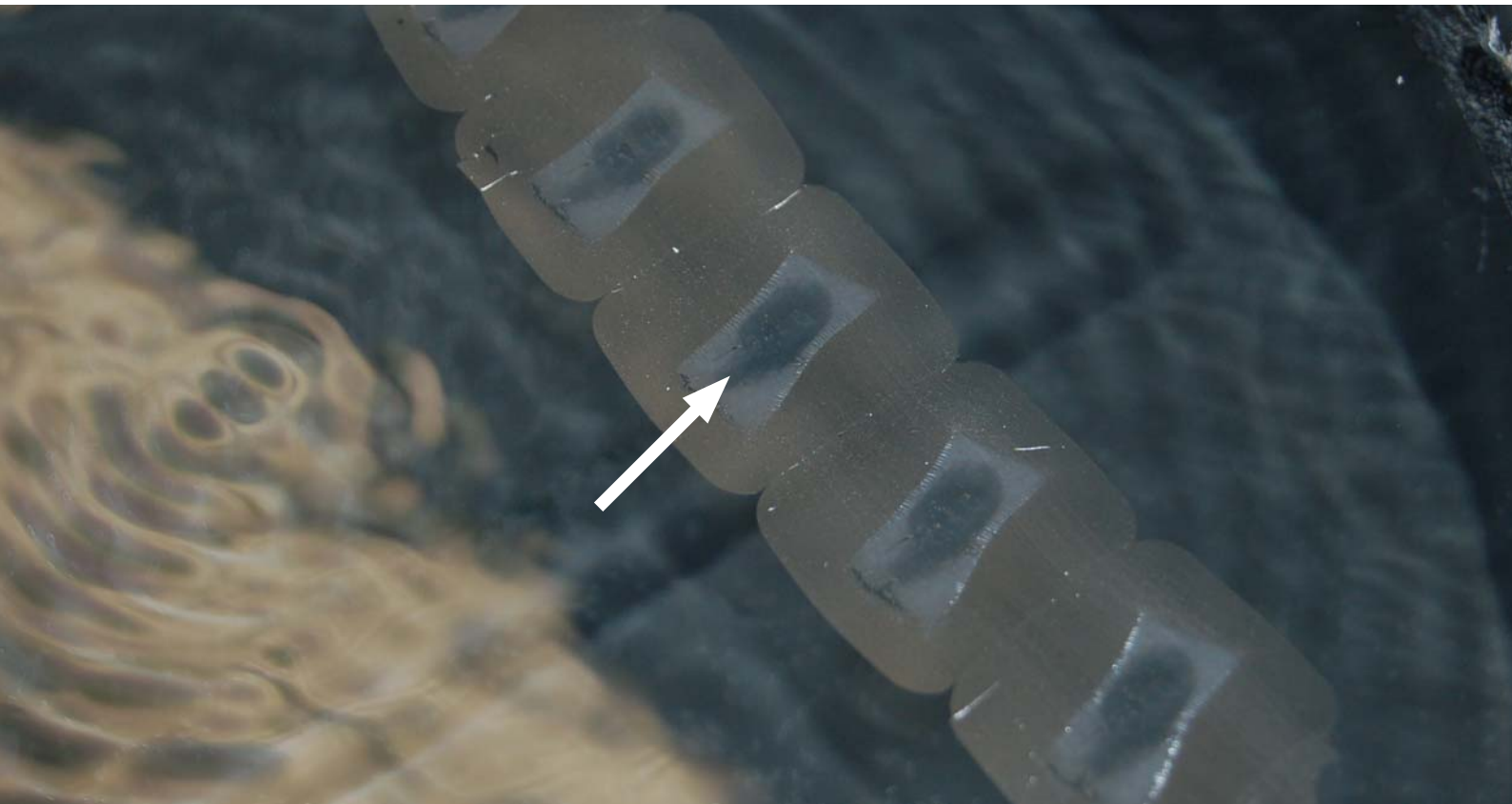


Figure 24

Coupes de cerveau présentant une
"sudation"

Problème 17. Les coupes se dissocient rapidement pendant la flottation

Il s'agit d'un problème courant généralement causé par un sous-traitement quand un solvant restant semble rompre la tension de la surface qui assure normalement la cohésion du tissu. Par conséquent, la coupe peut se dissocier rapidement lors de la flottation. Une flottation brève des coupes sur de l'eau froide ou tiède tout en évitant l'eau chaude peut permettre de récupérer des coupes. Un retraitement peut être utilisé s'il n'est pas possible d'obtenir des coupes satisfaisantes. (Utiliser la solution 9) Voir également l'exemple du problème 6.

Partie 3

Solutions détaillées

Solutions détaillées pour les blocs problématiques

Solutions détaillées pour les blocs problématiques :

Que faire maintenant ?

Avant de prendre une décision finale, il faut avoir :

- procédé à un examen minutieux du préparateur de tissu ainsi que des messages d'erreur et des défaillances.
- consulté l'équipe qui a effectué la maintenance du préparateur, ou procédé aux réglages et au chargement de l'instrument à cette occasion.
- observé soigneusement les échantillons en résultat et jugé la cause la plus probable du problème.
- considéré s'il ne serait pas préférable de tester quelques coupes, bien qu'elles risquent d'être de qualité médiocre, avant de tenter un retraitement.

Les histologistes expérimentés appliquent diverses techniques pour obtenir des coupes à partir de blocs qui ne sont pas optimaux. Les méthodes les plus courantes sont décrites dans les solutions 1 à 6 ci-dessous.

Il n'existe pas de méthode unique permettant de récupérer tous les tissus mal traités. Les ouvrages scientifiques et techniques contiennent quelques suggestions et proposent, pour certains d'entre eux, une aide anecdotique⁸⁻¹⁹. Nous avons évalué les options décrites dans les solutions 7 à 10 ci-dessous, mais nous ne pouvons fournir que des conseils d'ordre général, et non des suggestions spécifiques, tant les causes des problèmes de traitement sont diverses : la réussite dépend habituellement d'une identification correcte de ces causes. Une aide supplémentaire à la prise de décision est fournie dans les arbres de décision de retraitement joints en annexe.

Solutions sans retraitement

Solution 1 : Une bonne technique de base

Assurez-vous d'appliquer une bonne technique de base lorsque vous tentez d'obtenir des coupes à partir d'un bloc difficile.

En font partie :

- L'utilisation d'une lame parfaitement tranchante et sans défaut, adaptée au type d'échantillon à couper.
- Le réglage d'un angle de dégagement optimal pour la lame (parfois, un simple petit ajustement permet d'éviter toute déviation de la lame dans sa course ascendante).
- Le choix d'une épaisseur de coupe appropriée (une coupe plus fine ou plus épaisse peut permettre de résoudre le problème). Ceci est particulièrement utile pour les blocs friables.
- Assurez-vous que votre microtome est bien maintenu et qu'il ne présente aucun signe d'usure, toutes les fixations doivent fonctionner efficacement (ceci est particulièrement important pour la coupe de faces de blocs de grande taille ou de tissus robustes).
- Veillez à ce que l'échantillon soit enrobé de manière optimale et accordez une attention particulière à l'orientation de l'échantillon par rapport au tranchant. Par exemple, pour les échantillons tels que le col de l'utérus, très dense et fibreux, il est préférable que la lame ne rencontre qu'un point du tissu au lieu de l'appliquer sur la longueur car elle passe d'abord par la paraffine pour arriver jusqu'au tissu. Pour un bloc comme celui-là, la paraffine est nettement plus molle que le tissu du col de l'utérus infiltré et les mouvements de la lame ou du dispositif de serrage de la lame risquent d'entraîner des variations d'épaisseur dans la coupe. Une orientation appropriée peut permettre d'éviter ce problème.
- Veillez à ce que le bloc soit froid.

Solution 2 : Refroidissement des blocs

Pour les coupes de routine en paraffine, la pratique classique prévoit de refroidir le bloc après avoir exposé la surface du tissu. Le refroidissement a pour effet de durcir la paraffine afin qu'elle corresponde mieux à la dureté du tissu infiltré. Il existe différentes méthodes de refroidissement des blocs avant de procéder aux coupes mais certaines d'entre elles sont plus efficaces que d'autres, en particulier dans le cas de blocs difficiles.

- Un congélateur à -15 °C peut être utilisé mais il procure un froid "sec" et entraîne parfois des fissures au niveau de l'interface tissu/paraffine. Il est alors plus difficile d'obtenir des coupes cohésives, en particulier avec les blocs difficiles.
- Une plaque réfrigérée peut être utilisée, si sa surface est humide, elle est plus efficace (0 - 4 °C).
- Pour les blocs difficiles, placez la face du bloc en contact avec la surface de la glace en fusion pour un refroidissement plus efficace. Ceci présente l'avantage de réhydrater au moins partiellement une fine couche de tissu exposé et permet d'obtenir quelques coupes à partir d'un échantillon problématique (voir ci-dessous).

- Il est possible d'utiliser un spray froid pressurisé directement sur la face du bloc. Cette tâche doit être exécutée avec soin parce qu'une congélation locale peut entraîner un craquèlement. Il faut également noter que certains produits ne sont peut-être pas écologiques.

Solution 3 : Trempage et assouplissement

Quand le tissu est exposé à la surface d'un bloc de paraffine dans le cadre d'un dégrossissage approximatif, il a la possibilité d'absorber de l'eau et des réactifs contenant de l'alcool. Ils en pénètrent une petite portion dans le tissu, ce qui l'assouplit et le fait gonfler. Avec un tissu mal traité (qu'il s'agisse d'un sous-traitement ou d'un sur-traitement), cet effet permettra de réaliser quelques coupes. Le tableau 5 de l'annexe contient des détails sur divers réactifs pouvant être utilisés à cet effet.

Avec les blocs difficiles, cette procédure prévoit de procéder à un dégrossissage minutieux pour l'exposition du tissu tout en évitant d'endommager la surface de l'échantillon, il faut ensuite le placer avec la face vers le bas dans un bac contenant l'agent assouplissant, et ce pour une durée appropriée. Avant d'essayer d'obtenir des coupes, il faudra peut-être rincer la face du bloc et refroidir à nouveau le bloc. Parce que le réactif ne pénétrera qu'une couche très fine de tissu, il est indispensable que la face du bloc reste alignée dans le microtome afin de ne gaspiller aucun tissu pour obtenir une coupe intégrale. Généralement, après cette procédure, les coupes de meilleure qualité sont obtenues par un procédé de coupe très lent. Ci-après, les options incluses :

- Tremper la face du bloc dans de l'eau glacée
- Tremper la face du bloc dans de l'eau contenant du détergent⁶ ou un produit assouplissant^{11, 20}
- Tremper le bloc dans un agent assouplissant, par ex. dans un mélange alcool-glycérine¹¹, ou dans du Mollifex^{TM11, 21}
- Pour les échantillons de peau fortement kératinisés ou d'ongles, traitez la face du bloc avec du NairTM ou du VeetTM (produits épilatoires), une solution d'hydroxyde de potassium ou une solution de phénol (il s'agit de produits nocifs, ils doivent donc être manipulés avec soin). Ces réactifs peuvent également être utilisés pour assouplir en profondeur le tissu fixé avant de le traiter²².

Attention :

Le fait de tremper les blocs de manière prolongée risque d'endommager les caractéristiques de morphologie et de coloration des tissus, il convient donc de les utiliser de manière conventionnelle. La figure 25A présente l'effet d'un trempage prolongé dans l'eau. Le tissu qui se trouve dans le bloc devient blanc et opaque ; comparée au bloc non traité et à la coupe illustrée à la figure 25 B, cette coupe-ci présente une lésion nucléaire et une rétraction cellulaire.

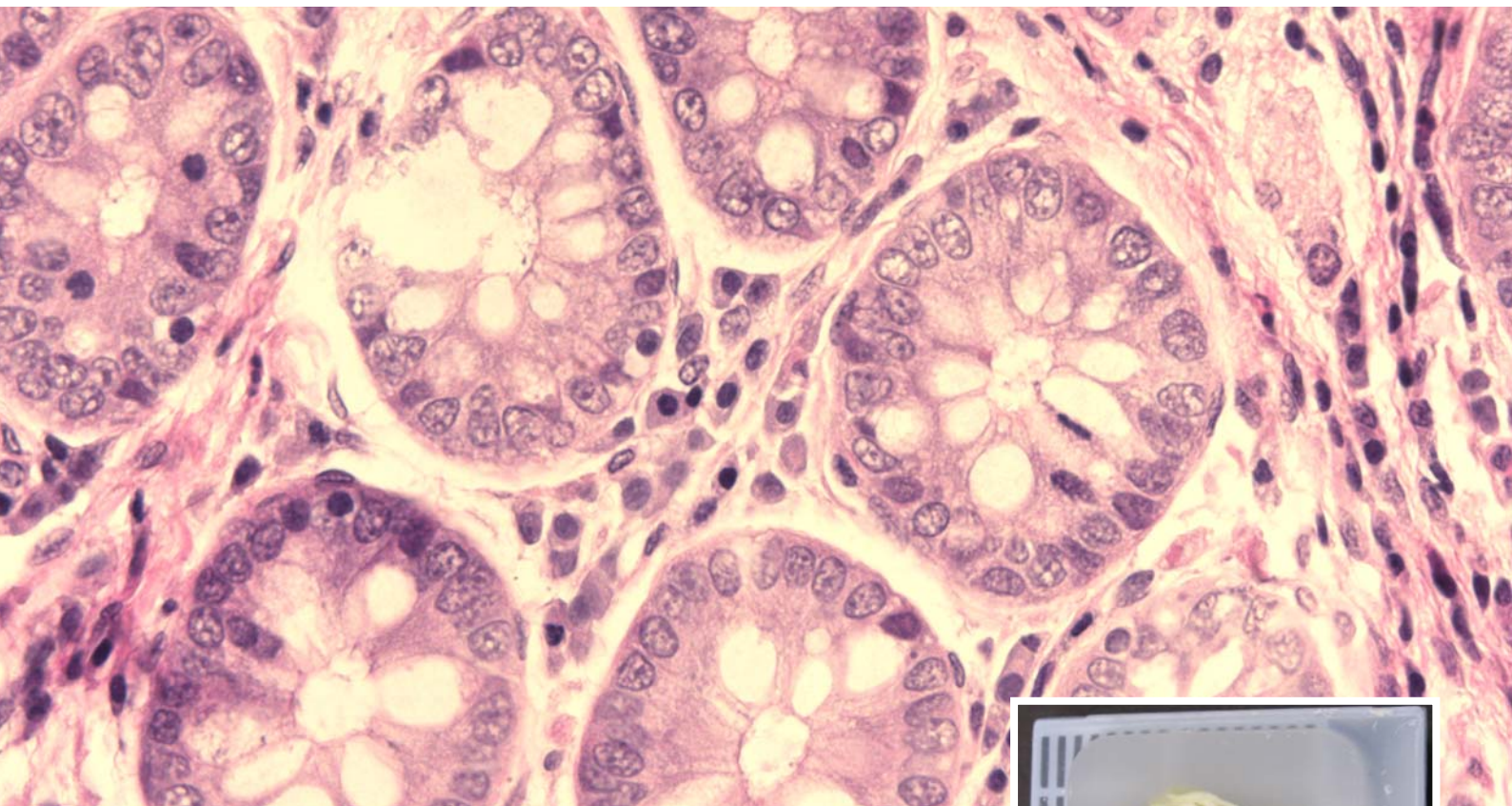


Figure 25A

Face de bloc trempée dans de l'eau pendant 30 minutes



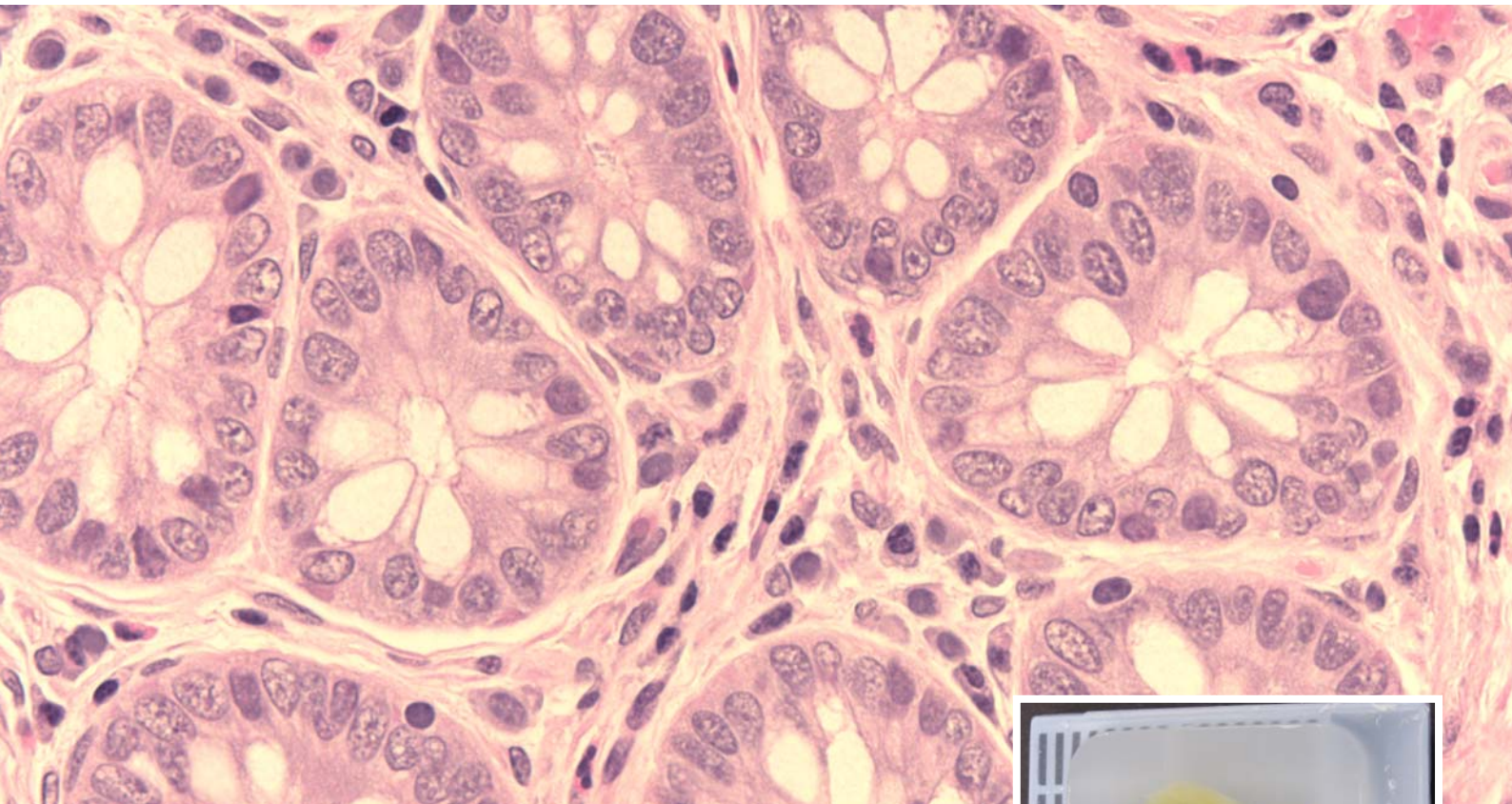


Figure 25B

Face de bloc refroidie brièvement et coupée sans avoir été trempée

Solution 4 : Flottation hors norme

Les techniques de flottation hors norme peuvent être utiles si les meilleures coupes pouvant être obtenues à partir d'un bloc problématique sont fortement plissées. Si les coupes flottent d'abord dans de l'eau froide ou tiède ou dans une solution d'éthanol à 20 % et qu'elles sont ensuite transférées vers le bain de flottation chaud sur une lame, il est possible d'obtenir des coupes plates. Une solution d'éthanol à 20 % enlève activement les plis parce qu'elle possède une tension de surface inférieure à l'eau.

Les blocs qui ont été sous-traités et qui contiennent des solvants résiduels ont tendance à "exploser" (se dissocier rapidement) à la surface de l'eau à une température de flottation normale. L'utilisation d'eau froide ou tiède pour la flottation permet de réduire, voire même d'éviter cet effet.

Solution 5 : Tape-transfer

Le Leica Paraffin Tape-Transfer System™ est recommandé dans le cas de tissus difficiles à couper, de biopuces tissulaires et constitue une option pour les blocs difficiles. Un cadre de ruban adhésif est appliqué sur la surface de coupe d'un bloc, puis aplani. Procéder à une coupe minutieuse. Celle-ci se détache alors du bloc tout en restant accrochée au ruban. La coupe est appliquée sur une lame dotée d'un revêtement adhésif spécial, déroulée et exposée à la lumière UV afin de polymériser l'adhésif. La lame est placée dans le solvant afin de retirer le ruban adhésif, puis colorée normalement²³.

Solution 6 : Décalcification de la surface

Certains blocs contiennent des fragments inattendus de matière dure. S'il s'agit de calcium, il peut être éliminé de la surface du bloc via une décalcification de la surface. Cette technique n'est pas utilisée pour éliminer les corps étrangers, tels que les sutures, agrafes, greffes synthétiques, etc. Ceux-ci ne peuvent parfois être retirés que localement de la face du bloc.

Explication : Les agents décalcifiants pénètrent une petite distance dans le tissu exposé d'un bloc de paraffine afin de dissoudre le calcium. Cela permet d'obtenir plusieurs coupes cohésives.

- Tremper la face de bloc exposée dans un agent décalcifiant, procéder ensuite à un rinçage complet dans l'eau, suivi d'un refroidissement, puis reprendre la coupe¹¹. Un rinçage complet est capital pour éviter que l'agent décalcifiant acide n'endommage le porte-lame du microtome.
- La durée requise dépend du décalcifiant utilisé. Les décalcifiants acides forts (tels que ceux contenant de l'acide chlorhydrique) doivent être appliqués pendant 5 à 15 minutes.
- Les décalcifiants acides forts peuvent avoir un effet négatif sur la coloration nucléaire et doivent donc être utilisés prudemment.

Attention :

Il est déconseillé d'utiliser des décalcifiants acides pour assouplir les blocs ne contenant pas de calcium car le réactif acide peut avoir un effet négatif sur la coloration ultérieure. La figure 26 présente l'épiderme d'une coupe de peau traitée avec un décalcifiant afin d'assouplir la kératine. Notez la mauvaise coloration nucléaire dans les couches superficielles.

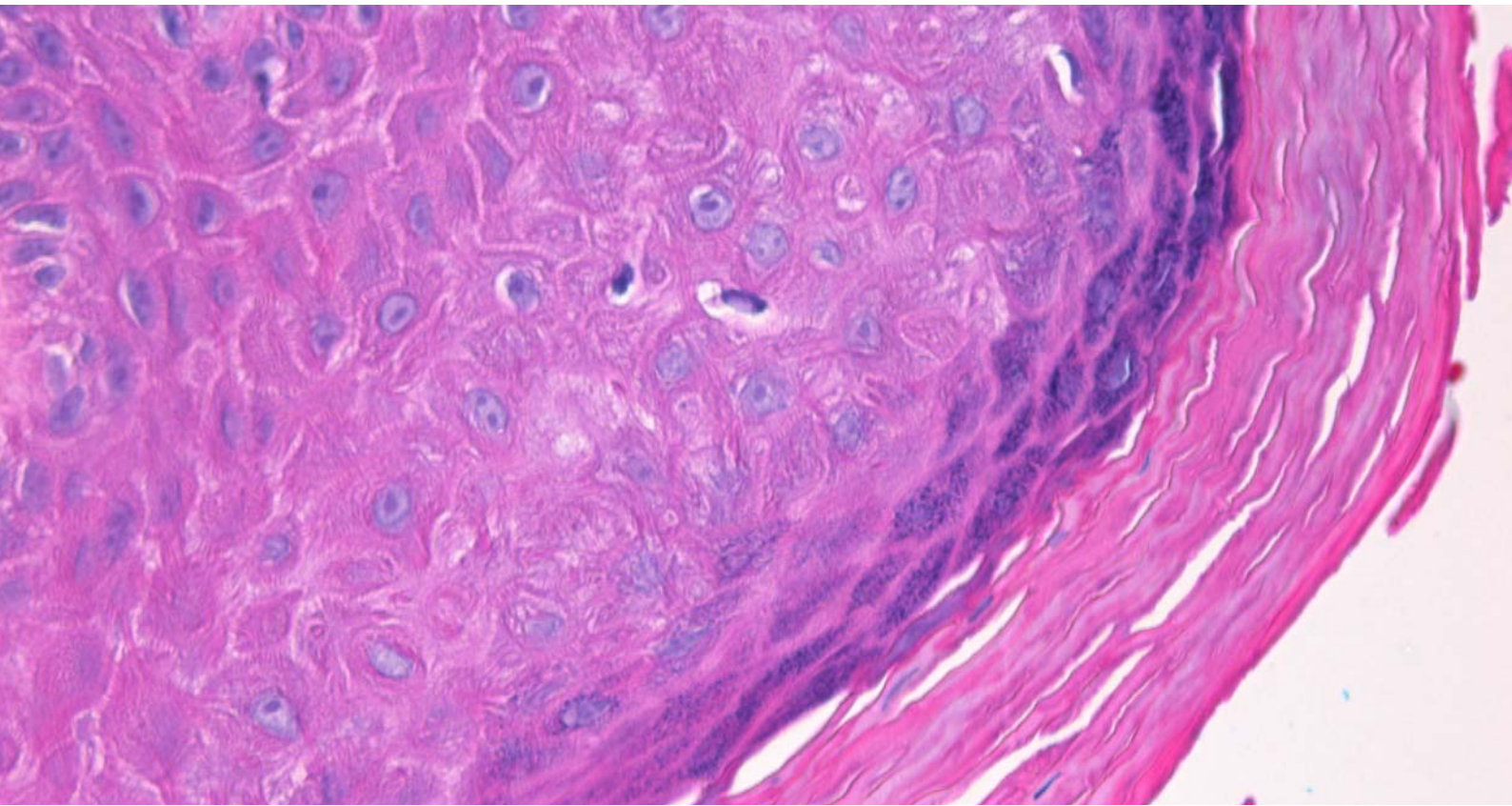


Figure 26

Coupe de peau affectée par le décalcifiant acide utilisé pour assouplir la kératine

Solutions intégrant la reconstitution et le retraitement

Solution 7 : Pour les tissus fixés entièrement desséchés qui restent flétris et durs :

Il se peut que certains échantillons soient parfois "perdus" pendant le transport ou sur la paillasse et qu'ils soient desséchés. Ceci peut également se produire en cas de dysfonctionnement du préparateur, la plupart du temps avec un préparateur à transfert de tissu où le tissu peut être exposé à l'air pour une période prolongée suite à l'immersion dans un agent déshydratant ou éclaircissant.

Chacune des méthodes suivantes intègre l'utilisation d'une "reconstitution", "restauration", ou d'un agent assouplissant. Certains de ces réactifs apparaissent dans les ouvrages de paléohistologie et de paléopathologie où ils sont utilisés pour assouplir et réhydrater les tissus momifiés²⁴⁻²⁶.

Solution 7a : Échantillons n'ayant pas été enrobés de paraffine

Explication : Si l'échantillon a séché après la fixation mais avant le traitement (comme cela peut parfois se produire quand un échantillon est "perdu" dans le couvercle d'un conteneur ou sur la paillasse) ou pendant les premières étapes du traitement, une solution de "reconstitution" ou de "restauration" peut être appliquée avant le traitement pour assouplir et réhydrater le tissu.

- Placez l'échantillon dans un important volume de la solution de reconstitution de votre choix (voir tableau 6 de l'Appendice) et laissez agir pendant une durée appropriée. Il peut être utile de remuer de temps à autre. Pour les échantillons de petite taille, une à deux heures devraient suffire. Pour les échantillons de grande taille qui ont séché sur une période prolongée, une durée de 12 à 48 heures peut être requise.
- Palpez doucement l'échantillon pour déterminer si l'assouplissement est terminé.
- Traitez l'échantillon en commençant par une étape appropriée en fonction de l'agent de restauration utilisé. Si l'agent contient de l'alcool, ignorez l'étape de fixation au formol, et commencez par la déshydratation. Utilisez un programme de traitement que vous auriez initialement considéré comme approprié à l'échantillon.

Les échantillons illustrés à la figure 27A ont été séchés dans une hotte de laboratoire pendant une semaine après la fixation. Ils ont ensuite pu être reconstitués par immersion dans du formol tamponné neutre pendant 24 heures (figure 27B). Notez que le gonflement qui s'est produit résulte de la réhydratation.



Figure 27A

Échantillons après séchage



Figure 27B

Échantillons après
reconstitution

Solution 7b : Échantillons ayant été inclus en paraffine

Explication : Si l'échantillon a séché pendant le traitement mais qu'il a été plongé dans la paraffine, il sera nécessaire de retirer la paraffine avant d'utiliser la solution de reconstitution.

- Utiliser des réactifs du cycle de nettoyage (de préférence du xylène, et non du Waxsol™) et éviter toute étape de séchage. Dissoudre la paraffine, puis replonger le tissu dans l'alcool, puis dans l'eau¹⁴. Pour le traitement, utiliser une solution de reconstitution telle qu'une solution de carbonate de sodium¹⁸, de glycérine-formol¹⁵, ou de glycérine-alcool¹⁰ (voir tableau 6 de l'Appendice), puis reprenez le traitement en commençant par une étape appropriée et en utilisant un programme que vous auriez initialement considéré comme approprié pour l'échantillon.

Solution 8 : Pour les échantillons déshydratés et éclaircis, faiblement infiltrés par la paraffine :

Explication : Il se peut que les échantillons soient retirés par inadvertance du bain de paraffine du préparateur avant la fin de l'infiltration ou qu'une durée d'infiltration inadéquate ait été utilisée pour le protocole. À condition que la déshydratation et l'éclaircissement aient été entièrement exécutés, il est possible d'utiliser la procédure suivante.

- Remplacer les cassettes dans le bain de paraffine, laisser les s'imprégner complètement, puis leur procurer au moins deux étapes de paraffine supplémentaires par vide pour une période au moins aussi longue que celle qui aurait été appropriée initialement. Reprise de l'enrobage et coupe.

Solution 9 : Pour les échantillons correctement fixés mais dont le traitement est incomplet :

Chacune de ces méthodes implique l'utilisation du préparateur de tissu. Il est essentiel que chaque problème surgissant avec l'instrument ait été résolu et que les réactifs contaminés aient été remplacés avant de procéder au retraitement. S'il est exécuté correctement, le retraitement doit permettre d'obtenir des coupes cohésives là où cela n'était pas possible auparavant. Toutefois, le résultat ne sera jamais aussi bon que celui qui aurait été obtenu si un traitement optimal avait été appliqué à l'origine.

Solution 9a : Retraitement utilisant une solution saline (méthode Taggart¹⁹)

Explication : Dans cette méthode, l'excès de paraffine est enlevé au moyen de la solution saline chaude avant de procéder au retraitement. La solution saline réhydrate le tissu en douceur, celui-ci sera retraité après cette étape. La solution saline est un réactif non toxique pouvant être utilisé en toute sécurité dans le laboratoire ouvert.

- Avant le retraitement, faire fondre chaque bloc, enlever l'excès de paraffine en procédant avec soin, puis placer les échantillons dans une cassette qui vient d'être étiquetée. Cela aura pour effet d'améliorer l'accès des réactifs de traitement aux échantillons pendant le retraitement.
- Placer les cassettes dans un bécher de solution saline isotonique (une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0.9 %) situé dans un incubateur à 65 °C pendant une heure (une heure suffit pour une gamme d'échantillons de différents types et dimensions). Ainsi, la paraffine fondra et s'élèvera à la surface de la solution saline.
- Retirer les cassettes de la solution saline, les égoutter brièvement, puis les placer dans le préparateur et les retraiter à partir du formol en utilisant un programme dont la durée aurait été initialement appropriée. Celle-ci dépendra de la taille et de la nature de l'échantillon.

Les micrographies illustrées à la figure 28 présentent le résultat pouvant être obtenu avec un retraitement utilisant la solution 9a (méthode Taggart). Pour un traitement optimal, ce grand échantillon de graisse sous-cutanée nécessiterait normalement un programme de 8 heures. Il a été intentionnellement sous-traité de manière grossière dans le cadre d'un cycle de 2 heures. La micrographie A présente la meilleure coupe ayant pu être obtenue après ce protocole inadéquat. La micrographie B a été réalisée après le retraitement impliquant une solution saline pour le retrait de la paraffine et la réhydratation, comme décrit ci-dessus, qui a été suivi d'un protocole de 8 heures puis d'une reprise de la coupe du bloc. Bien que la coupe soit maintenant cohésive et acceptable, un meilleur résultat aurait pu être obtenu si le programme correct avait été utilisé initialement.

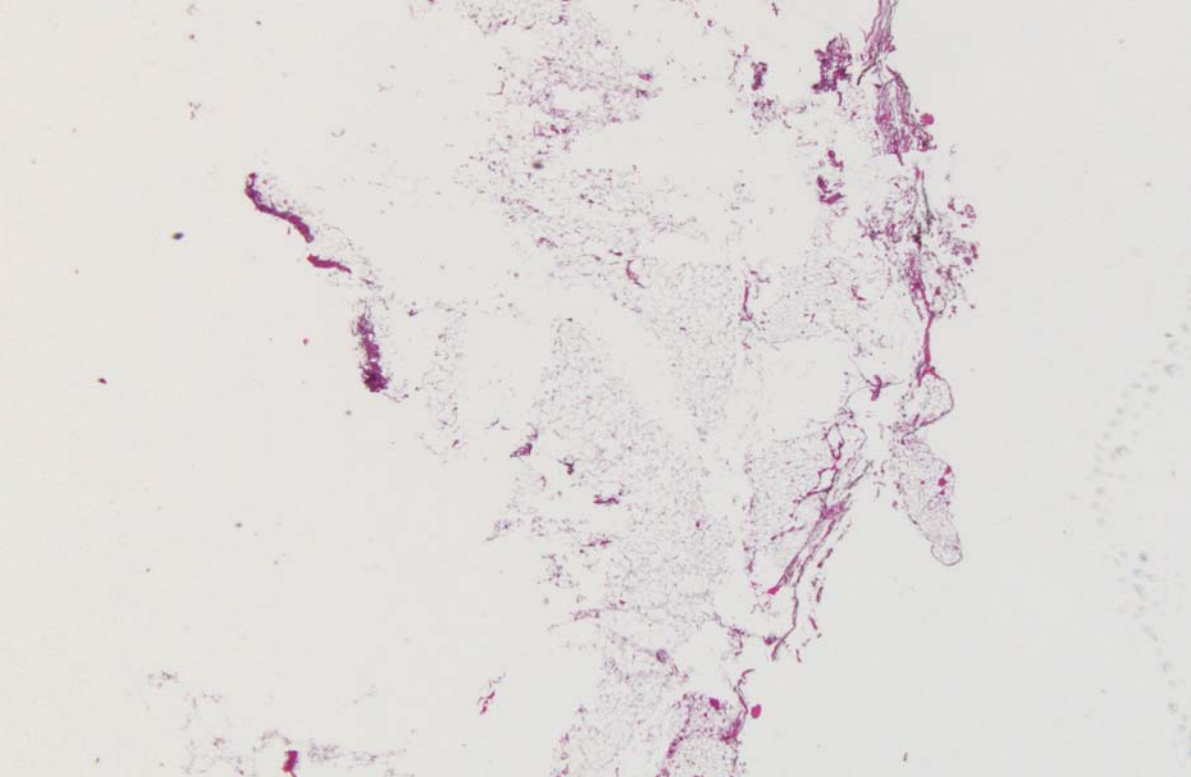


Figure 28A

Échantillon gras avant le
retraitement

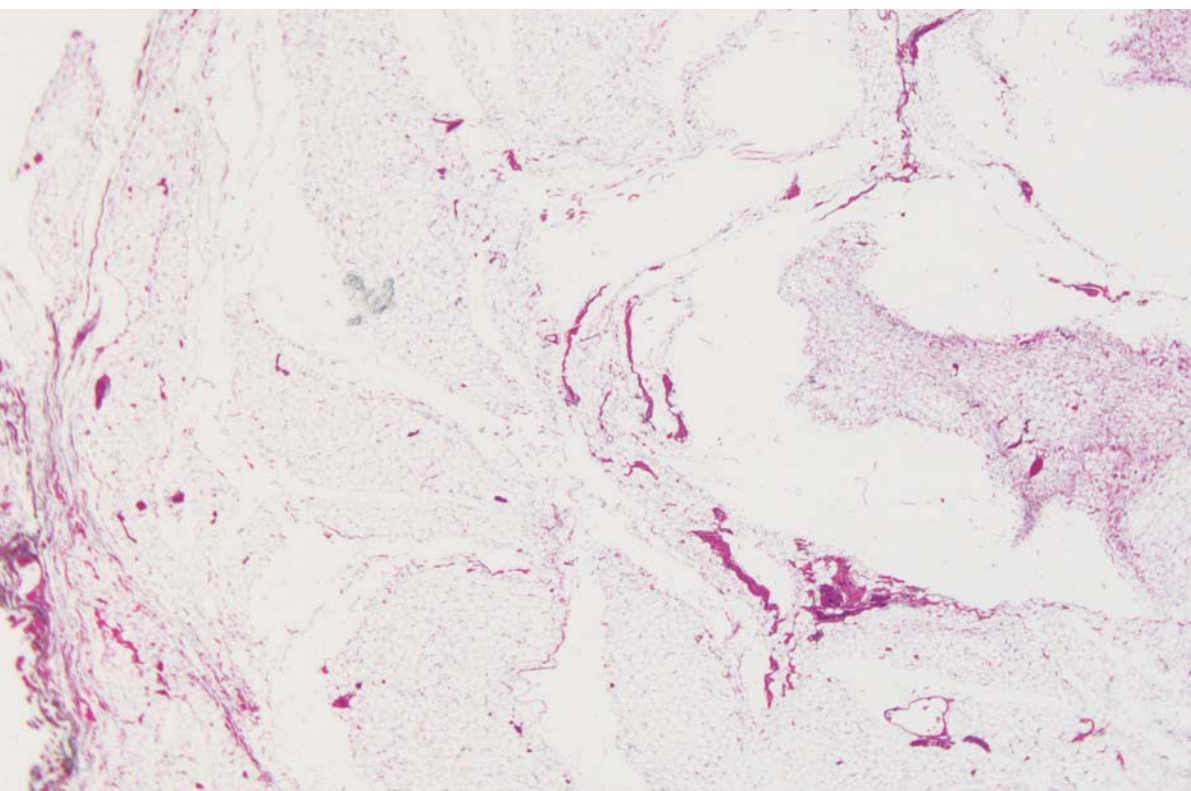


Figure 28B

Échantillon gras après le
retraitement

Solution 9b : Retraitement utilisant le cycle de nettoyage du préparateur ou une modification de celui-ci.^{13, 14}

Explication : Il s'agit d'une méthode pratique utilisant les réactifs de nettoyage pour retirer la paraffine et plonger le tissu dans l'alcool. Cette méthode est potentiellement plus rude que la solution 9a ou 9c.

- Avant le retraitement, faire fondre chaque bloc, enlever l'excès de paraffine en procédant avec soin, puis placer les échantillons dans une cassette qui vient d'être étiquetée. Cela aura pour effet d'améliorer l'accès des réactifs de traitement aux échantillons pendant le retraitement.
- Placer les cassettes dans un panier, à l'intérieur du préparateur de tissu.
- Démarrer le cycle de nettoyage (purge) du préparateur ou une modification de celui-ci, utilisant les réactifs de nettoyage (voir le tableau 2). Il vaut mieux utiliser du xylène au lieu du Waxsol™ car son action est légèrement plus douce. Cela permettra de replonger l'échantillon dans du xylène, plusieurs changements d'alcool étant également effectués. Il est important **de ne pas laisser le tissu entrer dans une phase de séchage** pouvant faire partie du cycle de nettoyage (comme c'est le cas avec le protocole standard de "nettoyage rapide" du Peloris). Le programme devrait être abandonné avant que cette étape soit atteinte. Il est donc capital de charger sur le préparateur un nouveau protocole, tel que celui présenté ci-dessous.

Tableau 2. Protocole de retraitement rapide pour le préparateur de tissu rapide Leica Peloris™ utilisant des réactifs de nettoyage

N° d'étape	Type de réactif	Temps (min)	Temp. (°C)	P/V	Agitateur	Temps d'égouttage (s)
1	Solvant de nettoyage	12	65	Amb	Élevé	10
2	Éthanol de nettoyage	6	55	Amb	Élevé	10
	Durée de l'étape	18:00				
	Durée du traitement	22:00				

Les échantillons doivent désormais être dans l'alcool, prêts à être retraités.

- Pour le retraitement, utiliser du formol ou de l'alcool et un programme dont la durée aurait été appropriée initialement. Celle-ci dépendra de la taille et de la nature de l'échantillon. Pour des questions pratiques, il peut être préférable de conserver vos échantillons dans du formol et de les traiter avec votre prochain chargement d'échantillons complet.

Les micrographies illustrées à la figure 29 présentent le résultat pouvant être obtenu avec un retraitement utilisant la solution 9b (réactifs du cycle de nettoyage). Pour un traitement optimal, ce grand échantillon de graisse sous-cutanée nécessiterait normalement un programme de 8 heures. Il a été intentionnellement sous-traité de manière grossière dans le cadre d'un cycle de 2 heures. La figure 29A présente la meilleure coupe ayant pu être obtenue après ce protocole inadéquat. La figure 29B a été réalisée après le retraitement impliquant un cycle de nettoyage court modifié (décrit ci-dessus), suivi d'un protocole de 8 heures, puis d'une reprise de la coupe du bloc. Bien que la coupe soit maintenant cohésive et acceptable, un meilleur résultat aurait pu être obtenu si le programme correct avait été utilisé initialement.

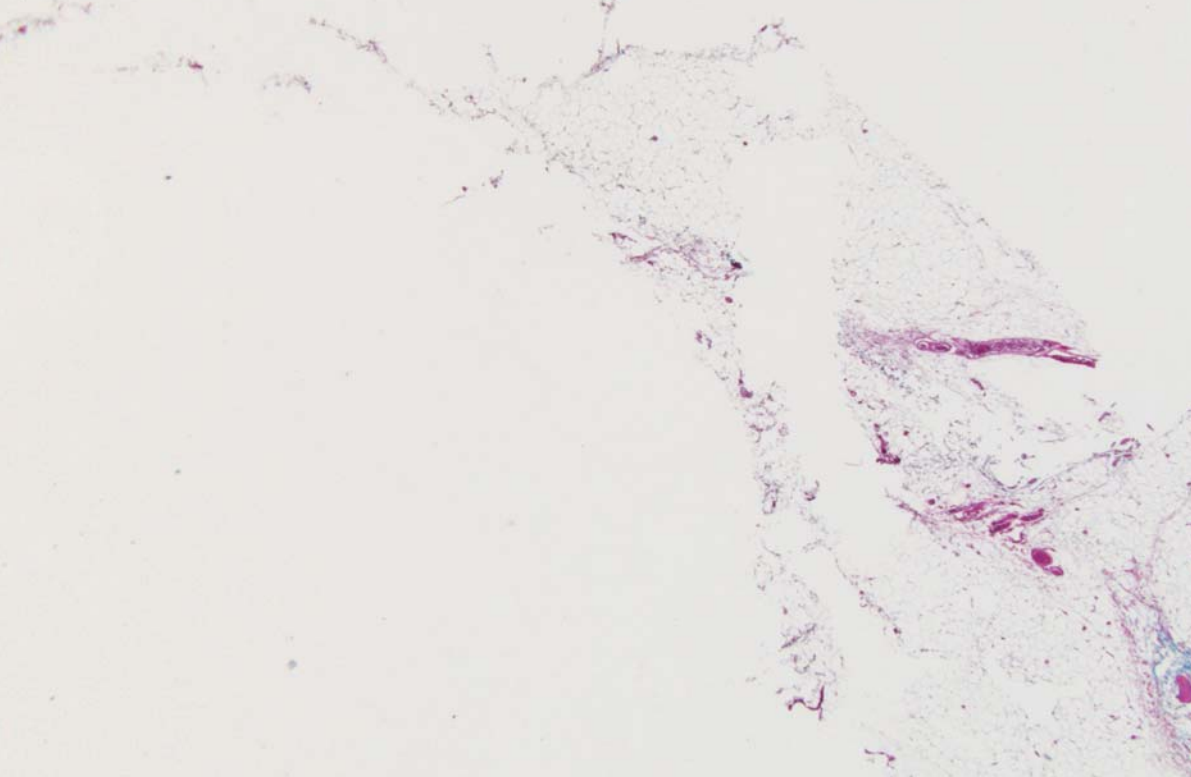


Figure 29A

Échantillon gras avant le
retraitement

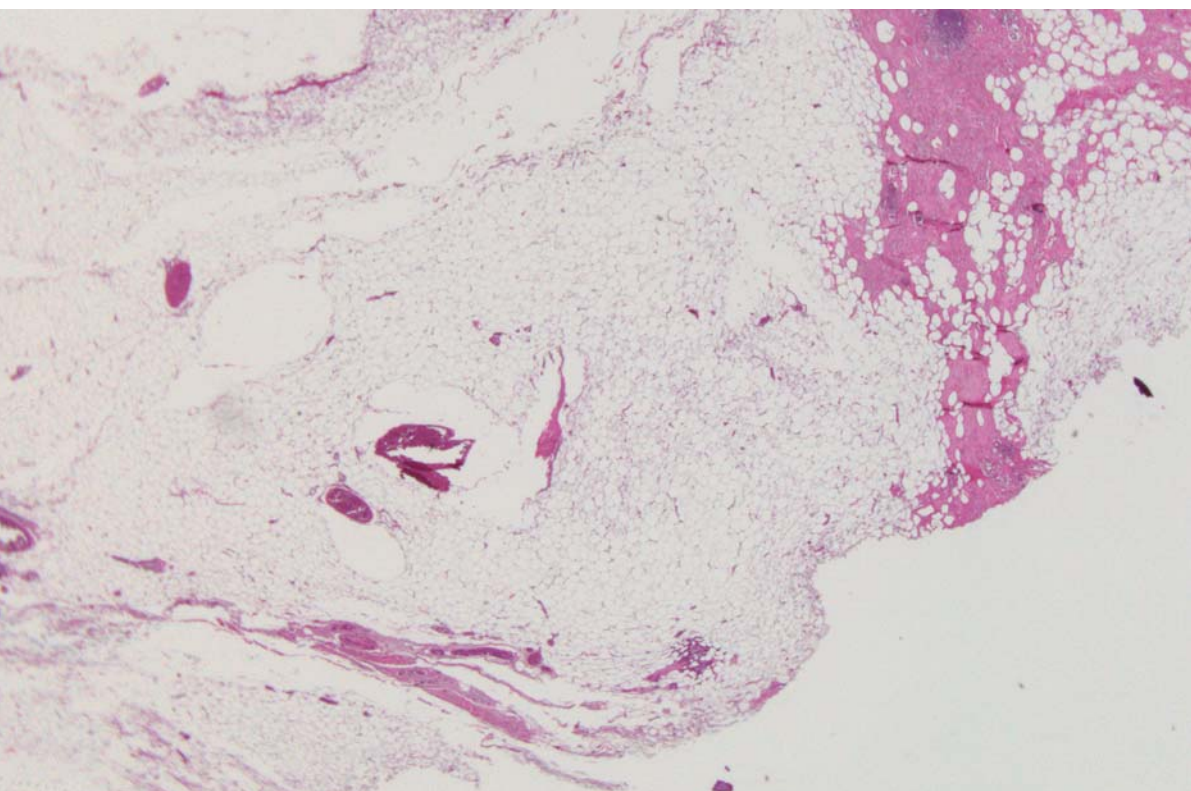


Figure 29B

Échantillon gras après le
retraitement

Solution 9c : Retraitement direct¹³

Explication : Cette méthode ne requiert aucun traitement préalable avant le retraitement. Les parties de l'échantillon ayant déjà été traitées initialement de façon adéquate subissent une petite déshydratation supplémentaire dans l'alcool mais un éclaircissement et une infiltration de paraffine supplémentaires sont également fournis. Les zones mal traitées sont soumises à une étape supplémentaire de fixation, de déshydratation, d'éclaircissement et d'infiltration. Cette technique présente l'inconvénient potentiel d'entraîner une contamination par la paraffine du préparateur et des réactifs de traitement.

- Avant le retraitement, faire fondre chaque bloc, enlever l'excès de paraffine en procédant avec soin, puis placer les échantillons dans une cassette qui vient d'être étiquetée. Cela aura pour effet d'améliorer l'accès des réactifs de traitement aux échantillons pendant le retraitement.
- Placer les cassettes dans un panier, à l'intérieur du préparateur de tissu.
- Pour le retraitement, utiliser du formol ou de l'alcool et un programme dont la durée aurait été appropriée initialement. Celle-ci dépendra de la taille et de la nature de l'échantillon. Pour des questions pratiques, il peut être préférable de conserver vos échantillons dans du formol et de les traiter avec votre prochain chargement d'échantillons complet.

Les micrographies illustrées à la figure 30 présentent le résultat pouvant être obtenu avec un retraitement utilisant la solution 9c (retraitement direct). Pour un traitement optimal, ce grand échantillon de graisse sous-cutanée nécessiterait normalement un programme de 8 heures. Il a été intentionnellement sous-traité de manière grossière dans le cadre d'un cycle de 2 heures. La figure 30A présente la meilleure coupe ayant pu être obtenue après ce protocole inadéquat. La figure 30B a été réalisée après le retraitement direct (décrit ci-dessus), suivi d'un protocole de 8 heures, puis d'une reprise de la coupe du bloc. Bien que la coupe soit maintenant cohésive et acceptable, un meilleur résultat aurait pu être obtenu si le programme correct avait été utilisé initialement.

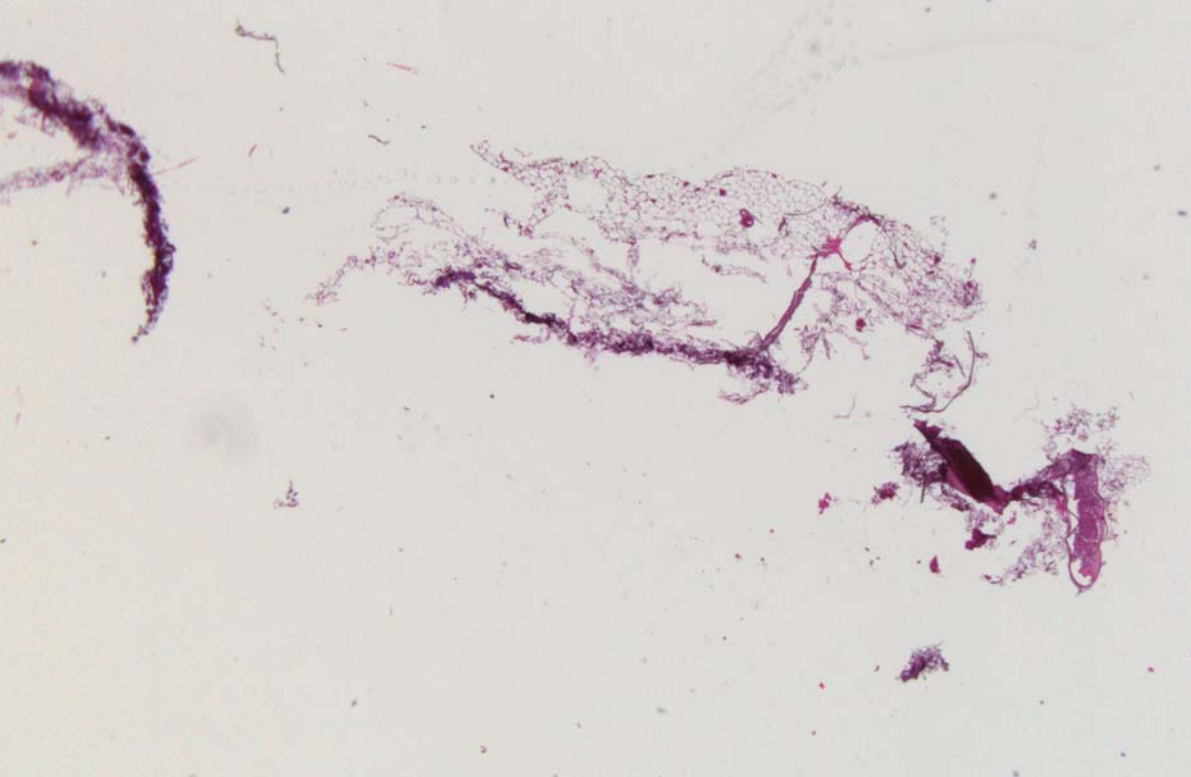


Figure 30A

Échantillon gras avant le
retraitement

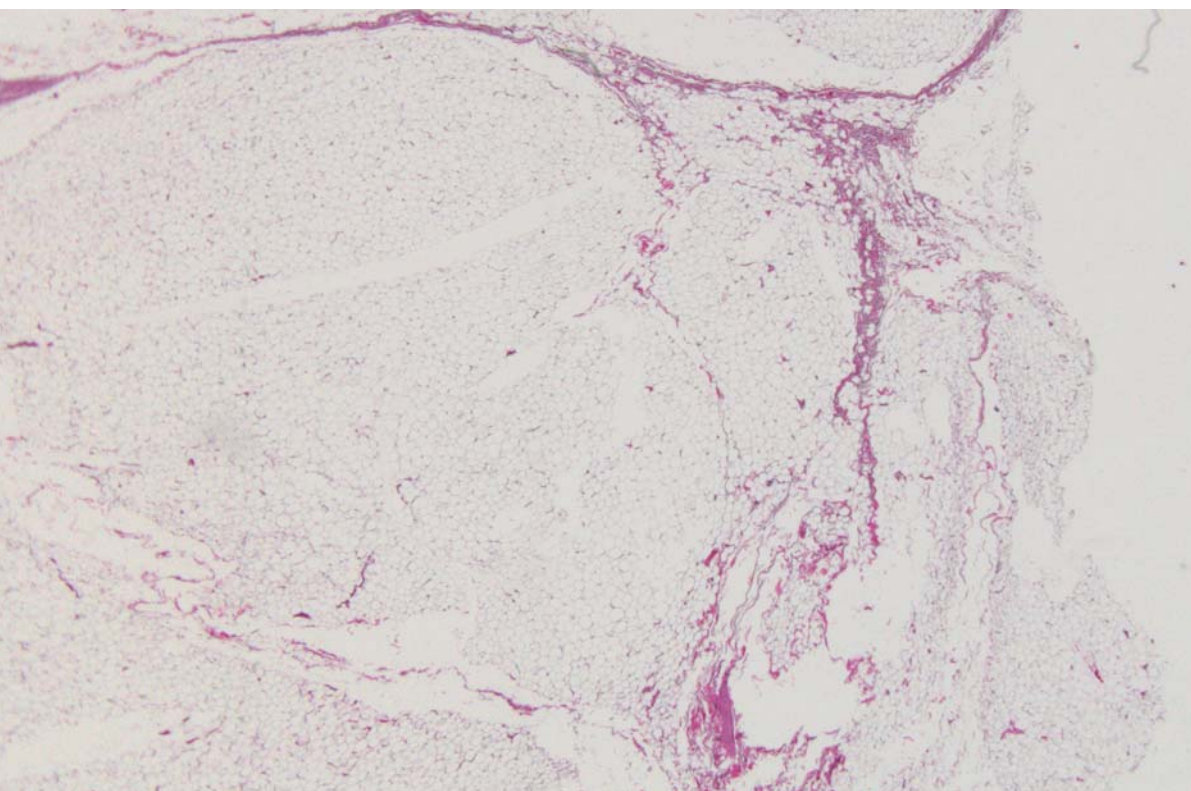


Figure 30B

Échantillon gras après le
retraitement

Solution 9d : Traitement inverse lent

Explication : Cette méthode de retraitement dure plus longtemps que les autres méthodes mais constitue probablement la méthode la plus douce et la plus complète parmi toutes les options présentées. Elle implique les étapes suivantes : repasser l'échantillon lentement par l'agent éclaircissant afin de retirer toute la paraffine, retirer entièrement l'agent éclaircissant par l'alcool, puis terminer la réhydratation de l'échantillon. L'échantillon est ensuite traité en profondeur via un programme qui aurait été approprié initialement.

- Avant le retraitement, faire fondre chaque bloc, enlever l'excès de paraffine en procédant avec soin, puis placer les échantillons dans une cassette qui vient d'être étiquetée. Cela aura pour effet d'améliorer l'accès des réactifs de traitement aux échantillons pendant le retraitement.
- Placer les cassettes dans un panier, à l'intérieur du préparateur de tissu.
- Exécuter un cycle de traitement inverse modifié, tel que celui qui est présenté dans le tableau 3 ci-dessous. Il fera repasser les échantillons par le xylène ou du Waxsol™, plusieurs changements d'alcool étant également réalisés. Le programme présenté devrait convenir aux échantillons dont la taille et la nature permettraient normalement un traitement réussi en six à huit heures. Le programme devrait être revu à la baisse (réduit) pour les échantillons de taille inférieure.

Tableau 3. Protocole de traitement inverse pour le préparateur de tissu Peloris

N°	Type de réactif	Temps (min)	Temp. (°C)	P/V	Agitateur	Temps d'égouttage (s)
1	Solvant de nettoyage	60	Amb	Amb	Élevé	10
2	Solvant de nettoyage	60	Amb	Amb	Élevé	10
3	Éthanol de nettoyage	60	Amb	Amb	Élevé	10
4	Éthanol de nettoyage	60	Amb	Amb	Élevé	10
	Durée de l'étape	240				
	Durée du traitement	248				

Les échantillons sont rincés dans une solution d'éthanol à 70 % pendant 15 minutes avant de procéder au retraitement.

- Pour le retraitement, utiliser du formol ou de l'alcool et un programme dont la durée aurait été appropriée initialement. Celle-ci dépendra de la taille et de la nature de l'échantillon. Pour des questions pratiques, il peut être préférable de conserver vos échantillons dans du formol et de les traiter avec votre prochain chargement d'échantillons complet.

Les micrographies illustrées à la figure 31 présentent le résultat pouvant être obtenu avec un retraitement utilisant la solution 9d (traitement inverse lent). Pour un traitement optimal, ce grand échantillon de foie de porc nécessiterait normalement un programme de 8 heures. Il a été intentionnellement sous-traité de manière grossière dans le cadre d'un cycle de 2 heures. La figure 31A présente la meilleure coupe ayant pu être obtenue après ce protocole inadéquat.

La figure 31B a été réalisée après le retraitement utilisant le traitement inverse présenté dans le tableau 3 ci-dessus, suivi d'un protocole de 8 heures, puis d'une reprise de la coupe. Bien que la coupe soit désormais cohésive et acceptable, certaines lésions morphologiques causées par le sous-traitement grossier persistent.

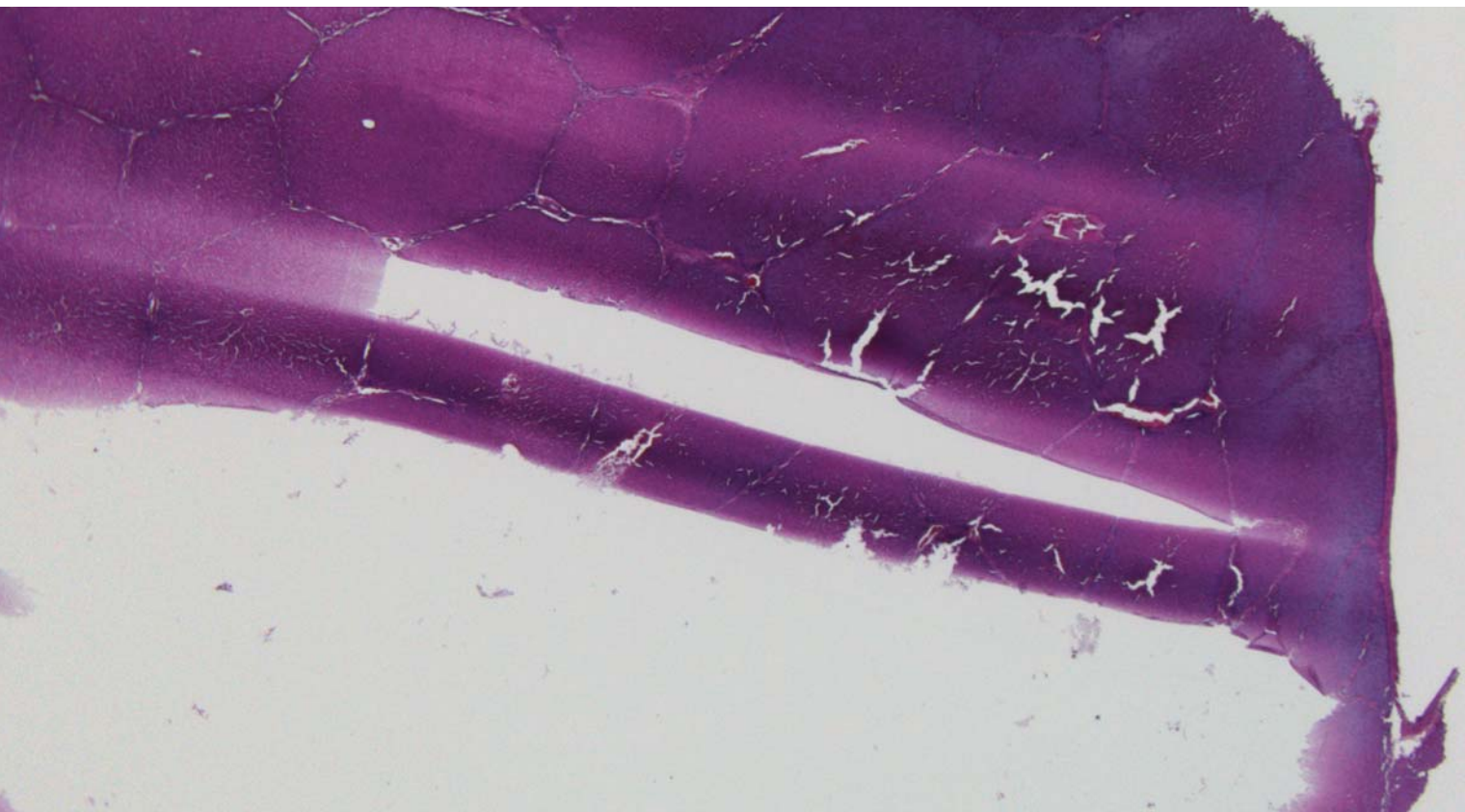


Figure 31A

Échantillon de foie avant le
retraitement

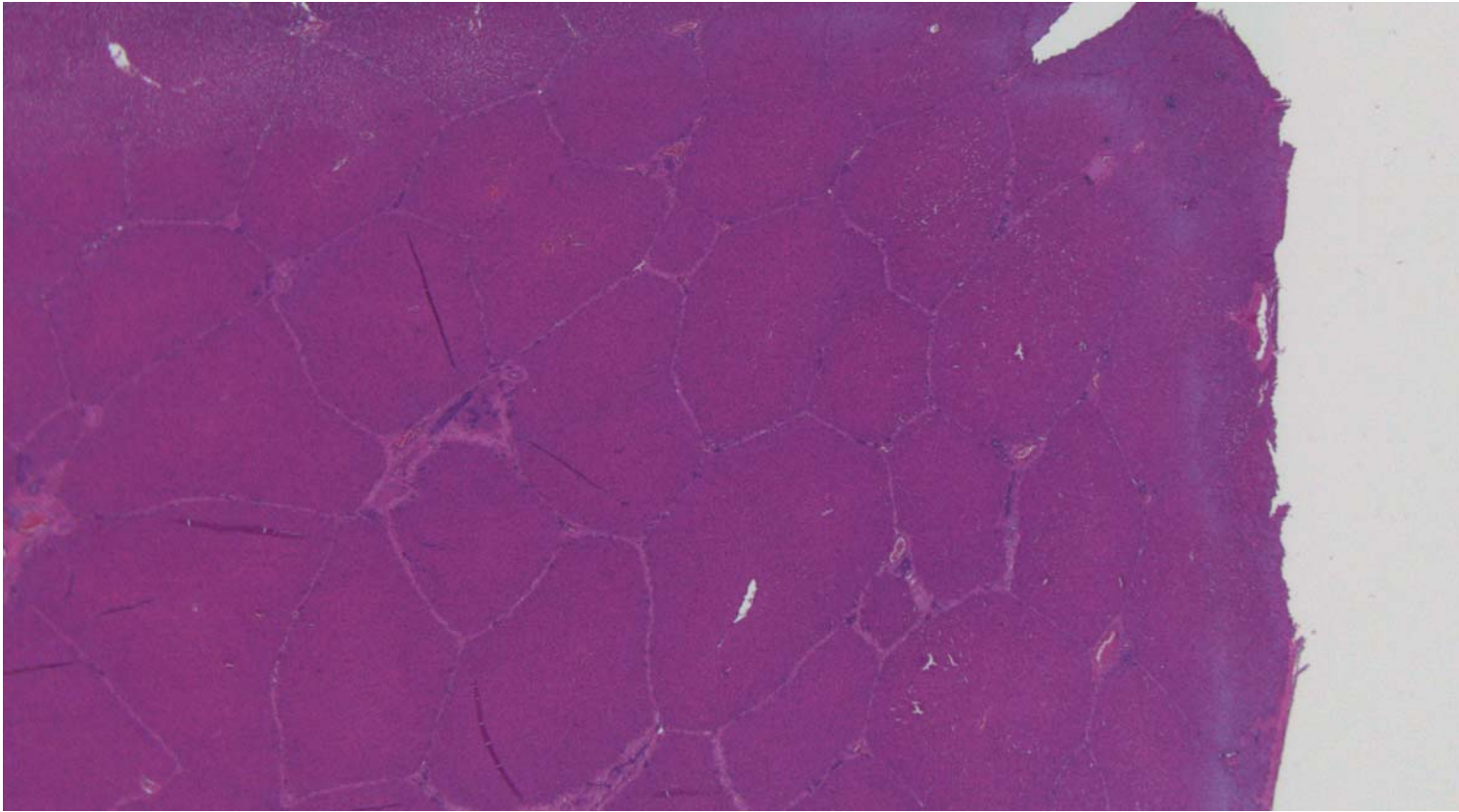


Figure 31B

Échantillon de foie après le
retraitement

Solution 9e : Traitement inverse lent avec étape de reconstitution

Explication : Cette méthode est la plus longue de toutes, mais elle est efficace dans les cas extrêmes où la coloration a été affectée par la contamination des réactifs (telle que la contamination des échantillons par le formol lorsqu'ils sont dans la paraffine). Bien qu'elle ne puisse pas rattraper les lésions morphologiques subies lors du premier traitement, elle permet d'obtenir des coupes cohésives et une meilleure coloration H&E. Cette méthode est identique à la méthode 9d décrite ci-dessus, mais inclut une étape supplémentaire. Après la réhydratation et avant le retraitement, les échantillons sont traités pendant une période de 2 heures jusqu'à une nuit entière avec un agent de reconstitution tel que la solution Leica BOND ER2™ (solution de récupération d'épitope), une solution tampon de Tris à pH 10.2, ou plus doux avec une solution saline isotonique ou de formol tamponné neutre à 10 %. Cela contribuera à rétablir, dans une large mesure, l'éosinophilie normale du tissu.

- Procéder comme pour la solution 9d ci-dessus jusqu'à ce que l'échantillon soit dans une solution d'éthanol à 70 %.
- Le plonger dans un grand volume de solution de reconstitution à 65 °C pendant une période de 2 heures jusqu'à une nuit entière selon la taille et la nature de l'échantillon. Les échantillons de petite taille ne requièrent que 2 heures à température ambiante.
- Pour le retraitement, utiliser du formol ou de l'alcool et un programme dont la durée aurait été appropriée initialement.

L'artefact présenté à la figure 32A a été produit par la contamination intentionnelle d'un échantillon avec du formol juste avant de l'infiltrer par la paraffine lors d'un protocole qui serait normalement approprié. Dans ce cas, la "teinte bleue" et le noyau diffus sont une conséquence directe de la contamination par le formol. Cet effet peut être observé sur les tissus grossièrement sous-traités ou, il peut être, dans de rares cas, la conséquence d'un dysfonctionnement du préparateur qui fait pénétrer le formol dans la chambre de réaction pendant l'infiltration de la paraffine. La figure 32B a été réalisée après le retraitement de l'échantillon utilisant un traitement inverse associé à une étape de reconstitution (solution 9e utilisant la solution de récupération d'épitope 2 pH 9.0 BOND™), suivi d'un traitement. Bien que la lésion morphologique persiste, une amélioration de la qualité de la coupe et de la coloration est constatée.

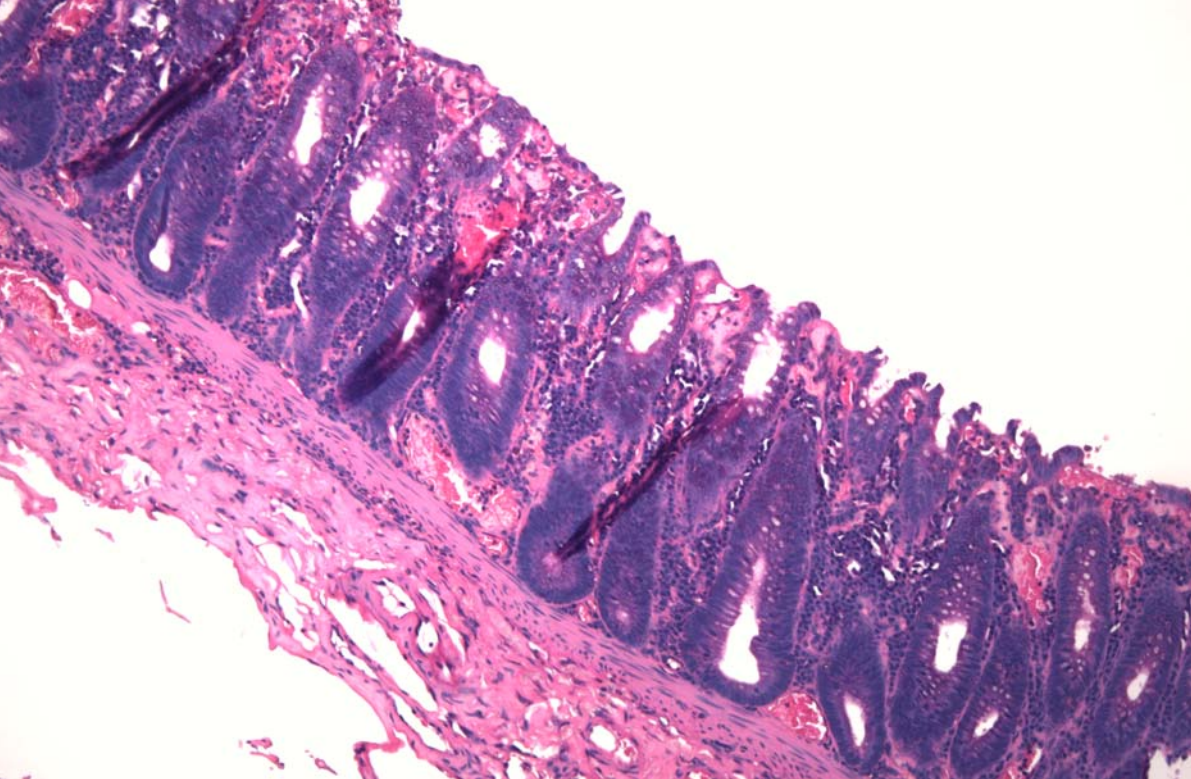


Figure 32A

Coupe de muqueuse avec
artefact produit par une
contamination au formol

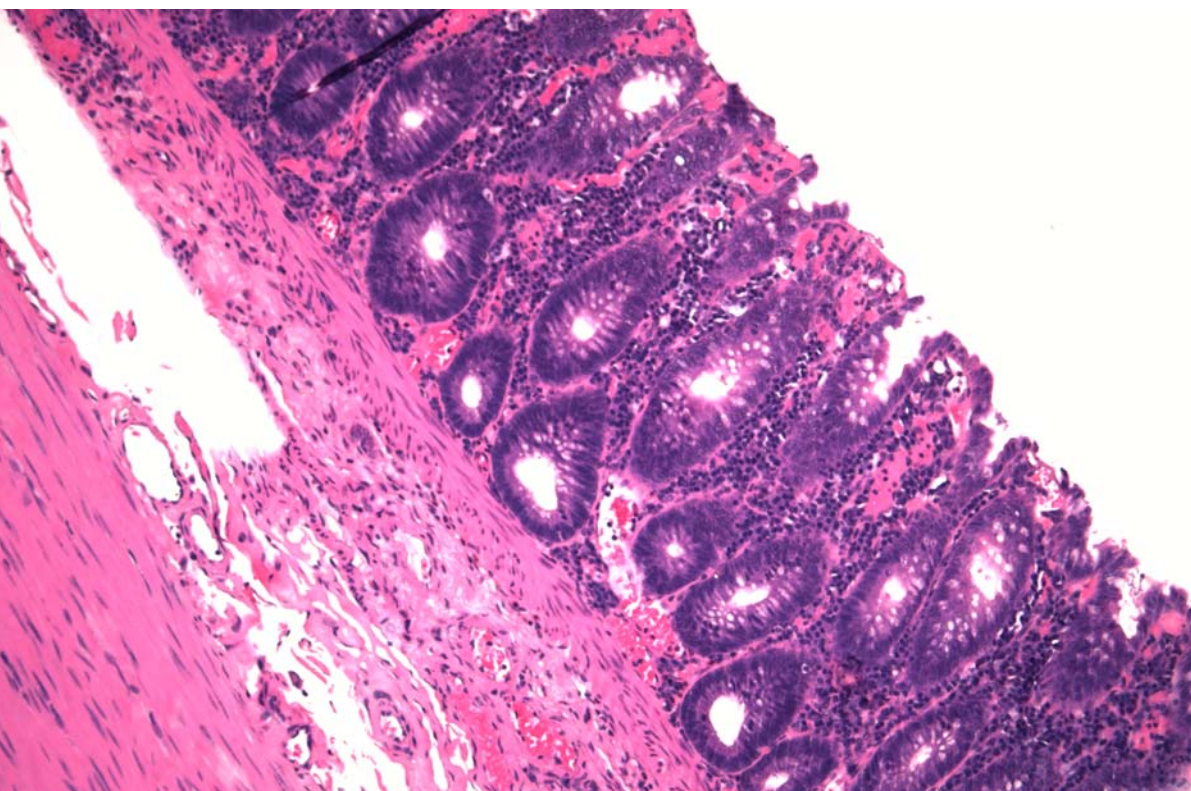


Figure 32B

Coupe de muqueuse après
reconstitution et retraitement

Solution 10 : Pour les échantillons mal fixés et dont le traitement est incomplet :

Explication : Les tissus non fixés ou mal fixés seront endommagés par la préparation. L'alcool et les températures élevées exercent un effet fixateur propre qui est différent de celui du formol. Un tissu non fixé est mal stabilisé et donc plus susceptible de durcir et de se rétracter qu'un tissu fixé correctement. Une mauvaise fixation associée à un sous-traitement pose donc un problème majeur. Un retraitement doux intégrant une fixation supplémentaire constitue probablement le meilleur compromis. La méthode suivante est basée sur la méthode Taggart¹⁹ qui est l'une des techniques les plus douces parmi celles que nous avons décrites.

- Avant le retraitement, faire fondre chaque bloc, enlever l'excès de paraffine en procédant avec soin, puis placer les échantillons dans une cassette qui vient d'être étiquetée. Cela aura pour effet d'améliorer l'accès des réactifs de traitement aux échantillons pendant le retraitement.
- Placer les cassettes dans un bécher de solution saline isotonique (une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0.9 %) situé dans un incubateur à 65 °C pendant une heure¹⁹. Ainsi, la paraffine fondra et s'élèvera à la surface de la solution saline.
- Retirer les cassettes de la solution saline et les placer dans du formol tamponné neutre à 10 % pour une période additionnelle. Il ne faut pas oublier que les échantillons sont peut-être déjà partiellement fixés avec le formol et les alcools utilisés précédemment, mais la fixation supplémentaire au formol peut procurer certains avantages. Cette étape doit être exécutée sur votre préparateur.
- Pour le retraitement, utiliser du formol et un programme dont la durée aurait été appropriée initialement. Celle-ci dépendra de la taille et de la nature de l'échantillon.

L'artefact illustré à la figure 33A a été produit par la sous-fixation et le sous-traitement grossier intentionnels d'un échantillon de pancréas. Le bloc était très difficile à couper, il manquait une zone centrale. Les zones de tissu intactes présentaient une morphologie cellulaire très médiocre avec des détails nucléaires manquants (noyau diffus) et laissaient apparaître un voile bleu brillant ("teinte bleue"). La texture cytoplasmique était médiocre et les bords de cellules mal définis. Les cellules sont gonflées.

La figure 33B a été réalisée à partir d'un échantillon après retraitement selon la technique mise en évidence dans la solution 10 (méthode Taggart avec fixation additionnelle). Bien que la morphologie soit meilleure que celle des autres coupes et que la "teinte bleue" ait été partiellement éliminée, un certain effet de craquellement et de rétraction persiste. Le résultat n'est pas aussi bon qu'il aurait pu être avec une fixation appropriée et un programme correct appliqués dès le début.

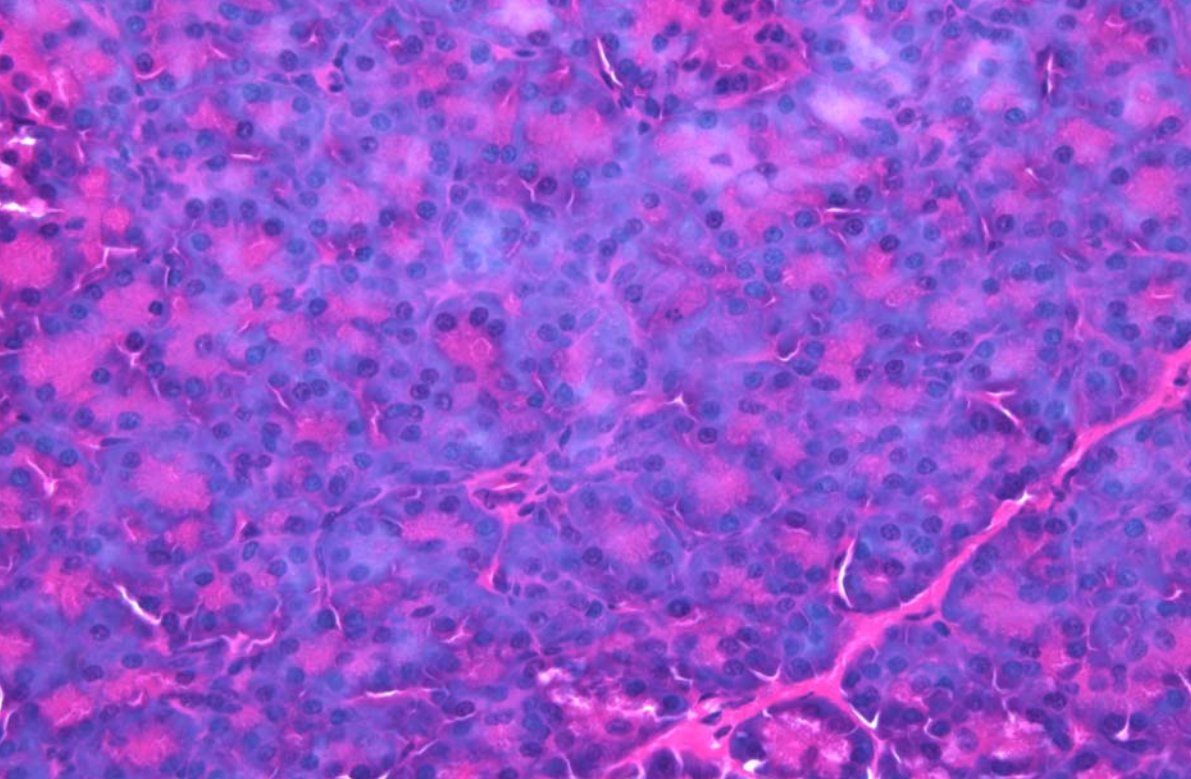


Figure 33A

Pancréas présentant des artefacts de sous-fixation et de sous-traitement

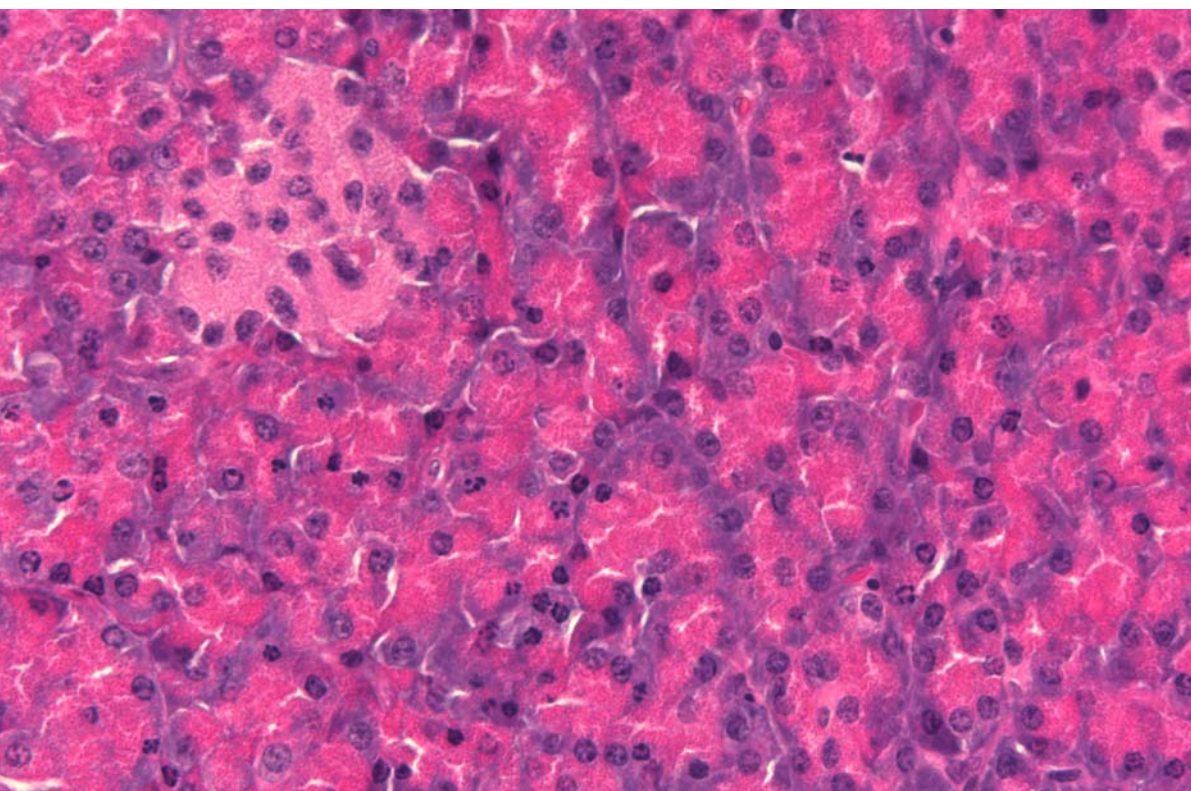


Figure 33B

Pancréas après le retraitement

Partie 4

Causes premières

La cause première des problèmes de traitement et leur prévention

La cause première des problèmes de traitement et leur prévention

Un laboratoire qui rencontre un échantillon ou un lot d'échantillons ne pouvant fournir de coupe satisfaisante est confronté à un sérieux problème. Cela peut en effet retarder le rapport histologique ou, dans le pire des cas, empêcher toute réalisation du diagnostic.

Cette situation crée une pression considérable car ce problème doit être résolu. Une décision à court-terme implique de connaître les "ficelles du métier" afin d'obtenir des coupes à partir de blocs mal préparés ou si cela ne fonctionne pas, il peut être nécessaire de retraiter l'échantillon.

Dans ces circonstances, il est important de bien réfléchir afin de décider de la meilleure ligne de conduite à adopter.

Quand un problème surgit, la première réaction du personnel du laboratoire est parfois de "blamer le préparateur". Il est vrai que les préparateurs présentent quelques fois des dysfonctionnements mais l'expérience nous montre en d'autres occasions que le problème résulte d'une erreur humaine. Peu importe l'origine du problème, une évaluation complète et objective doit avoir lieu. Il faut surtout éviter d'avoir tendance à tirer des conclusions hâtives et injustifiées quant à la cause du problème.

Des conclusions hâtives

Dans l'exemple illustré à la figure 34, le personnel du laboratoire pensait que le problème était lié au préparateur de tissu. Plusieurs coupes réalisées à partir d'un lot de biopsies endoscopiques présentaient des zones distinctes faisant apparaître une préservation nucléaire médiocre et un noyau diffus, indiqués par les flèches dans la figure 34A. Un examen attentif des coupes adjacentes sur la même lame (figure 34B) a permis de déterminer que le problème n'était pas lié au traitement mais à un retrait incomplet de la paraffine avant la coloration. Ceci était dû à une contamination du xylène sur un système de coloration automatisé. Dans ce cas, une évaluation plus approfondie du problème aurait évité un stress considérable au personnel. Pour plus de détails sur ce problème, veuillez vous référer à la rubrique "noyau diffus" dans la partie 2.

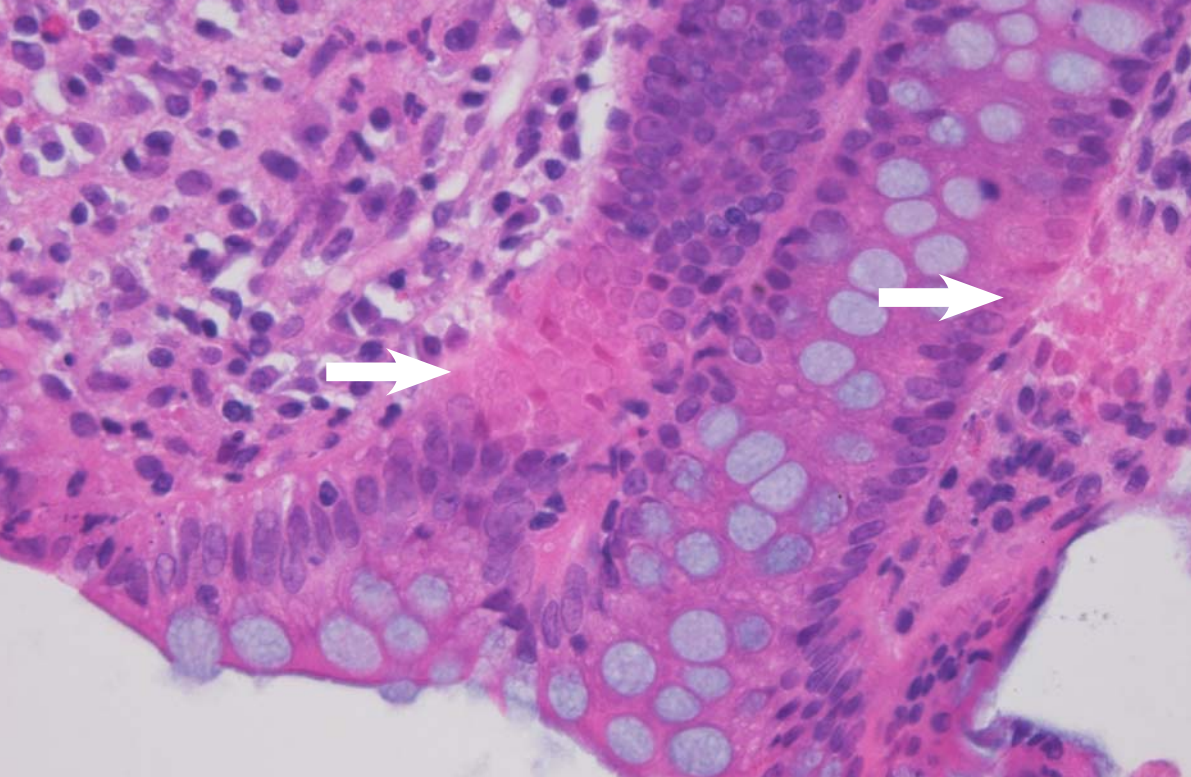


Figure 34A

Artefact de traitement
apparent dans la biopsie
endoscopique

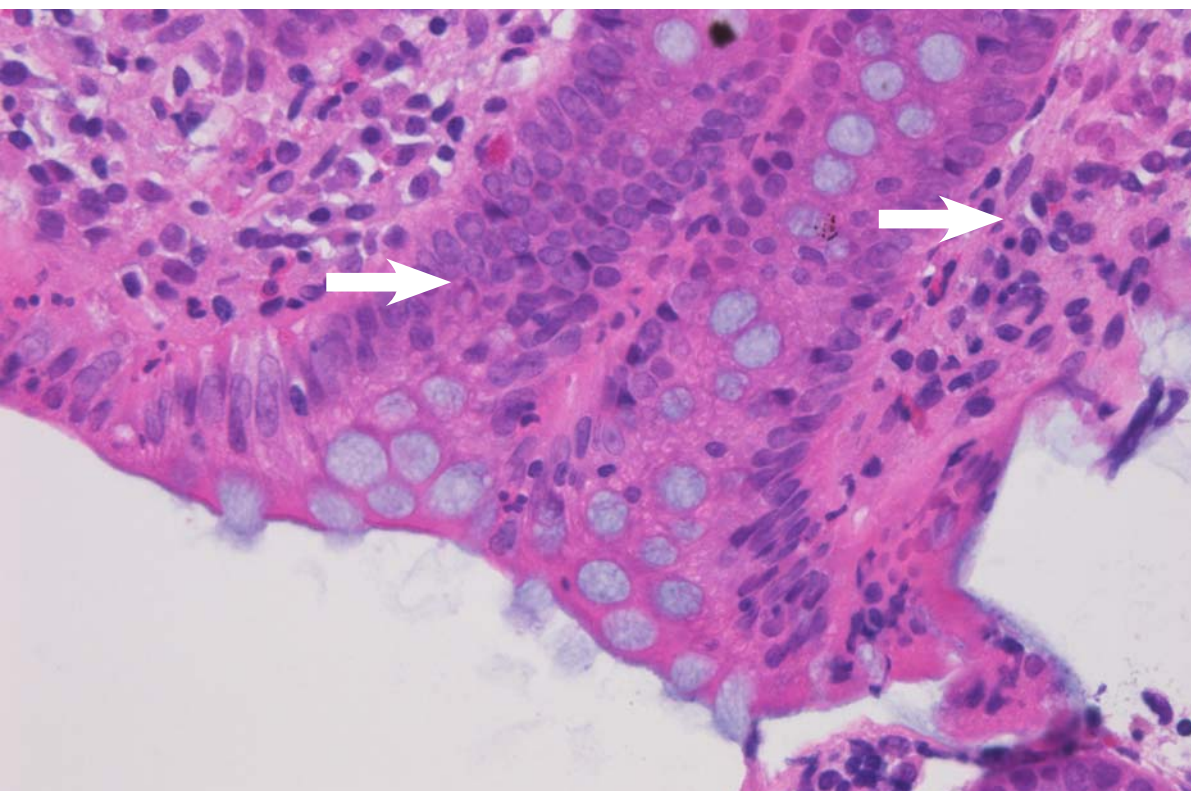


Figure 34B

La même zone dans une
coupe adjacente

Outre la résolution immédiate du problème auquel le laboratoire est confronté, il est essentiel d'en découvrir la cause et de procéder aux modifications appropriées pour éviter que le problème ne se reproduise.

Un examen opportun s'impose donc. Si vous n'avez pas paramétré ou chargé le préparateur vous-même, il vous faudra en discuter avec la personne qui s'en est chargée tant que les événements sont encore frais dans les mémoires. Si le problème découle probablement d'une défaillance matérielle ou logicielle du préparateur, il faut réclamer, dès que possible, l'assistance du fournisseur de l'instrument. Dans la mesure où ils sont disponibles, les journaux de l'instrument peuvent fournir des informations précieuses sur les problèmes rencontrés.

Les effets et certaines causes liées à un traitement médiocre sont traités dans la section suivante.

Les effets d'un traitement médiocre

Un traitement médiocre entraîne à la fois des effets "macro" et "micro" sur le bloc de l'échantillon.

Les effets dits "macro" comprennent :

Une préparation de coupe difficile

- Le bloc présente une texture médiocre (trop dure, friable ou molle)
- Le bloc n'est pas uniforme (intérieur différent de l'extérieur)
- Le bloc n'est pas cohésif (éléments séparés)
- Coupes comprimées (le tissu n'est pas maintenu correctement)
- Formation du ruban médiocre (les coupes se détachent facilement)

Flottation et montage difficiles

- Les coupes suent sur le bain d'eau (zones translucides ou "mouillées")
- Les composants se séparent sur le bain d'eau (peuvent même "exploser")
- Il est impossible d'aplatir les coupes (même quand le bloc est froid)

Le bloc se détériore lors du stockage

- Les échantillons se rétractent dans le bloc (en raison de l'évaporation du solvant)
- Les blocs contiennent des morceaux opaques (en raison de la présence d'eau)

Les effets dits "micro" comprennent :

Qualité physique médiocre des coupes

- Les coupes sont désorganisées (grandes déchirures, zones manquantes)
- Les coupes adhèrent mal aux lames
- Les coupes sont fissurées (fissures grossières et fines, "terre craquelée")
- Les coupes sont d'épaisseur inégale (dans une seule et même coupe)

Morphologie médiocre (préservation du tissu)

- Détail nucléaire médiocre (voir partie 2 pour plus d'informations sur le noyau diffus')
- Détail cytoplasmique médiocre
- Certaines caractéristiques spéciales peuvent être désorganisées (par ex. membranes basales)
- Éléments fibreux mal préservés (collagène, réticuline, élastine)
- La préservation de l'échantillon n'est pas uniforme (extérieur par rapport à l'intérieur)
- Coloration médiocre
- Coloration non uniforme (à travers la coupe)
- Coloration nucléaire médiocre¹ (noyau diffus et/ou "teinte bleue présente", voir partie 2 pour plus d'informations)
- Coloration cytoplasmique médiocre
- Démonstration médiocre des composants extracellulaires

Les causes d'un traitement médiocre

Les causes les plus courantes à l'origine de la qualité médiocre des blocs sont les suivantes :

1. Le tissu n'a pas été fixé correctement avant le traitement (temps de fixation trop court, échantillon trop grand, échantillon fermé, etc.). Malheureusement, le personnel de laboratoire a un contrôle limité sur les étapes initiales de la fixation des échantillons chirurgicaux. Généralement, c'est seulement après l'arrivée des échantillons au laboratoire que des mesures sont prises pour optimiser la fixation. Cette étape est particulièrement importante pour les échantillons de grande taille qui doivent être sectionnés ou ouverts pour permettre au fixatif d'accéder au tissu. Après le montage des échantillons, une fixation supplémentaire peut être appliquée pendant la première étape du traitement. Celle-ci peut être très efficace. Il ne faut pas oublier qu'un tissu qui n'a pas été complètement fixé par le formol initialement, sera fixé par l'éthanol pendant le traitement. Ceci peut entraîner une fixation "par zones" et une morphologie insatisfaisante.
2. Les échantillons sont trop épais pour le protocole sélectionné. Ceci peut poser problème quand un personnel inexpérimenté monte des échantillons, en particulier avec les tissus denses tels que l'utérus. Durant le temps programmé pour les étapes de traitement, les solvants n'ont pas suffisamment de temps pour pénétrer jusqu'au centre de l'échantillon, ce qui signifie que l'infiltration de la paraffine ne sera pas complète et que le bloc ne se coupera pas. Les meilleurs résultats s'obtiennent à partir de coupes de tissus entre 3 et 4 mm d'épaisseur.
3. Le tissu est trop dense pour le protocole sélectionné. Certains tissus sont pénétrés très lentement par les fixatifs et les réactifs de traitement en raison de leur densité. Les tissus fibro-musculaires, les os et cartilages décalcifiés, la kératine et les ongles ou la chitine sont tous des exemples de tissus denses et, même quand ils sont coupés finement, la pénétration peut prendre davantage de temps que pour la plupart des autres tissus.
4. Le tissu est trop gras pour le protocole sélectionné. Les échantillons mammaires de grande taille ou les excisions dans la peau contenant de grandes zones de graisse sous-cutanée requièrent des protocoles plus longs parce que la graisse est un obstacle à la déshydratation. Et, si l'eau reste dans l'échantillon, cela entraîne un éclaircissement et une infiltration de paraffine incomplets ainsi qu'un mauvais maintien du tissu. L'éthanol est un solvant gras médiocre, l'isopropanol est meilleur. Une durée supplémentaire est requise à la fois pour la déshydratation et l'éclaircissement dans les protocoles à utiliser pour les échantillons gras.
5. Le tissu contient des dépôts de calcium n'ayant pas été retirés par une décalcification préalable, ou il contient des corps étrangers, sutures, agrafes, greffes synthétiques, etc. Le problème est que les dépôts de calcaire et la plupart des corps étrangers ne seront pas pénétrés par des réactifs de traitement (peu importe la durée des étapes) et ne seront donc pas maintenus par la paraffine et ne pourront pas être coupés. De petites quantités de calcium peuvent être retirées par une décalcification de la surface (voir solution 6) mais si de grandes quantités sont présentes, il peut être nécessaire de procéder à un traitement inverse avec un passage dans l'eau suivi d'une décalcification normale. Cela peut être le cas si un os n'ayant pas été décalcifié par inadvertance a été intégré dans un cycle de traitement normal. En ce qui concerne les autres corps étrangers, il peut être nécessaire de les retirer physiquement de l'échantillon avant le traitement ou de la face du bloc pour pouvoir obtenir des coupes (après consultation avec votre pathologiste).

6. Comme le programme était trop court, les échantillons :

- n'étaient pas fixés correctement
- ou n'étaient pas déshydratés correctement
- ou n'étaient pas éclaircis correctement
- ou n'étaient pas complètement infiltrés par la paraffine
- ou une combinaison des options susmentionnées.

Ce problème se rencontre fréquemment quand un mélange d'échantillons de grandes et de petites tailles sont traités dans le même lot. Tandis que le programme convient à la majorité des échantillons, les échantillons de très grande taille ou très denses ne peuvent pas être traités complètement. Ceci a tendance à se produire quand des programmes plus courts sont introduits afin de réduire les temps de rotation sans que les dimensions ou les types d'échantillons traités dans ces cycles plus courts soient eux-même réduits. Pour plus d'explications, veuillez vous référer à la section "Compromis en termes de traitement" ci-dessous.

7. Comme le programme était trop long, les échantillons trop délicats ou minuscules étaient :

- exposés aux déshydratants pendant une période trop longue
- ou exposés trop tôt à des déshydratants de concentration élevée (en particulier les tissus mal fixés)
- ou exposés aux agents éclaircissants pour une période trop longue
- ou exposés à la paraffine chaude pour une période trop longue
- ou exposés à des températures trop élevées pour une période trop longue
- ou une combinaison des options susmentionnées.

Le sur-traitement est un problème courant dans le cas des échantillons de petite taille qui contiennent des types de tissu particuliers, tels que les épithéliums glandulaires (comme dans les biopsies endoscopiques) et les tissus hématopoïétiques et lymphoïdes. Comme le mentionne le point 6 ci-dessus, ce problème se rencontre fréquemment quand un mélange d'échantillons de grandes et de petites tailles sont traités dans le même lot. Les tissus sur-traités deviennent friables et peuvent être très difficiles à couper. Pour plus d'explications, veuillez vous référer à la section "Compromis en termes de traitement" ci-dessous.

8. Le programme n'a pas été proportionné correctement pour les types d'échantillons à traiter (par ex. selon que l'on traite un tissu de rongeur ou un tissu humain, les étapes requièrent des durées différentes). La durée totale doit être satisfaisante, mais il se peut que la durée des étapes individuelles soit inappropriée. En voici quelques exemples :
- Déshydratation insuffisante avant l'éclaircissement. Cela signifie que l'échantillon contient toujours de l'eau et n'est pas éclairci ou infiltré, peu importe qu'il soit conservé dans un agent éclaircissant ou de la paraffine.
 - Une déshydratation excessive avant l'éclaircissement peut entraîner une sur-déshydratation par le biais du retrait d'eau liée (moléculaire) à l'échantillon. Dans les tissus sensibles, tels que les tissus muqueux de l'intestin, ce phénomène peut engendrer des blocs très friables²⁷.
 - Un éclaircissement insuffisant avant l'infiltration de la paraffine peut indiquer que le tissu ne sera pas infiltré correctement par la paraffine en raison des résidus d'alcool et qu'il ne sera donc pas maintenu correctement dans le bloc.
 - Un éclaircissement excessif avant l'infiltration de la paraffine peut produire des tissus friables. Là encore, ce sont les épithéliums qui sont le plus susceptible d'être affectés.
 - Une durée de maintien insuffisante dans la paraffine signifie que l'agent éclaircissant ne sera pas entièrement remplacé par la paraffine dans l'échantillon. Mélangée à l'agent éclaircissant, la paraffine ne peut pas durcir correctement afin de maintenir le tissu. Il sera donc difficile, voire impossible d'obtenir des coupes. Après la coupe et pendant le stockage, la face des blocs renfermant toujours l'agent éclaircissant se contracte sous l'effet de l'évaporation du solvant.
 - Une durée de maintien excessive dans la paraffine peut entraîner une dureté, friabilité et rétraction excessives des échantillons sensibles.

Les protocoles standard recommandés pour le préparateur de tissu Peloris™, dont la durée s'étend d'une à douze heures, appliquent les proportions suivantes en termes de durée d'étape totale pour la déshydratation, l'éclaircissement et l'infiltration de la paraffine (veuillez vous référer au tableau 4). Ces protocoles ont été validés par des tests approfondis et les protocoles recommandés pour d'autres préparateurs suivent un modèle similaire. La durée de l'étape de fixation n'est pas intégrée dans les calculs car elle varie considérablement d'un laboratoire à l'autre en fonction des exigences particulières à chaque laboratoire.

Tableau 4. Proportion des principales étapes de traitement par rapport à la durée totale des étapes (hors fixation)		
Étape	Réactif	Proportion (+/- 5%)
Protocoles éthanol/xylène		
Déshydratation	Comprend des alcools classés et des alcools absolus	40 %
Éclaircissement	Xylène	30 %
Infiltration	Paraffine	30 %
Protocoles sans xylène		
Déshydratation	Comprend de l'éthanol classé et des mélanges éthanol/isopropanol	35 %
Éclaircissement	Isopropanol	30 %
Infiltration	Paraffine	35 %

9. Un problème lié à la programmation ou au chargement du préparateur, par exemple :

- Le choix du mauvais programme parmi les programmes disponibles. Il s'agit là d'un motif courant de retraitement des échantillons, il découle de l'erreur humaine. Les échantillons de grande taille traités dans le cadre d'un programme rapide de deux heures au lieu d'un programme de huit heures seront largement sous-traités. Dans ce cas, un retraitement sera nécessaire. Les échantillons de très petite taille qui requièrent normalement un programme de deux heures seront rétractés et friables s'ils sont soumis à un programme de huit à douze heures. Dans ce cas, la seule solution consiste, si possible, à utiliser diverses "astuces du métier" pour obtenir des coupes.
- Paniers de cassettes surchargés ; Ceci est susceptible de se produire quand les cassettes sont placées au hasard dans les paniers sans supports, et qu'elles ne sont pas complètement recouvertes par les réactifs durant le traitement. Généralement, seules les quelques cassettes se trouvant tout en haut sont affectées. Un niveau de remplissage incorrect de la chambre du préparateur peut produire un effet similaire. Les effets produits sur le tissu dépendront des réactifs qui ne seront pas entrés en contact avec les échantillons.
- Cassettes surchargées de tissus. Il s'agit d'un problème courant rencontré par certains laboratoires en raison du manque d'expérience de certains membres du personnel chargés du montage des échantillons. La circulation fluide à l'intérieur des cassettes surchargées de tissus est restreinte. Il en résulte donc un traitement de qualité médiocre. Par ailleurs, les effets de pression localisés causés par les parties protubérantes du couvercle de la cassette risquent de compromettre partiellement la morphologie du tissu.
- Utilisation de cassettes inappropriées. La conception des cassettes est importante car elle influence la qualité du traitement. Il est donc essentiel que la cassette renferme bien le tissu dans son intégralité, y compris les petits fragments, et qu'elle permette un accès illimité aux réactifs de traitement. Comme il existe de nombreux fabricants de cassettes sur le marché, il convient de choisir soigneusement les cassettes tout en gardant ceci à l'esprit : les cassettes à mailles fines, les bandes de tissu ou les compresses en mousse pour biopsie sont couramment utilisées pour les échantillons de petite taille et chacune restreint, à sa façon, l'écoulement du fluide et augmente légèrement le volume de fluide transféré d'un réactif à un autre. Il faut donc choisir un programme de traitement adapté et compenser le transfert accru lors du remplacement des réactifs de traitement.

10. Un problème lié à la maintenance du préparateur, par exemple :

- Une formation inadéquate du personnel. Il est capital que tous les membres du personnel qui manipulent les préparateurs et qui sont chargés de la maintenance de routine aient suivi une formation complète et qu'ils comprennent le but des procédures particulières et les conséquences si l'on s'en écarte.
- L'utilisation d'un réactif incorrect lors du remplacement des solvants. Par exemple, si une solution d'éthanol à 70 % a été utilisée par erreur pour réapprovisionner un bidon qui devait contenir de l'éthanol absolu, il se peut que votre préparateur utilise ce réactif pour l'étape de déshydratation finale. Cela signifierait que la déshydratation ne serait pas complète et que le traitement en résultant serait également incomplet. Ce problème peut être difficile à identifier.
- Remplacer les bidons de solvants dans l'ordre incorrect. Les conséquences peuvent être similaires à celles décrites ci-dessus. Il est important de garder à l'esprit que bien qu'un bidon soit rempli avec le réactif correct et étiqueté de manière précise, s'il n'est pas placé au bon endroit dans le préparateur, l'instrument ne le détectera pas et il peut en résulter un traitement imparfait.
- L'utilisation de réactifs lourdement contaminés qui auraient dû être remplacés (avertissements des seuils ignorés). Chaque fois qu'un chargement d'échantillons est traité, les réactifs de traitement sont contaminés par les fluides, lipides et fixatifs s'échappant des échantillons. Les réactifs sont également transférés par les échantillons eux-mêmes, les cassettes, les paniers à cassettes, les tampons de biopsie et les bandes, ainsi que par les composants de la chambre de réaction elle-même à chaque purge et remplissage de la chambre. Il est essentiel de disposer d'un régime bien établi pour le remplacement des réactifs de traitement contaminés. L'utilisation de réactifs contaminés peut occasionner une déshydratation, un éclaircissement ou une infiltration incomplets, entraînant ainsi un traitement imparfait. Les fabricants de préparateurs fournissent également des recommandations, dans le cadre du remplacement des réactifs, quant au nombre de paniers traités, le nombre de cassettes traitées, la proportion de cassettes contenant des tampons de biopsie, etc. Associées à l'expérience du personnel, ces recommandations doivent permettre d'établir des procédures strictes qui doivent être rigoureusement respectées.
- L'utilisation de réactifs recyclés de qualité insatisfaisante. La qualité des réactifs de traitement est déterminante. Il y a une limite à l'utilisation des réactifs recyclés, il est donc nécessaire d'introduire des réactifs frais à intervalles réguliers. Les instructions fournies par les fabricants de recycleurs commerciaux doivent être rigoureusement respectées.
- Le démarrage du cycle de purge (nettoyage) avant d'extraire les échantillons. Si un panier de cassettes reste dans la chambre du préparateur par inadvertance, alors que la paraffine est purgée et que le cycle de purge (nettoyage) a démarré, les échantillons seront immergés dans un agent de déparaffinage chaud et il se peut qu'ils passent à travers de l'alcool et qu'ils subissent une étape de séchage selon le moment auquel l'erreur sera détectée. Il est alors nécessaire de procéder à un retraitement et d'évaluer avec soin quel sera le meilleur point de départ et la méthode de retraitement à adopter.

11. Un dysfonctionnement du préparateur ayant entraîné :

- Une défaillance lors du remplissage, laissant alors les échantillons à l'air pour une période prolongée, ce qui entraîne un séchage. Une défaillance lors du remplissage combinée au chauffage de la chambre pourrait entraîner un problème, mais, dans la plupart des préparateurs à transfert de fluide, les échantillons prennent énormément de temps pour sécher dans une chambre fermée hermétiquement. Un échantillon qui sèche risque davantage de présenter un problème avec les anciens systèmes à transfert de tissu.
- Les échantillons immergés dans un réactif particulier pendant une période excessive (par ex. dans de l'éthanol absolu, du xylène ou de la paraffine). Ceci peut avoir des conséquences graves, en particulier avec les petits échantillons délicats, ce qui produit des blocs sur-traités, extrêmement friables. Ce phénomène est particulièrement grave quand il implique des réactifs chauds.
- Les échantillons soumis à une chaleur excessive. Il s'agit d'un événement improbable parce que les préparateurs modernes sont équipés de thermostats de sécurité offrant une protection contre la surchauffe. Si les échantillons sont exposés à des températures très élevées, ils peuvent subir des dommages irréversibles.
- Les échantillons placés dans les réactifs contaminés (tels que la paraffine contaminée par le formol). Certains rapports mentionnent un dysfonctionnement des vannes entraînant une contamination de la paraffine et des agents éclaircissants.²¹ Les conséquences de la contamination au formol sont présentées dans la solution 9e (partie 3). La contamination des agents éclaircissants (xylène et isopropanol) et de la paraffine entraîne les conséquences les plus graves. Le retraitement peut certes permettre de couper des blocs d'échantillons compromis par des réactifs contaminés mais les dommages morphologiques persistent.

Compromis en termes de préparation

Puis-je préparer des échantillons de grande et de petite taille dans le même cycle de préparation et espérer obtenir des résultats optimaux ? Quel est l'effet produit par la durée totale d'un programme de traitement sur la qualité du traitement ?

Le graphique présenté à la figure 35 illustre le compromis réalisé quand un cycle de traitement contient un mélange d'échantillons de très petite et de très grande taille. Il représente le traitement hypothétique de trois échantillons entièrement différents. Les résultats présentés sont basés sur l'expérience du rédacteur et sur certains tests réalisés en laboratoire. Ce qui importe ici, c'est le principe sous-jacent, et non les résultats spécifiques.

L'"échelle de qualité arbitraire" représente la qualité de traitement générale pouvant être obtenue quand un échantillon particulier est traité via un programme d'une durée totale spécifique ("Durée du traitement en heures"). Dans ce modèle, nous supposons que le tissu est correctement fixé et que les programmes de traitement sont correctement proportionnés. Nous avons intégré une gamme de programmes de traitement dont les durées sont comprises entre une et douze heures. La "qualité du traitement" est représentée par une valeur comprise entre un et cent, calculée à partir de l'observation de tous les effets "micro" et "macro" d'un traitement médiocre²⁸, décrits aux pages 70 et 71. La ligne jaune (valeur de 50) représente le point auquel le traitement devient juste acceptable. Une valeur comprise entre 80 et 90 représente un traitement de qualité élevée.

Des échantillons très différents ont été choisis pour illustrer le problème. Une biopsie endoscopique de 2 mm, minuscule et fragile, pourrait fournir les meilleurs résultats dans le cadre de programmes de traitement d'une durée comprise entre une et trois heures, tandis qu'un échantillon de myocarde d'une épaisseur de 3 mm pourrait fournir les meilleurs résultats dans le cadre de programmes d'une durée comprise entre quatre et sept heures. Un fragment du col de l'utérus d'une épaisseur de 5 mm (tissu fibro-musculaire très dense) pourrait requérir une durée de traitement comprise entre huit et douze pour obtenir de bons résultats.

Le graphique montre qu'un programme de 3.5 heures fournirait des résultats acceptables si la biopsie endoscopique et les échantillons de myocarde étaient traités dans le même cycle, tandis qu'un programme de 7.5 heures fournirait des résultats acceptables si le myocarde et le col de l'utérus étaient traités en même temps. Ce modèle suggère également qu'il ne serait pas possible de trouver de compromis produisant des résultats acceptables si la biopsie endoscopique et les échantillons du col de l'utérus étaient traités dans le même cycle.

Il est à noter qu'il s'agit ici d'un schéma purement hypothétique. L'utilisation de préparateurs différents et de réactifs de traitement différents produirait des courbes dont les détails seraient différents, mais le problème d'une approche qui conviendrait à tous les types d'échantillons pour le traitement des tissus est clairement démontré. Il n'est pas possible de traiter des échantillons délicats de très petite taille et des échantillons robustes dans le même programme et d'obtenir des résultats optimaux pour les deux types d'échantillons.

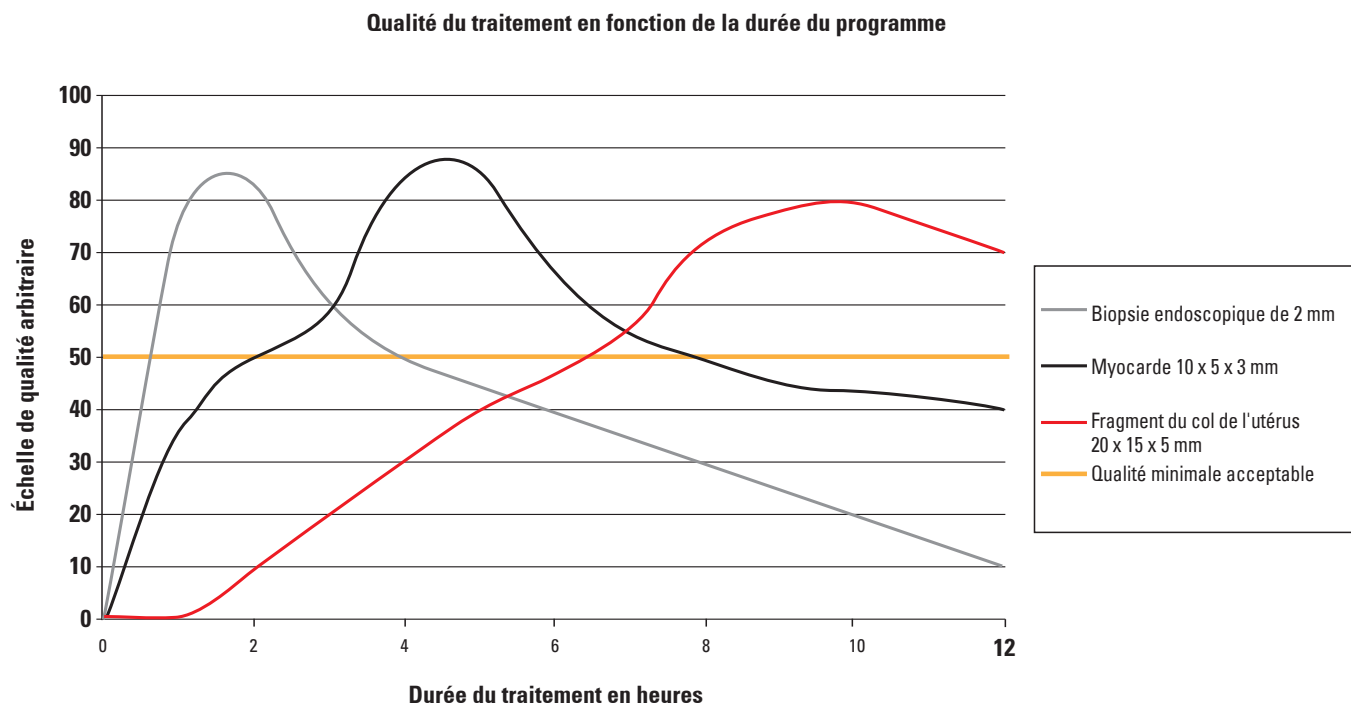


Figure 35

Partie 5

Validation

Comment valider une méthode de retraitement

Comment valider une méthode de retraitement

Les suggestions présentées dans la présente publication sont de caractère général. Elles sont basées sur des tests limités et sur l'expérience acquise dans ce domaine. Il est conseillé à chaque laboratoire de valider ses propres méthodes de retraitement dans les conditions et avec l'équipement s'appliquant au laboratoire concerné. Une méthode éprouvée disponible s'avère toujours efficace quand il est nécessaire de retraiter des tissus.

Procédure suggérée pour la validation :

La méthode suivante a été utilisée pour tester les méthodes de retraitement décrites dans la présente publication. Elle est simple et peut être appliquée par n'importe quel laboratoire désireux de valider une méthode pour son usage propre.

1. Veuillez choisir plusieurs types d'échantillons pour le test. Il doit s'agir de tissus sensibles qui, d'après votre expérience, sont susceptibles d'être affectés par un traitement médiocre. Les échantillons de grande taille provenant de tissus mammaires grassex ou de fragments du col de l'utérus constituent de bons exemples. Le tissu doit être obtenu à partir d'échantillons "non-diagnostic" provenant de tissus en surplus. Pour des résultats reproductibles et comparables, le test s'applique sur un tissu parfaitement fixé.
2. Choisissez un programme de traitement que vous utiliseriez normalement pour les types d'échantillons sélectionnés et préparez les blocs de tissus de dimensions précises dont vous savez pertinemment qu'ils seraient traités de manière appropriée par ce protocole. Vous pourriez, par exemple, préparer des blocs du col de l'utérus mesurant 15 x 10 x 4 mm, que vous traiteriez normalement dans le cadre d'un cycle de huit heures.
3. Sous-traitez considérablement vos échantillons en les soumettant à un cycle dont vous savez qu'il sera trop court, enrobez-les selon le processus habituel. Vous pourriez, par exemple, traiter les blocs du col de l'utérus, décrits ci-dessus, dans un cycle de deux heures.
4. Confirmez que vos échantillons ne sont pas satisfaisants en exposant le tissu dans le bloc et en tentant d'obtenir des coupes cohésives.
5. Appliquez la méthode de retraitement que vous souhaitez valider. Comme point de départ pour le traitement (final) faisant partie de la méthode de retraitement, utilisez un programme de même durée que celui que vous utiliseriez normalement pour des échantillons de ce type et de cette taille. Ainsi, pour les échantillons du col de l'utérus décrits ci-dessus, vous les traiteriez dans le sens inverse, en utilisant la méthode de déparaffinage et de réhydratation choisie, puis, vous leur feriez subir un cycle de traitement de huit heures correspondant à l'étape finale du retraitement.
6. Reprenez la coupe de vos blocs pour confirmer que le retraitement a été réussi.
7. Colorez les coupes en appliquant différentes méthodes afin de déterminer si un sous-traitement important suivi d'un retraitement affecte la coloration négativement. Les colorations IHC et ISH en particulier doivent être prises en considération lors des étapes de reconstitution.
8. Si cette méthode est appropriée, notez-la afin d'en faire une procédure opérationnelle standard.

Partie 6

Annexe

Arbres de décision de retraitement

Comme il existe plusieurs causes pouvant expliquer la qualité médiocre des blocs, il convient de suivre un processus logique lors de la décision de la ligne de conduite à adopter. Trois arbres de décision sont fournis.

L'arbre de décision 1 traite des échantillons qui n'ont pas été traités de manière adéquate avant leur préparation. Il couvre les échantillons mal fixés et ceux qui présentent des zones calcifiées, qu'une décalcification appropriée n'a pas pu éliminer. La situation improbable où tous les échantillons sèchent complètement avant ou pendant le traitement est traitée dans l'arbre de décision 3.

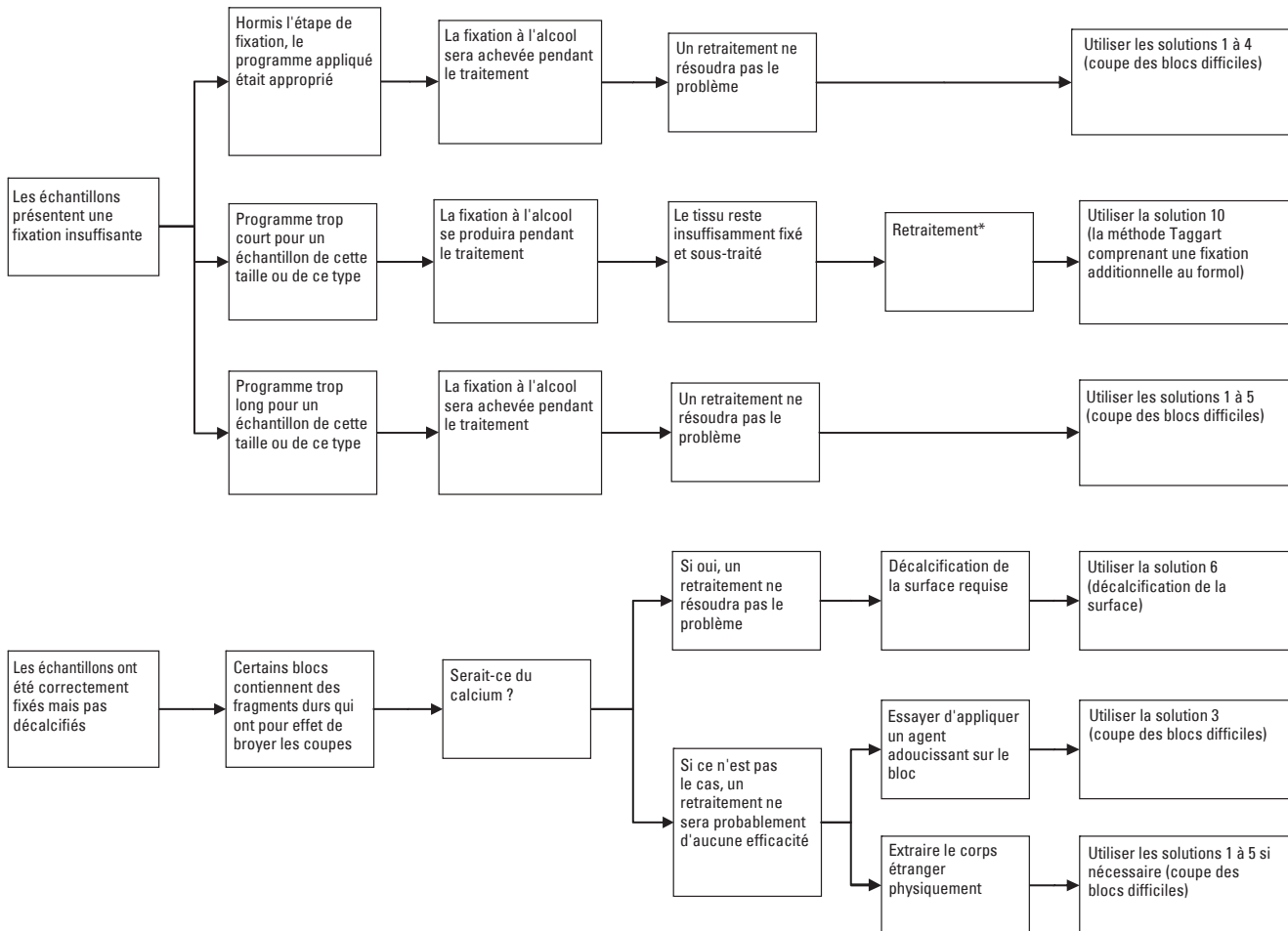
L'arbre de décision 2 traite de la situation dans laquelle tout a fonctionné correctement avec le préparateur et les réactifs de traitement, mais où un programme inapproprié a été utilisé pour le traitement des échantillons.

L'arbre de décision 3 traite des dysfonctionnements du préparateur et des problèmes liés aux réactifs.

AVERTISSEMENT :

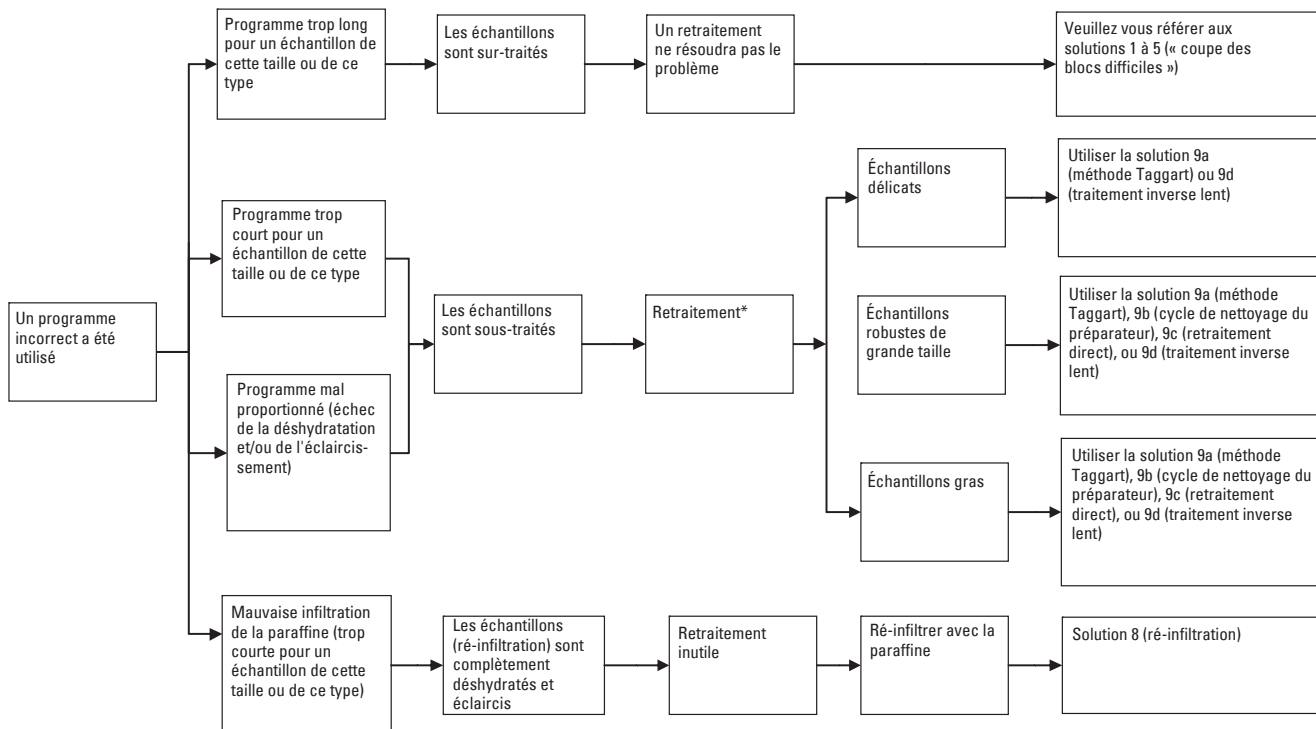
La décision de retraiter les tissus ne doit être prise qu'après avoir soigneusement examiné la situation. Dans certains cas en effet, un retraitement peut détériorer la situation encore davantage au lieu de l'améliorer.

Arbre de décision 1 : Fixation ou décalcification inadéquate



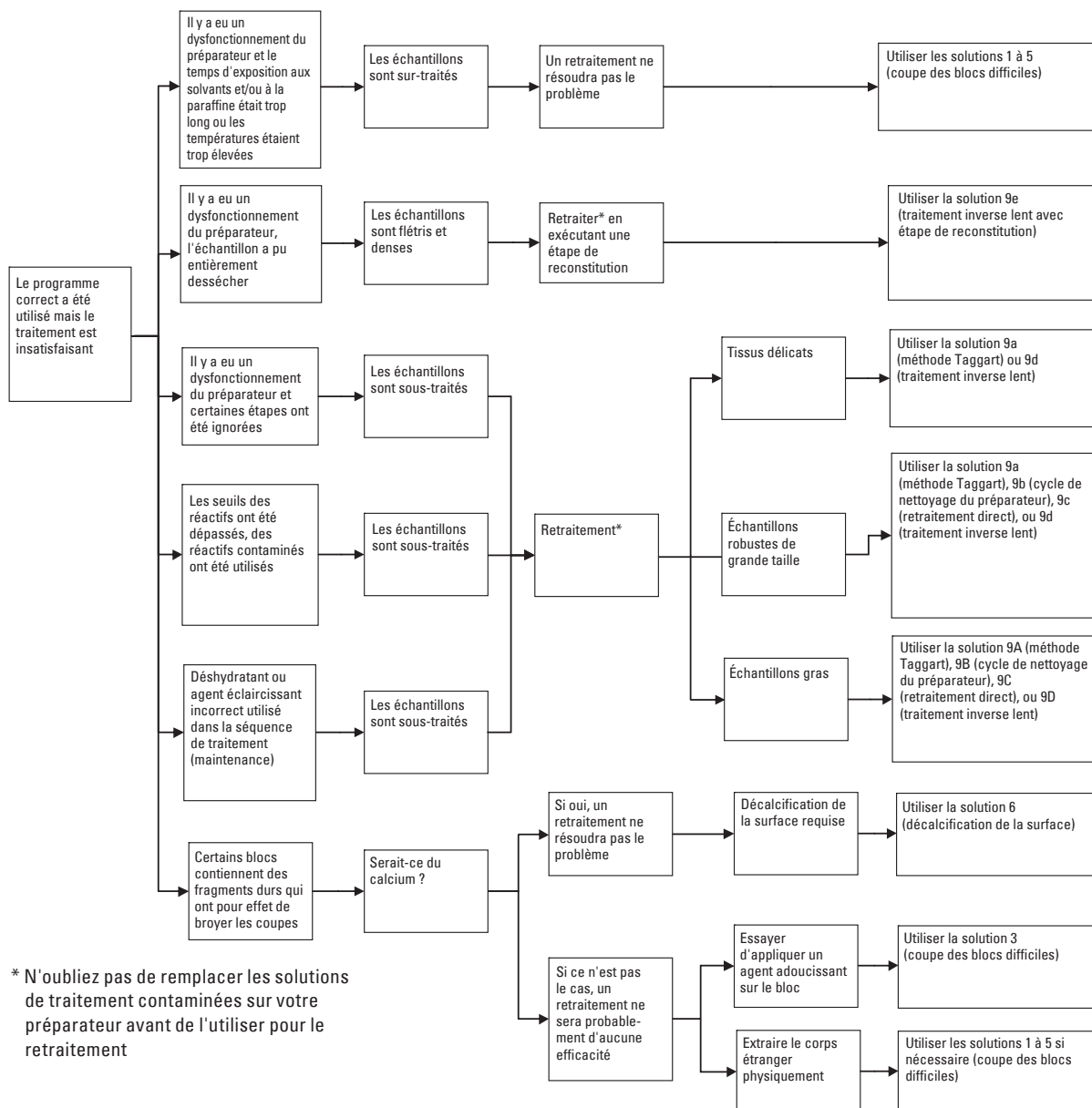
* N'oubliez pas de remplacer les solutions de traitement contaminées sur votre préparateur avant de l'utiliser pour le retraitement

Arbre de décision 2 : Utilisation d'un programme incorrect



* N'oubliez pas de remplacer les solutions de traitement contaminées sur votre préparateur avant de l'utiliser pour le retraitement

Arbre de décision 3 : Problèmes liés au préparateur ou aux réactifs



* N'oubliez pas de remplacer les solutions de traitement contaminées sur votre préparateur avant de l'utiliser pour le retraitement

Tableau 5. Fluides assouplissants à utiliser sur la face du bloc

Méthode	Composition	Application	Référence
Eau glacée	Eau pure	Placer la surface du bloc dégrossie sur de la glace en fusion ou dans un bac d'eau glacée à une température de 4 °C pendant quelques minutes, puis reprendre la coupe.	Anderson ¹⁰ Carson ²⁷ Culling ²¹ Drury & Wallington ⁶
Baker	Éthanol à 60 % 90 ml Glycérine 10 ml	Placer la surface du bloc dégrossie dans la solution pendant quelques minutes, rincer dans l'eau, refroidir à nouveau, puis reprendre la coupe.	Gray ¹¹
Carleton	Teepol™ à 0.2 % (ou autre agent mouillant) dans de l'eau	Placer la surface du bloc dégrossie dans la solution pendant quelques minutes, rincer dans l'eau froide, refroidir à nouveau, puis reprendre la coupe.	Drury et Wallington ⁶
Goodwin	5 parts d'éthanol 5 parts de glycérine 1 part de Teepol™	Recommandé pour les os décalcifiés ou les tissus fibreux denses. Prétend que la trempe d'une durée d'une nuit ou plus n'a pas endommagé les blocs	Goodwin ²⁹
Assouplissant	Assouplissant Downy™ 5 ml Eau distillée 100 ml Bien mélanger, placer dans un conteneur d'échantillons étiqueté. Stable pendant 2 mois.	Placer la face du bloc vers le bas dans la solution. Laisser tremper pendant 5 à 10 minutes. S'utilise également pour essuyer la face du bloc avant chaque coupe.	WebPath ²⁰
Mollifex™	Eau, éthanol, méthanol, acétone, glycérine, 4-hexylrésorcine	Placer la surface du bloc dégrossie dans le Mollifex™ pendant quelques minutes, rincer dans l'eau, refroidir à nouveau, puis reprendre la coupe.	Culling ²¹ Gray ¹¹ MSDS ³⁰
Hydroxyde de potassium	Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium à 10 %	S'utilise pour assouplir les ongles et la kératine dense après la fixation au formol avant le traitement, s'utilise aussi sur les blocs de paraffine. Placer la face du bloc vers le bas dans la solution. Laisser tremper pendant quelques minutes, rincer abondamment dans l'eau, refroidir à nouveau, puis reprendre la coupe.	Winsor ²²

Méthode	Composition	Application	Référence
Phénol	Solution aqueuse de phénol à 4 %	Placer la face du bloc vers le bas dans la solution. Laisser tremper pendant quelques minutes, rincer abondamment dans l'eau, refroidir à nouveau, puis reprendre la coupe.	Winsor ²²
Ammoniac/ assouplissant Tween TM	Mélange à volume égal de solution aqueuse d'ammoniac à 5 % et de solution aqueuse de Tween80 TM à 5 %	Placer la face du bloc vers le bas dans la solution. Laisser tremper pendant quelques minutes, rincer abondamment dans l'eau, refroidir à nouveau, puis reprendre la coupe.	Dorevitch Pathology (Melbourne)
Nair TM ou Veet TM	Les formules thioglycoliques qui brisent les liaisons disulfures dans la kératine	Couvrir la face du bloc avec la lotion. Laisser tremper pendant quelques minutes, rincer dans l'eau, refroidir à nouveau, puis reprendre la coupe.	Winsor ²²

Tableau 6. Reconstitution, restauration ou agents assouplissants à utiliser sur les échantillons

Méthode	Composition	Application	Référence
Mekota (utilisé pour reconstituer les tissus momifiés)	Assouplissant Comfort TM à 0.2 % dans 80 ml de carbonate de sodium à 5 % Formaldéhyde à 4 % (formol à 10 %) 20 ml	Immersion pendant une nuit suivie d'une fixation au formol de 24 heures, puis traitement normal.	Mekota ²⁴
Baker (utilisé pendant le traitement ou appliqué pour couper la surface d'un bloc de paraffine)	Éthanol à 60 % 90 ml Glycérine 10 ml	Tremper le bloc jusqu'à ce que le tissu s'assouplisse (1 à 24 heures), puis le traiter normalement.	Gray ¹¹

Méthode	Composition	Application	Référence
Anderson et Gordon (pour la restauration de tissus séchés lors du traitement)	Éthanol à 70 % 70 ml Glycérine 30 ml Dithionite 1 g	Tremper les tissus pendant plusieurs heures, généralement la nuit, puis traiter selon la procédure habituelle à partir de l'étape de déshydratation.	Bancroft et Stevens ¹⁰
Sandison (assouplissement d'échantillons de tissus déshydratés, desséchés, friables ou de tissus fixés anormalement durs ou momifiés)	Éthanol à 96 % 30 ml Solution aqueuse de formol à 1 % 50 ml Solution aqueuse de carbonate de sodium à 5 % 20 ml	Tremper les tissus pendant 12 à 18 heures, puis traiter selon la procédure habituelle à partir de l'étape de déshydratation.	Thompson ¹⁸
Luna (assouplit le tissu séché avant ou après la fixation, y compris les tissus de cadavre séchés et les tissus mal traités)	Solution de base formol/acétate de sodium : Formol (formaldéhyde à 38 %) 10 ml Acétate de sodium 2 g Eau 90 ml Solution préparée formol/glycérine : Solution de base formol/acétate de sodium : 90 ml Glycérine 10 ml	Tremper jusqu'à ce que le tissu s'assouplisse (généralement 5 à 8 heures) Une exposition prolongée ne nuira pas au tissu. Traiter selon la procédure habituelle.	Luna ¹⁵
Solution de récupération d'épitope (solution de récupération d'épitope BOND™ 2) ou solution tampon de Tris	Solution ER pH 9 diluée comme recommandé ou tampon Tris/HCl pH 9	Tremper le tissu pendant 1 à 12 heures selon la taille, le type et l'état de l'échantillon. Une incubation à 65 °C peut accélérer l'action de ces agents.	Wright ^{31, 32}
Solution saline isotonique	Solution aqueuse de chlorure de sodium à 0.85 %	Tremper le tissu pendant 1 à 12 heures selon la taille, le type et l'état de l'échantillon. Une incubation à 65 °C peut accélérer l'action de cet agent.	
Formol tamponné neutre	Solution de formol à 10 % dans un tampon phosphate à pH 7.4	Tremper le tissu pendant 1 à 12 heures selon la taille, le type et l'état de l'échantillon.	

Références

1. Rolls GO, Farmer NJ, Hall JB. Artifacts in Histological and Cytological Preparations. 1re éd. Melbourne : Leica Microsystems, 2008.
2. Luna LG. Questions in search of an answer (Question 4). HistoLogic 1988;XVIII;16.
3. Dayman ME. Response to questions in search of an answer. HistoLogic 1989;XIX;56 - 57.
4. Grizzle WE. The effect of tissue processing variables other than fixation on histochemical staining and immunohistochemical detection of antigens. The Journal of Histotechnology 2001;24;213-219.
5. Wynnchuk M. An Artifact of H&E Staining: The Problem and Its Solution. The Journal of Histotechnology 1990;13;193-198.
6. Drury RAB, Wallington EA. Carleton's Histological Technique. 5e éd. Oxford : Oxford University Press, 1980.
7. Faolain EO, Hunter MB, Byrne JM et al. Raman spectroscopic evaluation of efficacy of current paraffin wax section dewaxing agents. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2005;53;121-129.
8. Disbrey BD, Rack JH. Dehydration and clearing. Histological Laboratory Methods. Edimbourg : E. & S. Livingstone, 1970;43.
9. Clapp TR, Mellen PF. Rapid "Reprocessing" of Poorly Prepared Fatty Tissues. The Journal of Histotechnology 1998;21;65.
10. Anderson G, Gordon KC. Tissue processing, microtomy and paraffin sections. In Bancroft JD and Stevens A eds. Theory and Practice of Histological Techniques. New York : Churchill Livingstone, 1996;57.
11. Gray SJ. Practice of microtomy. Essentials of Microtomy. Londres : Butterworths, 1972;72.
12. Humason G. Paraffin sectioning and mounting. Animal Tissue Techniques. San Francisco : W H Freeman and Company, 1972;61.
13. Johnson ml. A technique for correcting poorly processed paraffin blocks. Histologic 2003;XXXVI;21-22.
14. Lefebvre G. Reprocessing tissue blocks. Histologic 2001;XXXIV;42.
15. Luna LG. Method for reprocessing dried tissue specimens. Histologic 1978;VIII;111.
16. Mondragon G. Facts about alcohol dehydration of tissue samples. Histologic 2006;XXXIX;23.
17. Staples TC. Rehydration of biopsy specimens to facilitate sectioning. Histologic 1996;XXVI.
18. Thompson SW. Preparation of microscopic tissue sections. Selected Histochemical and Histopathological Methods. Springfield : Charles C Thomas, 1966;137-138.
19. Taggart G. Taggart's reprocessing technique. Sydney : E-mail à G Rolls, 6 août 2008.
20. WebPath: Internet Pathology Laboratory. Downy: Block softening solution. The University of Utah Eccles Health Sciences Library 2008; <http://library.med.utah.edu/WebPath/webpath.html>; 19 janvier 2009
21. Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular Pathology Technique. 4e éd. Londres : Butterworths, 1985.

22. Winsor L. Tissue Processing. In Woods AE and Ellis RC eds. Laboratory Histopathology. New York : Churchill Livingstone, 1994;4.2-37.
23. Leica. Paraffin Tape Transfer System. MyNeuroLab.com, 2009; <http://www.myneurolab.com/myneurolab/Products/ProductList.aspx/Histology+Products/Paraffin+Tape+Transfer+System/4/232>;
24. Mekota AM, Grupe G, Zimmerman MR, Vermehren M. First identification of an ancient Egyptian mummified human placenta. International Journal of Osteoarchaeology 2005;15;51-60.
25. Ciranni R, Castagna M, Fornaciari G. Goiter in an eighteenth-century Sicilian mummy. American Journal of Physical Anthropology 1999;108;427-432.
26. Verbov JL. Mummified skin - an exercise in preservation. International Journal of Dermatology 1983;22;46-60.
27. Carson FL. Histotechnology: A self-instructional text. 2e éd. Chicago : ASCP Press, 1997.
28. Rolls GO, Farmer NJ, Tarbet F. Assessing the Quality of Tissue Processing and the Performance of Peloris™ using the Leica Microsystems Scoring System. Scientia Educational Materials and White Papers, 2005.
29. Goodwin JR. Strict serial sectioning with particular reference to bone and dense fibrous tissue. Histologic 1981;XI 1-2.
30. EMD Chemicals Inc. Mollifex™ Material Safety Data Sheet. 2008; http://www.emdchemicals.com/analytics/doc/msds/MSDSU_65039.htm; 19 janvier 2009
31. Wright KR. Research Antigen Retrieval Solution (Letter to the Editor). The Journal of Histotechnology 1994;17;81.
32. BioGenix. Data Sheet: H&E Retrieval Solution Cat No HK168-5K. San Ramon, Ca: BioGenix, 2004.

« Avec l'utilisateur, pour l'utilisateur » – Leica Microsystems

Leica Microsystems opère à l'échelle globale en quatre divisions qui occupent une position de tout premier plan dans leur segment respectif.

• Life Science Division

La division Sciences de la Vie répond aux besoins d'imagerie des scientifiques par une très grande capacité d'innovation et un savoir-faire technique reconnu dans le domaine de la visualisation, la mesure et l'analyse des microstructures. De part sa connaissance approfondie des applications biologiques, la division fait bénéficier ses clients d'une avance scientifique décisive.

• Industry Division

En proposant des systèmes d'imagerie innovants et de qualité pour l'observation, la mesure et l'analyse des microstructures, la division Industrie de Leica Microsystems accompagne ses clients dans leur recherche de qualité et de résultats optimaux. Ses solutions sont utilisées aussi bien pour des tâches de routine ou de recherche, qu'en science des matériaux, en contrôle-qualité, en criminalistique et pour l'éducation.

• Biosystems Division

La division Biosystèmes de Leica Microsystems offre aux laboratoires et instituts de recherche spécialisés en histopathologie une gamme complète de produits performants. Il y a ainsi pour chaque tâche spécifique en histologie le produit adéquat – pour le patient comme pour le pathologiste. Des solutions de gestion électronique de processus d'une productivité élevée sont disponibles pour tout l'environnement du laboratoire. En offrant des systèmes d'histologie complets reposant sur une automatisation innovante et pourvus des réactifs Novocastra™, la division Biosystèmes favorise un excellent suivi des patients grâce à des capacités de traitement rapides, des diagnostics fiables et une collaboration étroite avec ses clients.

• Medical Division

La division médicale accompagne les microchirurgiens dans leur suivi des patients. Elle est un partenaire innovant qui met à la disposition des chirurgiens des microscopes chirurgicaux de grande qualité répondant à leurs besoins actuels et futurs.

La force d'innovation de Leica Microsystems est fondée depuis toujours sur une fructueuse collaboration « avec l'utilisateur, pour l'utilisateur ». Sur cette base, nous avons développé nos cinq valeurs d'entreprise : Pioneering, High-end Quality, Team Spirit, Dedication to Science et Continuous Improvement. Vivre pleinement ces valeurs signifie pour nous : **Living up to Life.**

Active mondialement

Allemagne :	Wetzlar	Tél. +49 64 41 29 40 00	Fax +49 64 41 29 41 55
Angleterre :	Milton Keynes	Tél. +44 800 298 2344	Fax +44 1908 246312
Australie :	North Ryde	Tél. +61 2 8870 3500	Fax +61 2 9878 1055
Autriche :	Vienne	Tél. +43 1 486 80 50 0	Fax +43 1 486 80 50 30
Belgique :	Diegem	Tél. +32 2 790 98 50	Fax +32 2 790 98 68
Canada :	Concord/Ontario	Tél. +1 800 248 0123	Fax +1 847 236 3009
Corée :	Séoul	Tél. +82 2 514 65 43	Fax +82 2 514 65 48
Danemark :	Ballerup	Tél. +45 4454 0101	Fax +45 4454 0111
Espagne :	Barcelone	Tél. +34 93 494 95 30	Fax +34 93 494 95 32
Etats-Unis :	Buffalo Grove/Illinois	Tél. +1 800 248 0123	Fax +1 847 236 3009
France :	Nanterre Cedex	Tél. +33 811 000 664	Fax +33 1 56 05 23 23
Italie :	Milan	Tél. +39 02 574 861	Fax +39 02 574 03392
Japon :	Tokyo	Tél. +81 3 5421 2800	Fax +81 3 5421 2896
Pays-Bas :	Rijswijk	Tél. +31 70 4132 100	Fax +31 70 4132 109
Portugal :	Lisbonne	Tél. +351 21 388 9112	Fax +351 21 385 4668
Rép. populaire de Chine :	Hong-Kong	Tél. +852 2564 6699	Fax +852 2564 4163
	Shanghai	Tél. +86 21 6387 6606	Fax +86 21 6387 6698
Singapour		Tél. +65 6779 7823	Fax +65 6773 0628
Suède :	Kista	Tél. +46 8 625 45 45	Fax +46 8 625 45 10
Suisse :	Heerbrugg	Tél. +41 71 726 34 34	Fax +41 71 726 34 44

et des agences dans plus de 100 pays