

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie

Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

*Formulation de deux fixateurs de biospécimens : étude histologique
comparative avec des tissus fixés au formaldéhyde*

Présenté par

M. ABBAS Marwa & M. BOUSLIMANI Hana

Devant le Jury :

<i>TERZAALI. D</i>	<i>MCA</i>	<i>ISV, Blida1</i>	<i>Présidente</i>
<i>MOKRANE. A</i>	<i>MCA</i>	<i>UMTO, Blida1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>DJAZOULI ALIM. F.Z</i>	<i>Professeur</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Promotrice</i>
<i>RBAIA. I</i>	<i>Doctorante</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Co-promotrice</i>

Session 2024 / 2025

Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents **YOUCEF** et **RAZIKA**, pour leur amour infini, leurs prières silencieuses et leur soutien sans relâche tout au long de mon parcours.

À mon grand frère **Bilal**, pour sa présence rassurante, ses conseils et son soutien constant.

À mes frères **Mohamed, Abd El Mouman, Haroune et Moayed**, qui m'inspirent chaque jour par leur affection et leur énergie.

À mes amies précieuses **Ikram** et **Yasmine**, pour leur écoute, leur gentillesse et leurs encouragements.

Et tout particulièrement à ma binôme **Hana**, pour son implication, sa complicité et sa patience tout au long de cette aventure.

Merci à vous tous d'avoir été là, de près ou de loin. Ce travail est aussi le vôtre.

ABBAS Marwa

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents **Dahbia** et **Mohammed**, pour leur amour inestimable, leur soutien constant et leurs sacrifices sans lesquels rien de tout cela n'aurait été possible. Leur confiance et leurs prières ont toujours été ma plus grande force.

À tous mes **frères et sœurs**, pour leur affection, leur présence rassurante et leurs encouragements tout au long de ce parcours.

Ma binôme **Marwa**, pour sa collaboration, son engagement et l'esprit d'équipe qui ont grandement contribué à la réussite de ce projet. Ce travail est aussi le fruit d'un partage sincère et d'une belle complicité.

À mes **amis** pour leur bienveillance, leur soutien moral et les moments partagés qui ont enrichi cette expérience.

Et enfin, à **moi-même**, pour la persévérance, la patience et l'engagement que j'ai su maintenir afin de mener à bien ce projet.

BOUSLIMANI Hana

Remerciement

Tout d'abord, nous rendons grâce à « **ALLAH** » Le Très-Haut, pour nous avoir accordé la santé, la patience et la persévérance nécessaires à l'achèvement de ce travail.

Ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans l'aide, le soutien et la générosité de nombreuses personnes que nous souhaitons remercier sincèrement.

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres du jury, **Dr TARAZALI D.**, présidente du jury, et **Dr MOKRANE A.**, examinatrice, pour l'honneur qu'elles nous font en acceptant d'évaluer ce travail, ainsi que pour l'attention et l'intérêt qu'elles y ont portés.

Nos remerciements vont tout particulièrement à notre promotrice et chef d'option, **Pr DJAZOULI Alim Z.** (Université Blida 1), pour son accompagnement tout au long de ce projet. Sa rigueur, ses conseils éclairés et sa disponibilité ont été précieux à chaque étape de notre recherche.

Nous remercions également Madame **REBAIA I.**, pour son aide technique, sa bienveillance et son implication, qui ont facilité notre progression.

Nous adressons notre reconnaissance à Monsieur le Directeur de l'École Nationale des Sciences de l'Alimentation et de l'Industrie Agroalimentaire (**ESSAIA**), pour avoir accueilli notre projet et nous avoir permis de le concrétiser dans des conditions favorables.

Enfin, nous remercions toutes les personnes, de près ou de loin, qui nous ont soutenus durant la réalisation de ce mémoire.

SOMMAIRE

Liste des figures	i
Liste des tableaux	ii
Liste des abréviations	iii
الملخص.....	iv
Résumé	v
Abstract.....	vi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Méthode de conservation d'un bio-spécimen	4
1. Définition d'un bio-spécimen	4
2. Type de bio-spécimen.....	4
II. Fixation	5
1. Type de fixation des tissus.....	5
1.1. Méthodes physiques.....	5
1.2. Méthodes chimiques	6
2. Nécessité de la fixation des tissus biologiques pour l'étude morphologique	7
3. Facteurs influençant le choix du fixateur	8
4. Action du formaldéhyde dans le processus de fixation.....	10
5. Les inconvénients du formaldéhyde.....	11
CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	
1. Durée et lieu de la réalisation du travail expérimental	13
2. Matériel biologique	13

2.1. Prélèvement.....	13
3. Matériels non biologiques.....	13
4. MÉTHODES	13
4.1. Formulation des liquides fixateurs	13
4.1.1. Liquide fixateur classique de formaldéhyde 10% dans le tampon phosphate (F) ...	13
4.1.2. Formulation du liquide fixateur à base d'alcool (F1).....	14
4.1.3. Formulation de liquide fixateur à base de sel de zinc (F2).....	14
4.2. Protocole de fixation	14
4.3. Technique histologique	14
4.4. Observation et prise d'images	17

Chapitre III. RESULTATS

1. Contrôle de qualité de fixation du cerveau par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel.	19
1.1. Fixation de 7 jours	19
1.2. Fixation de 14 jours	21
1.3. Fixation de 21 jours	23
2. Contrôle de qualité de fixation du tissu cardiaque par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel.....	25
2.1. Fixation de 7 jours	25
2.2. Fixation de 14 jours	27
2.3. Fixation de 21 jours	29
3. Contrôle de qualité de fixation du tissu hépatique par les fixateurs formulés à base d'alcool et de	31
3.1. Fixation de 7 jours	31
3.2. Fixation de 14 jours	33
3.3. Fixation de 21 jours	35
4. Contrôle de qualité de fixation du tissu rénale par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel	37

4.1. Fixation de 7 jours	37
4.2. Fixation de 14 et 21 jours	39
5. Contrôle de qualité de fixation du tissu intestinale par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel.....	42
5.1. Fixation de 7 jours	42
5.2. Fixation de 14 jours	44
5.3. Fixation de 21 jours	46
Chapitre IV. Discussion	49
CONCLUSION	52
Références bibliographiques	54
ANNEXES.....	60

Liste des figures

Figure 1 : Fixation au formaldéhyde à l'échelle moléculaire.....	7
Figure 2 : Coupes histologiques de cerveau colorées au violet de crésyle	20
Figure 3 : Coupes histologiques de cerveau colorées au violet de crésyle	22
Figure 5 : Coupes histologiques du cerveau colorées au violet de crésyle.....	24
Figure 6 : Coupes histologiques du tissu cardiaque colorées à H&E.....	26
Figure 7 : Coupes histologiques du tissu cardiaque colorées à H&E.....	28
Figure 9 : Coupes histologiques du tissu cardiaque colorées à H&E.....	30
Figure 10 : Coupes histologiques du tissu hépatique colorées à H&E	32
Figure 11 : Coupes histologiques du tissu hépatique colorées à H&E	34
Figure 13 : Coupes histologiques du tissu hépatique colorées à H&E.....	36
Figure 14 : Coupes histologiques du cortex rénal colorées à H&E.....	38
Figure 15 : Coupes histologiques du cortex rénal colorées à H&E.....	40
Figure 17 : Coupes histologiques du cortex rénal colorées à H&E.....	41
Figure 18 : Coupes histologiques de l'intestin grêle colorées à H&E	43
Figure 19 : Coupes histologiques de l'intestin grêle colorées à H&E	45
Figure 21 : Coupes histologiques de l'intestin grêle colorées à H&E.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des biospécimens selon leur finalité de conservation, la méthode de conservation et les cibles biologiques (Betsou et <i>al.</i> , 2010 ; Shabihkhani et <i>al.</i> , 2014 ; ISBER, 2018 ; IARC, 2017).	4
Tableau 2 : composition et préparation des liquides fixateurs F, F1, F2	64

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

F : Formaldéhyde à 10%

F1 : Fixateur à base d'alcool

F2 : Fixateur à base de sel

H&E : Hématoxyline et éosine

IARC : International Agency for Research on Cancer

ISBER : International Society for Biological and Environmental Repositories

LCR : Liquide céphalo-rachidien

NICNAS : National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme

PPM : partie par million (unité de concentration)

الملخص

ركزت دراستنا على البحث عن صيغ جديدة لتثبيت السوائل التي يمكن أن تحافظ على الهياكل والجزيئات الخلوية المختلفة ، كحلول بديلة للفورمالديهايد. يستخدم هذا الأخير كمثبت روتيني للدراسات النسيجية والنسجية المرضية ، ولكن له العديد من العيوب. تم استخدام صيغتين من سائل التثبيت إف 1 و إف 2: على أساس الكحول والملح على التوالي. تمت مقارنة قوة التثبيت وجودة التثبيت مع تلك الموجودة في 10 ٪ الفورمالديهايد (و) ، باستخدام خمسة أنسجة مختلفة من فأر ويستار: الأنسجة العصبية والقلبية والكبدية والكلية والأمعاء. كانت مدة التثبيت بعد فترة 7 و 14 و 21 يوما. بعد هذه الفترات المختلفة ، تم تحضير الأنسجة نسيجيا ثم تلطيخها بالكريسل البنفسجي (نيسل) للدماغ والهيماتوكسيلين واليوزين للأنسجة الأخرى من أجل إجراء ملاحظات مجهرية للبنية المجهرية للأنسجة المختلفة. بالمقارنة مع المثبت إف ، أظهرت النتائج أن: المثبت إف 1 لم يحافظ على أجسام الخلايا وألياف الماييلين للأنسجة العصبية خلال جميع الفترات ، من ناحية أخرى ، حافظ المثبت إف 2 على هذه الهياكل جيدا ، وتم الحفاظ على أنسجة القلب باستخدام المثبت إف 1 لمدة 7 أيام فقط ، ولكن يبدو أن المثبت إف 2 له تأثير حفظ ضعيف في جميع الفترات. تم الحفاظ على أنسجة الكبد بشكل جيد للغاية مع مثبت إف 1 ، من ناحية أخرى ، قام مثبت إف 2 بتغيير سلامته ، وتم الحفاظ على الأنسجة الكلوية باستخدام مثبتات إف 1 وإف 2 ، باستثناء أن القطع الأثرية ظهرت بعد 14 يوما من التثبيت مع إف 2. تم الحفاظ على الأنسجة المعوية لمدة تصل إلى 14 يوما مع الفورمولا 1 و 7 أيام مع الفورمولا 2. لذلك يمكن الاستنتاج أن الفورمولا 1 هو مثبت جيد لأنسجة الكبد والكلية ، ولكن يجب تجنبه للحفاظ على الأنسجة الغنية بالدهون. وبالنسبة للفورمولا 2 ، فهو مادة حافظة ممتازة للأنسجة العصبية ، وبالتوازي مع ذلك فهو غير مناسب للحفاظ على المصفوفة خارج الخلية .

الكلمات المفتاحية: النسيج ، التثبيت ، الفورمالديهايد ، المثبت البديل ، البنية المجهرية

Résumé

Notre étude a porté sur la recherche de nouvelles formules de liquide fixateurs qui pourraient préserver les différentes structures et molécules cellulaires, comme solutions alternatives au formaldéhyde. Ce dernier est utilisé comme fixateur de routine pour les études histologiques et histopathologique, cependant il présente plusieurs inconvénients.

Deux formulations de liquide fixateurs F1 et F2 ont été utilisée : respectivement à base d'alcool et à base de sel. Le pouvoir fixateur et la qualité de fixation ont été comparés avec ceux du formaldéhyde (F) à 10%, en utilisant cinq tissus différents du rat Wistar : le tissu nerveux, cardiaque, hépatique, rénal et intestinal. La durée de fixation était après une période de 7, 14 et 21 jours. Après ces différentes périodes, les tissus ont subi une préparation histologique puis une coloration au violet de crésyl (Nissl) pour le cerveau et l'Hématoxyline et Eosine pour les autres tissus afin de réaliser des observations microscopiques de microstructure tissulaire des différents tissus.

En comparaison avec le fixateur F, les résultats ont montré que : le fixateur F1 n'a pas préservé les corps cellulaires et les fibres myéliniques du tissu nerveux pendant toutes les périodes, par contre le fixateur F2 a bien préserver ces structures, le tissu cardiaque a été préserver avec le fixateur F1 juste pour 7 jours, mais le fixateur F2 semble avoir un faible effet de conservation dans toutes les périodes. Le tissu hépatique a été très bien préserver avec le fixateur F1, en revanche le fixateur F2 a altérer son intégrité, le tissu rénal a été conserver avec les deux fixateurs F1 et F2, sauf que des artefacts sont apparue après 14 jours de fixation avec le F2. Le tissu intestinal a été préserver jusqu'à 14 jours avec le F1 et 7 jours avec le F2. On peut donc conclure que le F1 est un bon fixateur de tissue hépatique et rénal, mais il faut l'éviter pour la conservation des tissus riche en lipides. Et pour le F2, il est un excellent conservateur de tissus nerveux, en parallèle il ne convient pas à la préservation de la matrice extracellulaire.

Mots clés : Tissu, fixation, formaldéhyde, fixateur alternatif, microstructure

Abstract

Our study focused on finding new liquid fixative formulas that could preserve various cellular structures and molecules, as alternatives to formaldehyde. The latter is used as a routine fixative for histological and histopathological studies, but it has several drawbacks.

Two liquid fixative formulations, F1 and F2, were used: alcohol-based and salt-based, respectively. The fixative power and fixation quality were compared with those of 10% formaldehyde (F), using five different Wistar rat tissues: nervous, cardiac, hepatic, renal, and intestinal tissue. The fixation duration was 7, 14, and 21 days. After these different periods, the tissues underwent histological preparation and then stained with cresyl violet (Nissl) for the brain and hematoxylin and eosin for the other tissues to perform microscopic observations of the tissue microstructure of the different tissues.

Compared with F fixative, the results showed that: F1 fixative did not preserve the cell bodies and myelin fibers of the nervous tissue during all periods, on the other hand, F2 fixative preserved these structures well, cardiac tissue was preserved with F1 fixative only for 7 days, but F2 fixative seems to have a weak preservation effect in all periods. Liver tissue was very well preserved with F1 fixative, on the other hand, F2 fixative altered its integrity, kidney tissue was preserved with both F1 and F2 fixatives, except that artifacts appeared after 14 days of fixation with F2. Intestinal tissue was preserved up to 14 days with F1 and 7 days with F2. We can therefore conclude that F1 is a good fixative for liver and kidney tissue, but it should be avoided for the preservation of tissues rich in lipids. As for F2, it is an excellent preservative for nervous tissue; however, it is not suitable for preserving the extracellular matrix.

Key words : Tissue, fixation, formaldehyde, alternative fixative, microstructure

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La conservation adéquate des biospécimens est une étape cruciale pour garantir l'intégrité morphologique, histologique et moléculaire des échantillons destinés à l'étude diagnostique ou à la recherche biomédicale (Bancroft & Gamble, 2020). Parmi les différentes méthodes de conservation, la fixation chimique reste la plus couramment utilisée en histopathologie pour prévenir l'autolyse et la dégradation enzymatique des tissus (Kiernan, 2000). Le formaldéhyde, principalement sous forme de solution aqueuse à 10 %, est le fixateur de routine depuis plus d'un siècle grâce à sa capacité à induire des réticulations covalentes entre les groupements amines des protéines, assurant ainsi une stabilisation tridimensionnelle des structures cellulaires (Titford, 2009). Toutefois, le formaldéhyde commercial contient généralement une proportion de méthanol (4 à 15 %) ajouté pour empêcher la polymérisation spontanée du formaldéhyde libre en paraformaldéhyde (Fox et al., 1985). Or, la présence de méthanol peut accentuer certains effets de masquage antigénique au niveau des épitopes protéiques, réduisant ainsi la sensibilité des techniques immunohistochimiques et nécessitant des étapes supplémentaires de récupération antigénique pour exposer à nouveau les sites de liaison des anticorps (Werner et al., 2000). Cette contrainte technique peut altérer la qualité et la reproductibilité des analyses immunohistochimiques, particulièrement lors de l'étude de marqueurs faiblement exprimés. En parallèle, l'utilisation du formol présente des inconvénients majeurs pour la santé humaine et la sécurité des personnels de laboratoire. Classé cancérigène avéré pour l'homme (groupe 1, CIRC), le formaldéhyde est reconnu pour ses effets irritants et sensibilisants sur les voies respiratoires et les muqueuses oculaires (IARC, 2018). Une exposition chronique peut entraîner des troubles respiratoires, des dermatites de contact et augmente le risque de cancers nasopharyngés et de leucémies myéloïdes (Swenberg et al., 2013). Ces considérations toxicologiques soulignent la nécessité de développer et d'évaluer des fixateurs alternatifs moins nocifs, tout en conservant des performances comparables en termes de préservation morphologique et de compatibilité avec les techniques histologiques et immunohistochimiques modernes. Pour toutes ces raisons, nous avons souhaité formuler des fixateurs alternatifs, à base d'ingrédients moins toxiques, capables de préserver au mieux la morphologie des tissus et de rester compatibles avec les techniques immunohistochimiques. Dans ce travail, nous avons formulé deux fixateurs alternatifs. Le premier est à base d'alcool,

connu pour son pouvoir coagulant et sa capacité à préserver la cohésion cellulaire tout en limitant la rétraction tissulaire (Carson & Hladik, 2009 ; Fox et al., 1985). Le second est un fixateur à base de chlorure de zinc, reconnu pour son effet précipitant des protéines et sa capacité à stabiliser les membranes lipidiques (Hayat, 2000 ; Kiernan, 2000).

Dans ce contexte, plusieurs questions ont été posées :

- Est-ce que nous pouvons formuler un nouveau fixateur moins toxique ? Peut-il maintenir la même matrice extracellulaire ?
- Est-ce que ce fixateur peut conserver toutes les biomolécules de corps ?
- Est-ce que ce fixateur peut préserver la morphologie et la qualité des tissus pour les analyses immunohistochimie ?

L'objectif principal de cette étude est de comparer la qualité de fixation histologique entre un fixateur standard à base de formaldéhyde à 10 % et deux fixateurs expérimentaux : le premier formulé à base d'alcool, le second à base de sels. Cette comparaison vise à évaluer l'efficacité de chaque fixateur en fonction du type tissulaire, afin d'identifier une alternative moins toxique tout en préservant la morphologie et la qualité des tissus pour les analyses histologiques

CHAPITRE I :

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Méthode de conservation d'un bio-spécimen

1. Définition d'un bio-spécimen

Un biospécimen est un matériau biologique prélevé sur un organisme vivant (humain ou autre), destiné à la recherche scientifique, à l'analyse médicale ou à l'enseignement. Il comprend un large éventail de matériaux : tissus, cellules, fluides biologiques. Ces échantillons sont systématiquement collectés, traités et stockés selon des protocoles rigoureux au sein de biobanques, afin d'assurer la préservation de leur intégrité et la fiabilité des analyses ultérieures (Betsou et al., 2010 ; ISBER, 2018).

2. Type de bio-spécimen

Tableau I : Classification des biospécimens selon leur finalité de conservation, la méthode de conservation et les cibles biologiques

Type de biospécimen	Finalité de conservation	Exemple	Méthode de conservation	Cible concernée
Liquide	Biochimique	Sang	Centrifugation/ Congélation à -80°C	ADN/ARN, Protéine, métabolites
		Urine	Congélation avec / sans conservateur	Cellules renales, métabolites, microARN
		LCR	Congélation rapide à -80°C	Cellules inflammatoires, ADN, Protéine, agents pathogènes
	Morphologique	Liquide d'ascite / pleural	Centrifugation/ fixation à base d'Alcool	Analyse cytologique
	Biochimique	Foie Rein	Congélation à -80°C / azote liquide	ADN/ARN, Protéine natifs

Solide	Morphologique	Tissus (intestin, cœur, cerveau...	Fixation au formol 10%	Etude de la structure
			-Fixation au glutaraldéhyde tetroxyde d'osmium	Etudes de l'ultra structure

Betsou et al. (2010), Shabihkhani et al. (2014), ISBER (2018), IARC (2017)

II. Fixation

1. Type de fixation des tissus

La fixation est une étape essentielle en histologie. Elle vise à préserver la morphologie tissulaire, à prévenir l'autolyse enzymatique et la dégradation microbienne, et à stabiliser les macromolécules intracellulaires. Les fixateurs chimiques se divisent en deux grandes catégories : les coagulants (qui précipitent les protéines) et les non coagulants de pontage (qui créent des ponts covalents entre les macromolécules) (Eltoum et al., 2001).

1.1. Méthodes physiques

1.1.1. Fixation par la chaleur

La chaleur provoque la dénaturation et la précipitation des protéines. Cette méthode est principalement utilisée pour les microorganismes (ex. coloration de Gram), mais reste rare pour les tissus complexes en pathologie humaine car elle altère les ultrastructures (Eltoum et al., 2001).

1.1.2. Fixation par le micro-onde

Le chauffage par micro-ondes accélère les réactions chimiques du fixateur, réduisant considérablement le temps de fixation (jusqu'à moins de 20 minutes). Cependant, l'utilisation du formol avec cette méthode nécessite des précautions à cause de la libération de vapeurs toxiques (Eltoum et al., 2001).

1.1.3. Fixation par lyophilisation (freeze-drying)

La lyophilisation est utile pour conserver les petites molécules solubles. Les échantillons sont congelés puis séchés sous vide, ce qui empêche la perte des constituants diffusibles. Cette méthode est surtout utilisée en recherche (Eltoum et al., 2001).

1.2. Méthodes chimiques

Les fixateurs chimiques réagissent avec les constituants cellulaires pour stabiliser leur structure. On distingue deux types principaux : les fixateurs coagulants, qui précipitent les protéines, et les non coagulants, qui créent des ponts covalents entre les macromolécules (Eltoum et al., 2001).

1.2.1. Fixateurs coagulants**1.2.1.1. Fixateurs coagulants déshydratants**

Les solvants organiques comme l'éthanol, le méthanol ou l'acétone éliminent l'eau libre, provoquant la dénaturation des protéines

L'éthanol est efficace dès 70 % de concentration et permet une bonne préservation du glycogène.

Le méthanol, plus hydrophile, nécessite des concentrations plus élevées (80 % ou plus) pour induire la coagulation (Eltoum et al., 2001).

L'acétone agit rapidement, mais peut entraîner des pertes protéiques importantes.

1.2.1.2. Autres fixateurs coagulants

Acide acétique : précipite les acides nucléiques mais conserve mal les protéines.

Acide trichloroacétique : modifie les charges des protéines et les précipite.

Acide picrique : coagule les protéines en formant des sels avec les groupements basiques, mais peut provoquer l'hydrolyse des acides nucléiques à pH acide (Eltoum et al., 2001).

1.2.2. Fixateurs non coagulants de pontage**1.2.2.1. Le formaldéhyde**

Le formaldéhyde (le plus souvent utilisé sous forme de formol tamponné à 10 %) forme des ponts méthylène entre les groupements amines des protéines, assurant une bonne

conservation morphologique. Cependant, il peut altérer la reconnaissance antigénique, nécessitant des techniques de « récupération antigénique » (Eltoum et al., 2001).

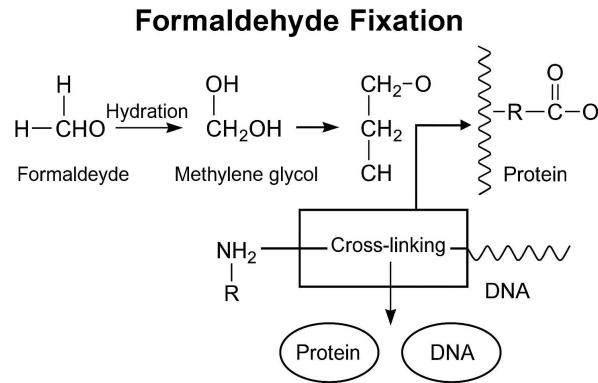


Figure : Fixation au formaldéhyde à l'échelle moléculaire

1.2.2.2. Autres fixateurs coagulants de pontage

Glutaraldéhyde : plus puissant que le formol, il assure une excellente fixation des ultrastructures pour la microscopie électronique, mais pénètre lentement et masque de nombreux antigènes (Eltoum et al., 2001).

Osmium tetroxyde : utilisé pour stabiliser les lipides, notamment en microscopie électronique. Il interagit fortement avec les doubles liaisons des acides gras (Eltoum et al., 2001).

Chlorure mercurique : utilisé dans des fixateurs comme B5 ou Zenker, il donne un excellent détail nucléaire mais est très toxique et peu utilisé actuellement (Eltoum et al., 2001).

Fixateurs combinés (Bouin, Hollande, B5) : ils associent coagulants et agents de pontage pour optimiser la fixation selon le type de tissu ou d'analyse (Eltoum et al., 2001).

2. La nécessité de la fixation des tissus biologiques pour l'étude morphologique

La fixation est un processus chimique fondamental pour la préservation des échantillons biologiques destinés à l'étude morphologique. Elle agit en stabilisant les structures cellulaires et tissulaires, principalement par la formation de liaisons chimiques entre les macromolécules (Carson et al 2009 ; Kiernan, 2015) . En fixant les constituants cellulaires,

la fixation prévient leur dégradation, notamment en stoppant deux processus destructeurs majeurs : l'autolyse et la putréfaction (Fischer et al., 2008).

L'autolyse résulte de l'action des enzymes lysosomales contenues dans les cellules elles-mêmes. Après la mort cellulaire, les membranes des lysosomes se désintègrent, libérant des hydrolases acides qui digèrent les composants intracellulaires, provoquant une autodigestion progressive du tissu (Bancroft et al ; 2020). La fixation inactive ces enzymes en les dénaturant ou en bloquant leur site actif, ce qui interrompt cette autodégradation.

Par ailleurs, la fixation empêche le développement bactérien et fongique en rendant le milieu inapte à la prolifération microbienne, limitant ainsi la putréfaction (Baker, 1958).

Le durcissement du tissu est une conséquence directe de la réticulation chimique provoquée par les agents fixateurs. Par exemple, le formaldéhyde forme des ponts méthylène ($-CH_2-$) entre les groupes amines des résidus lysine des protéines. Cette réticulation tridimensionnelle lie les protéines entre elles et avec d'autres macromolécules comme les acides nucléiques, consolidant ainsi l'architecture tissulaire (Fox et al., 1985). Ce réseau de ponts moléculaires stabilise la structure cellulaire, la rend plus rigide et plus facile à manipuler pour les étapes ultérieures comme l'inclusion, la coupe et la coloration (Kiernan, 2015).

Ainsi, la fixation est indispensable pour conserver l'aspect morphologique des tissus dans un état proche de leur état in vivo, en bloquant les processus enzymatiques destructeurs et en assurant une cohésion structurelle grâce aux liaisons chimiques formées au niveau moléculaire.

3. Facteurs influençant le choix du fixateur

- **Tampón et Ph**

Le pH du fixateur doit être contrôlé pour éviter la dénaturation excessive des protéines ou l'hydrolyse enzymatique. Un tampon (par exemple, tampon phosphate) stabilise le pH autour de 7,2–7,4, ce qui est optimal pour la préservation des structures cellulaires et moléculaires (Ramos-V, 2022). Un pH acide (<6) favorise la précipitation de protéines, mais peut altérer l'antigénicité. Un pH trop alcalin (>8) peut provoquer des artefacts de fixation et augmenter la digestion enzymatique.

- **Durée de fixation**

Une durée insuffisante de fixation permet une autolyse cellulaire partielle, tandis qu'une durée excessive peut provoquer une sur-fixation, entraînant une réticulation excessive des protéines (cross-linking) et une perte d'antigénicité, ce qui complique l'immunohistochimie ou l'extraction d'acides nucléiques. La durée idéale dépend du type de tissu, de son épaisseur et de la nature du fixateur (Dapson, 2023).

- **Taille du spécimen**

La pénétration du fixateur est limitée par la diffusion : environ 1 mm/h pour le formol neutre tamponné. Des spécimens trop volumineux entraînent des zones centrales mal fixées et sujettes à l'autolyse. La recommandation est de ne pas dépasser 5 mm d'épaisseur (Titford, 2022).

- **Température de fixation**

Une température plus élevée (37–56 °C) accélère la pénétration et la réticulation, mais augmente le risque d'artefacts de chaleur. La plupart des fixations sont réalisées à température ambiante (20–25 °C) pour équilibrer efficacité et qualité morphologique (Fitzgibbons et al., 2023).

- **Concentration du fixateur**

La concentration influence directement la force de Lorsque la concentration varie, les composants des cellules, le fixateur et la solution de fixation interagissent de manière différente. Plus la concentration est faible, plus la période de fixation est longue. Plus la concentration est élevée, plus les échantillons sont endommagés en annulant l'activité des enzymes. (Tuğba D, 2024)

- **Osmolarité et composition ionique**

L'osmolarité : Les membranes cellulaires composées de phospholipides sont affectées négativement par les stabilisateurs d'osmolarité basse ou élevée. Les solutions hypotoniques font gonfler les échantillons, tandis que les solutions hypertoniques les font rétrécir, il est donc préférable que le fixateur soit légèrement hypertonique. (Tuğba D, 2024)

4. Action du formaldéhyde dans le processus de fixation

La fixation au formol repose sur l'action du formaldéhyde, qui agit comme un agent de réticulation chimique (cross-linking) des composants cellulaires. À l'échelle moléculaire, le formaldéhyde (HCHO) réagit principalement avec les groupes aminés libres, notamment les résidus ε-amine des lysines présents dans les chaînes polypeptidiques. Cette réaction forme d'abord une base de Schiff instable (*iminium*), de type $R-N=CH_2$, qui évolue ensuite vers un pont méthylène ($-CH_2-$) stable reliant deux chaînes protéiques. Ce mécanisme génère un réseau tridimensionnel de liaisons covalentes qui fige les protéines dans une conformation stable, bloque l'activité enzymatique autolytique et limite la dégradation bactérienne. Ainsi, le formaldéhyde présente plusieurs avantages qui justifient son usage répandu en histologie. Il permet une conservation efficace de l'architecture cellulaire et tissulaire, assure une bonne pénétration dans les tissus, même à faible concentration, et offre une compatibilité élevée avec diverses techniques histologiques et de biologie moléculaire. De plus, les tissus fixés peuvent être conservés sur de longues périodes sans altération majeure de leur structure. Enfin, son faible coût et sa large disponibilité en font un agent de fixation de choix aussi bien en recherche fondamentale qu'en diagnostic anatomopathologique (Dapson, 2023), (Amir, 2024).

Bien que le formaldéhyde pénètre rapidement dans le tissu grâce à sa petite taille moléculaire, la formation complète des liaisons croisées est progressive et peut nécessiter 24 à 48 heures pour des échantillons de 4 à 5 mm d'épaisseur. Ce processus assure une bonne conservation morphologique et une compatibilité avec les colorations histologiques classiques. Cependant, les liaisons croisées peuvent masquer certains sites antigéniques, rendant souvent indispensable une étape de récupération antigénique (chauffage ou traitement enzymatique) pour certaines techniques de détection (Amir, 2024).

De plus, la réticulation du formaldéhyde peut fragmenter partiellement l'ADN et l'ARN, ou altérer leur accessibilité, ce qui justifie l'utilisation de protocoles d'extraction ou de désépissage adaptés pour les analyses moléculaires ultérieures. À la différence du glutaraldéhyde, qui possède deux groupes aldéhyde et forme des liaisons plus nombreuses et plus courtes idéales pour l'ultrastructure en microscopie électronique, le formaldéhyde offre un bon compromis entre pénétration rapide, stabilisation des structures tissulaires, et maintien partiel de l'intégrité des macromolécules (Reingruber, 2018).

5. Les inconvénients du formaldéhyde

Le formaldéhyde est un produit métabolique naturel, il a aussi des autres principales sources dans l'environnement par exemple les gaz d'échappement des voitures, les produits ménagers, les cosmétiques, La pollution industrielle, la combustion de biomasse, les conservateurs utilisés dans les laboratoires et les hôpitaux et le tabagisme, mais l'exposition à des concentrations élevées de celui-ci dans l'environnement peut augmenter le risque de toxicité aiguë et chronique chez l'homme (Reingruber, 2018), (Amir, 2024).

Le formaldéhyde est détecté par les sens humains à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 partie par million. En fait, le système national australien de notification et d'évaluation des produits chimiques industriels (NICNAS) a constaté que l'exposition au formaldéhyde à des concentrations comprises entre 0,1 et 1 ppm provoque des effets courants tels qu'une irritation du nez, de la gorge et des yeux, avec une augmentation des larmoiements. De plus, l'exposition chronique à des concentrations élevées de formaldéhyde entraîne des complications pour la santé, notamment des irrégularités menstruelles, des problèmes de grossesse, de l'asthme et des effets sur le système nerveux central tels que des maux de tête, de l'irritabilité, des troubles du sommeil, de la dépression et des sautes d'humeur (Amir, 2024).

Plusieurs études ont montré que le formaldéhyde est un irritant respiratoire et un déclencheur de l'asthme par différents mécanismes ou il entraîne le développement de l'asthme (Juleen L. 2021).

Le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le formaldéhyde comme une toxine cancérigène basant sur différentes études qui ont montré que l'inhalation du formol peut provoquer un cancer du nasopharynx chez l'homme et des carcinomes épidermoïdes dans les voies nasales des rats. (Hernán R,2018).

CHAPITRE II :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Durée et lieu de la réalisation du travail expérimental

L'objectif principal de cette étude est de comparer la qualité de fixation histologique entre un fixateur standard à base de formaldéhyde à 10 % et deux fixateurs expérimentaux : le premier formulé à base d'alcool, le second à base de sels, Cette comparaison vise à évaluer l'efficacité de chaque fixateur en fonction du type tissulaire, afin d'identifier une alternative moins toxique tout en préservant la morphologie et la qualité des tissus pour les analyses histologiques. Les tests ont été menés sur des organes issus de rats albinos (*Rattus norvegicus*) représentant différents types tissulaires : cerveau, cœur, intestin, foie et rein.

Ce travail a été réalisé au niveau de l'école supérieure des sciences d'aliment et des industries agro-alimentaires (ESSAIA) au cours du début du mois d'avril- juin.

2. Matériel biologique

Les tests ont été menés sur des organes cerveau, cœur, intestin, foie et rein de rats albinos *Rattus norvegicus*. Les animaux (N= 4) étaient âgés de six mois au moment de l'expérimentation, avec un poids corporel moyen de 250 g (Pesés avec une balance), en plus ils ont été élevés dans des conditions standards de laboratoire : température contrôlée (22 ± 2 °C), cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau pendant 4 jours, enfin ils ont été euthanasiés.

2.1. Prélèvement

Les sacrifices des rats sont réalisés après une anesthésie par l'inhalation de chloroforme dans l'après Midi pendant 10 minutes (conformément aux normes éthiques d'expérimentation animale). Dès que l'état d'inconscience est confirmé, l'ablation des différents organes vitaux (le cœur, le foie, les reins, l'intestin et le cerveau) été effectuée rapidement et rinçait dans l'eau physiologique afin d'éliminer l'excès de sang, puis immergés successivement dans trois types de fixateurs chimiques : formaldéhyde 10 %, fixateur à base d'alcool et fixateur à base de sel.

3. Matériels non biologiques

Le matériel englobe les équipements et les produits utilisés en techniques histologiques (microtome, étuve, plaque chauffante, bain marie, microscope munie d'une caméra numérique). Les produits : (éthanol, xylène, milieu de montage, hématoxyline, éosine, sel de zinc, lames, lamelles). La liste détaillée de ces matériaux est fournie en annexe.

4. MÉTHODES

4.1. Formulation des liquides fixateurs

4.1.1. Liquide fixateur classique de formaldéhyde 10% dans le tampon phosphate (F)

Le formaldéhyde concentré 37% a été dilué dans le tampon phosphate pH =7.2. (voir fiche technique en annexe 2).

4.1.2. Formulation du liquide fixateur à base d'alcool(F1)

Le liquide fixateur à base d'Alcool (F1) a été formulé avec d'éthanol pure, l'isopropanol, acide acétique glacial, le glycérol et un tampon phosphate (pH 7,2) (voir fiche technique en annexe 2). Le mélange a subi une agitation sous à température ambiante pendant 10 minutes. Le pH a été ajuster avec un tampon phosphate à 7.

Le liquide fixateur a été conservé dans un flacon en verre sombre à température ambiante jusqu'à utilisation.

4.1.3. Formulation de liquide fixateur à base de sel de zinc (F2)

La formulation du fixateur à base de zinc a été réalisée à base de chlorure de zinc ($ZnCl_2$), chlorure de sodium (NaCl), saccharose (voir fiche technique en annexe 2). Une solution tampon Tris-HCl (pH 7.4) a été préparée pour ajuster le pH de la solution à 6.9. Le liquide fixateur a été stocké à température ambiante jusqu'à l'utilisation.

4.2. Protocole de fixation

La fixation des tissus est une étape critique, qui préserve les composants cellulaires et maintient leur structure naturelle. La fixation empêche l'activité des enzymes responsables de l'autolyse et la putréfaction, afin de conserver l'échantillon dans un état le plus proche que possible de l'état in vivo.

Les organes après prélèvement et rinçage à l'eau physiologique ont été mis dans des cassettes et plongés dans les liquides fixateurs F, F1, F2, pendant les périodes suivantes : 7 jours, 14 jours et 21 jours.

Après 7 jours de fixation, puis 14 jours puis 21 jours, les organes ont été rincés avec l'eau distillé avant de procéder à la déshydratation.

4.3. Technique histologique

4.3.1. Préparation des blocs de paraffine

4.3.1.1. Déshydratation et éclaircissement

Les étapes de déshydratation sont réalisées à l'aide d'une automate de circulation au laboratoire d'histologie, les cassettes renfermant les tissus sont mises dans le panier puis il est plongé automatiquement dans les bacs contents les alcools à différentes concentrations (70°, 95°, 100°), xylène pour l'éclaircissement (l'élimination d'alcool), et paraffine.

4.3.1.2. Imprégnation et inclusion à la paraffine

Après le dernier bain de toluène, les échantillons sont automatiquement plongés dans deux bains de paraffine à 60°C pendant 13 heures pour chacun, afin de faire la paraffine diffuser dans les tissus qui va les rigidifier et conserver ses structures au moment de la coupe.

Cette étape est réalisée en utilisant un distributeur de paraffine.

Les échantillons contenus dans la cassette sont soigneusement placés dans un moule métallique contenant déjà une petite quantité de paraffine fondue. Ce moule est ensuite placé sur une plaque froide afin que la paraffine se solidifie et fixe l'organe. La cassette est ensuite placée dessus, indiquant le nom de l'organe, le type de fixateur et la durée de fixation. Enfin, les échantillons sont à nouveau immergés dans la paraffine fondue à travers les grilles de la cassette afin de garantir une couverture complète de l'échantillon. Ils sont ensuite placés sur une plaque froide, puis placés au congélateur.

Après refroidissement, des blocs de paraffine dur est obtenu et prêt à couper.

4.3.2. Coupe au microtome

Les blocs obtenus sont fixés dans le porte-bloc du microtome, après avoir réglé l'épaisseur de coupe à 3µm les blocs sont sectionnés doucement, les coupes s'enroulent en ruban qui est récupéré délicatement à l'aide d'un pinceau.

4.3.3. Etalement des coupes

Les rubans obtenus sont déposés délicatement dans un bain-marie réglé à 49° C afin d'éviter la formation des plis. Les coupes sont ensuite collectées sur des lames en verre propres marquées le nom d'organe, le type de fixateur et la durée de fixation, puis les lames sont séchées dans une étuve réglée à 70° C pendant 10 minutes pour faire fondre la paraffine.

4.3.4. Préparation des coupes pour la coloration

4.3.4.1. Réhydratation

Le déparaffinage sert à l'élimination de la paraffine du tissu et le remplacé par l'eau pour permettre la rentrée des colorants réactifs. Les lames sont ainsi immergées dans deux bains de xylène de 5 min chacun.

La réhydratation est pour but de remplacer le xylène par de l'eau, grâce à une série de bains d'alcool à concentrations décroissantes (100%, 95%, 70%).

4.3.4.2. Coloration à l'hématoxyline et éosine (H&E)

- **But :**

Le but de coloration en histologie est de rendre visibles les structures cellulaires et tissulaires au microscope optique. Dans notre étude nous avons utilisé l'hématoxyline de Carrazi et l'éosine pour tous les types de tissus sauf le cerveau que nous avons coloré en violet de crésyl (coloration de Nissl).

L'hématoxyline qui est basique colore les structures acides en bleu violet (les noyaux), par contre l'éosine (acide) colore les structures basiques en rouge à un rose (le cytoplasme).

La coloration de Nissl est particulièrement utilisée pour le tissu nerveux, cette coloration utilise le violet de crésyl basique qui colore les corps de Nissl en violet.

- **Principe :**

Les coupes sont d'abord colorées à l'hématoxyline pendant 6 minutes pour marquer les noyaux, ensuite elles sont immergées dans l'éosine pendant 1 minute pour colorer le cytoplasme, les coupes histologiques du cerveau sont colorées au violet de crésyl pendant 20 minutes (voir fiche technique en annexe 2).

4.3.5. Montage

Après la coloration, il y'a une étape de déshydratation, qui consiste à retirer complètement l'eau des tissus avant le montage, par un passage des lames dans des bains croissants d'alcool 70%, 95%, 100%.

Deux bains de xylène pendant 5 minutes (le xylène rend les tissus transparents et permet une bonne distribution de milieu de montage).

Le montage est fait à l'aide d'un milieu de montage l'Eukitt. Après avoir plongés les lames et les lamelles dans le xylène, lamelle est fixée sur chaque lame par une petite goutte d'Eukitt.

Enfin les lames sont nettoyées, séchées à l'aire libre et rangées dans une boîte porte lames.

4.4 Observation et prise d'images

La prise de photos au microscope photonique est réalisée à l'aide d'une caméra (Optika) qui permet de capturer les images des coupes observées pour les analyser (x200, x400 et x1000).

CHAPITRE III :

RESULTATS

Chapitre III : RESULTATS

Après la dissection et la fixation des organes suivants : le cerveau, le cœur, le foie, les reins et l'intestin grêle dans les trois liquides fixateurs (F, F1, F2), après la réalisation de coupe histologiques, analyses microscopiques, nous avons obtenu les micrographies suivantes :

1. Contrôle de qualité de fixation du cerveau par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel

1.1. Fixation de 7 jours

Le tissu nerveux fixé au formaldéhyde 10% montre une architecture tissulaire préservée, où l'aspect des corps cellulaires neuronaux est bien conservé présentant une e forte densité (**fig 1 et 1'**). Les artefacts sont peu ou pas présents.

Par ailleurs, le fixateur d'alcool a aussi permis de maintenir l'architecture tissulaire. Cependant, les corps cellulaires neuronaux semblent avoir perdu leur intégrité (**fig 2 et 2'**), leur coloration est faible, en plus on observe une légère perte des fibres de myéline.

Pour la fixation à base de sel, une bonne intégrité tissulaire est observée, les fibres de myélines sont visibles, les corps cellulaires sont préservés, et bien colorés, avec l'absence d'artefacts (**Fig 3 et 3'**).

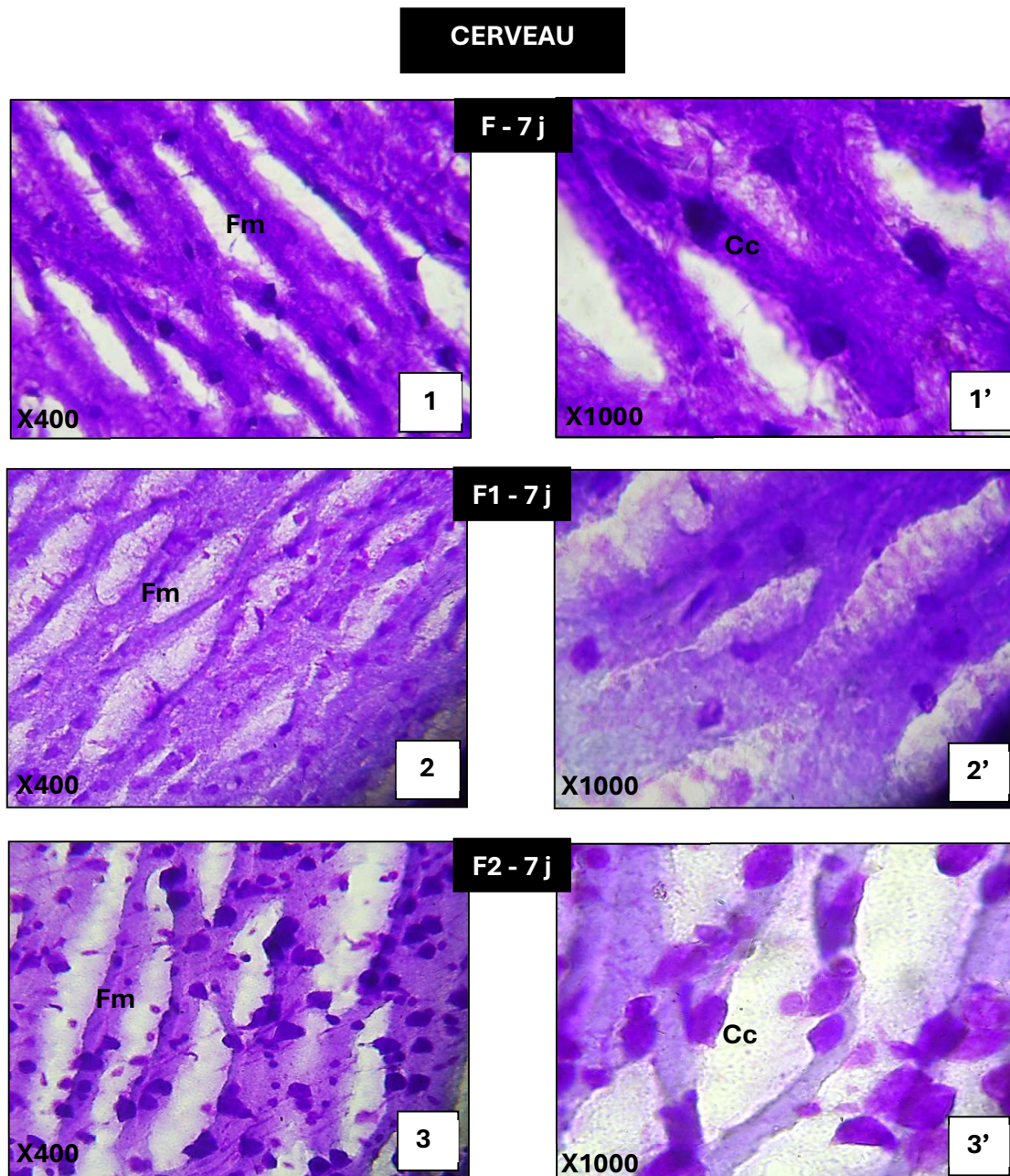


Figure 2 : Coupes histologiques de cerveau colorées au violet de crésyle

Fixation par 1-1' : F : formaldéhyde 10%. 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' : F2
fixateur à base de sel

Fm : fibre de myéline ; Cc : corps cellulaire

1.2. Fixation de 14 jours

Après 14 jours de fixation,

Les tissus fixés par le formaldéhyde 10% présente une faible dissolution des fibres de myéline (**Fig 1**) avec une faible apparition des corps cellulaires, la coloration est moins intense.

Le fixateur à base d'alcool a bien préservé les corps cellulaires, le contraste de coloration est remarquable (**Fig 2 et 2'**).

Le fixateur à base de sel a aussi préservé la forme des corps cellulaires, Ils sont bien délimités et bien visibles, mais d'un autre coté on peut observer des structures de filaments bien préservés (**Fig 3 et 3'**). La coloration était bien conservée.

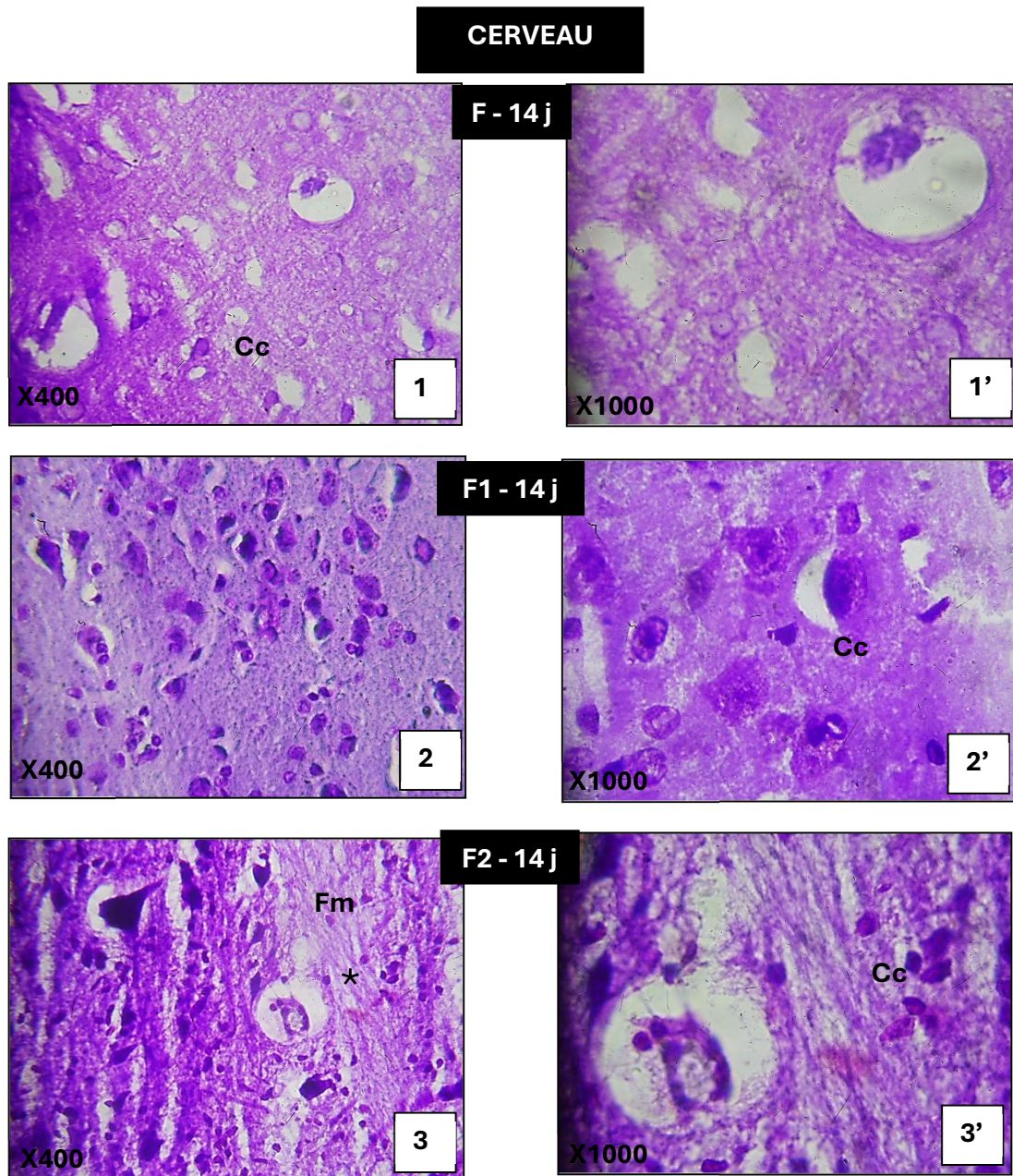


Figure 3 :_Coupes histologiques de cerveau colorées au violet de crésyle

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' : F2 : fixateur à base de sel

Fm : fibre de myéline ; **Cc** : corps cellulaire ; **Asterisks** : structures filamenteuses.

1.3. Fixation de 21 jours

Le tissu nerveux fixé par le formaldéhyde 10% pendant 21 jours montre une bonne intégrité tissulaire malgré la longue période de conservation comme le montre la **fig 1**. Les corps cellulaires sont bien visibles, un contraste de coloration préservé avec absence de rétraction.

Le fixateur à base d'alcool a maintenu la cohésion tissulaire, les corps cellulaires sont nombreux, leur attraction au colorant est intense (**Fig 2 et 2'**).

Le fixateur à base de sel a dissous les fibres lipidiques de myéline, l'architecture tissulaire conservée (**Fig 3**), les corps cellulaires neuronaux sont conservés, avec une coloration intense.

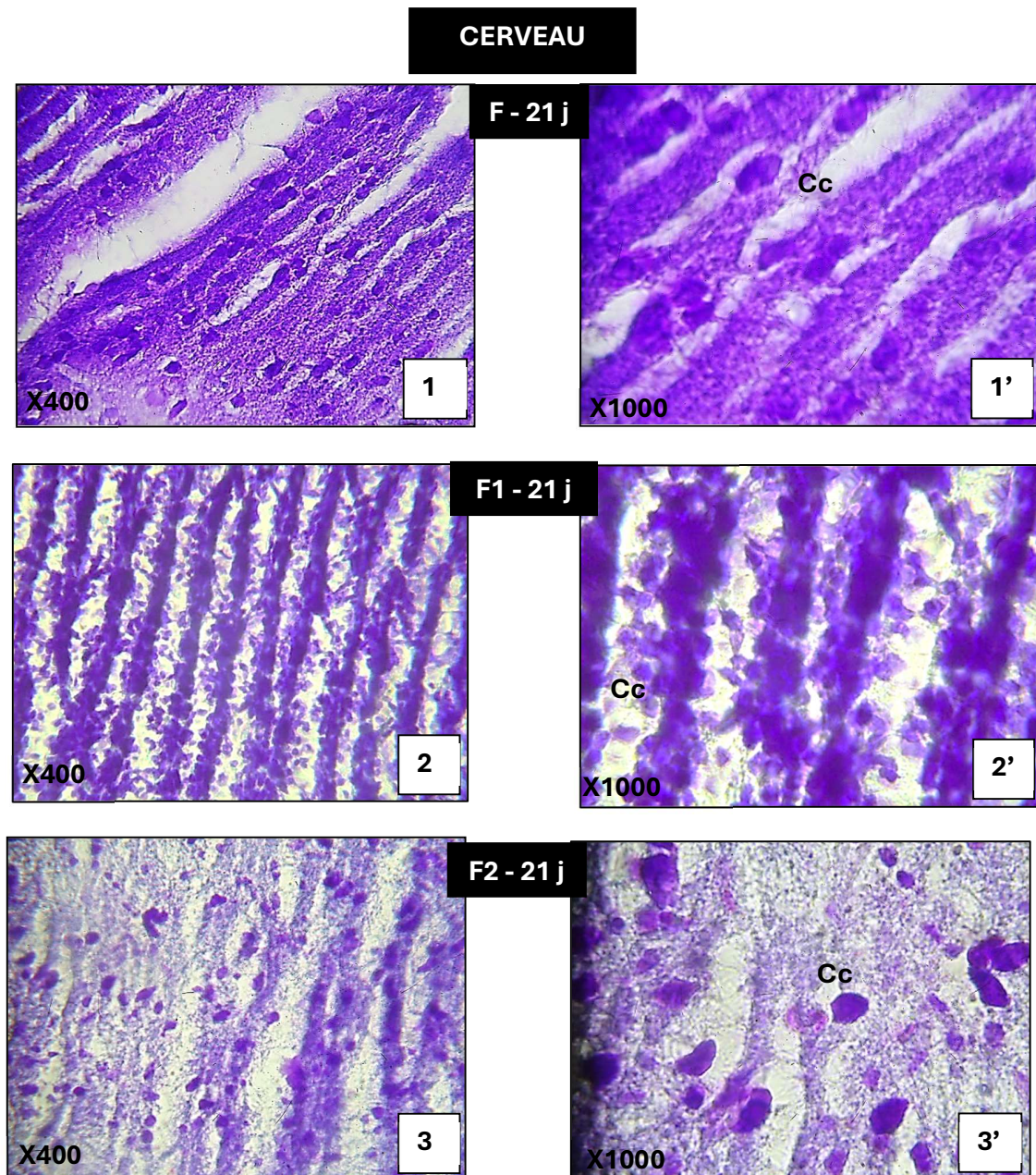


Figure 4 : Coupes histologiques du cerveau colorées au violet de crésyle

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' : F2 : fixateur à base de sel

Fm : fibre de myéline ; **Cc** : corps cellulaire

2. Contrôle de qualité de fixation du tissu cardiaque par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel

2.1. Fixation de 7 jours

La fixation au formaldéhyde 10% a permis une préservation optimale du tissu cardiaque. A l'échelle cellulaire les cardiomyocytes, présentent des noyaux de forme ovale (**Fig 1**).

Le fixateur à base d'alcool semble préserver le tissu. (**Fig 2**). Les cardiomyocytes ont un aspect normal, bien délimitées et noyaux ovales et bien visibles avec une coloration optimale (**Fig 2'**).

La préservation par le fixateur à base de sel est de faible qualité.

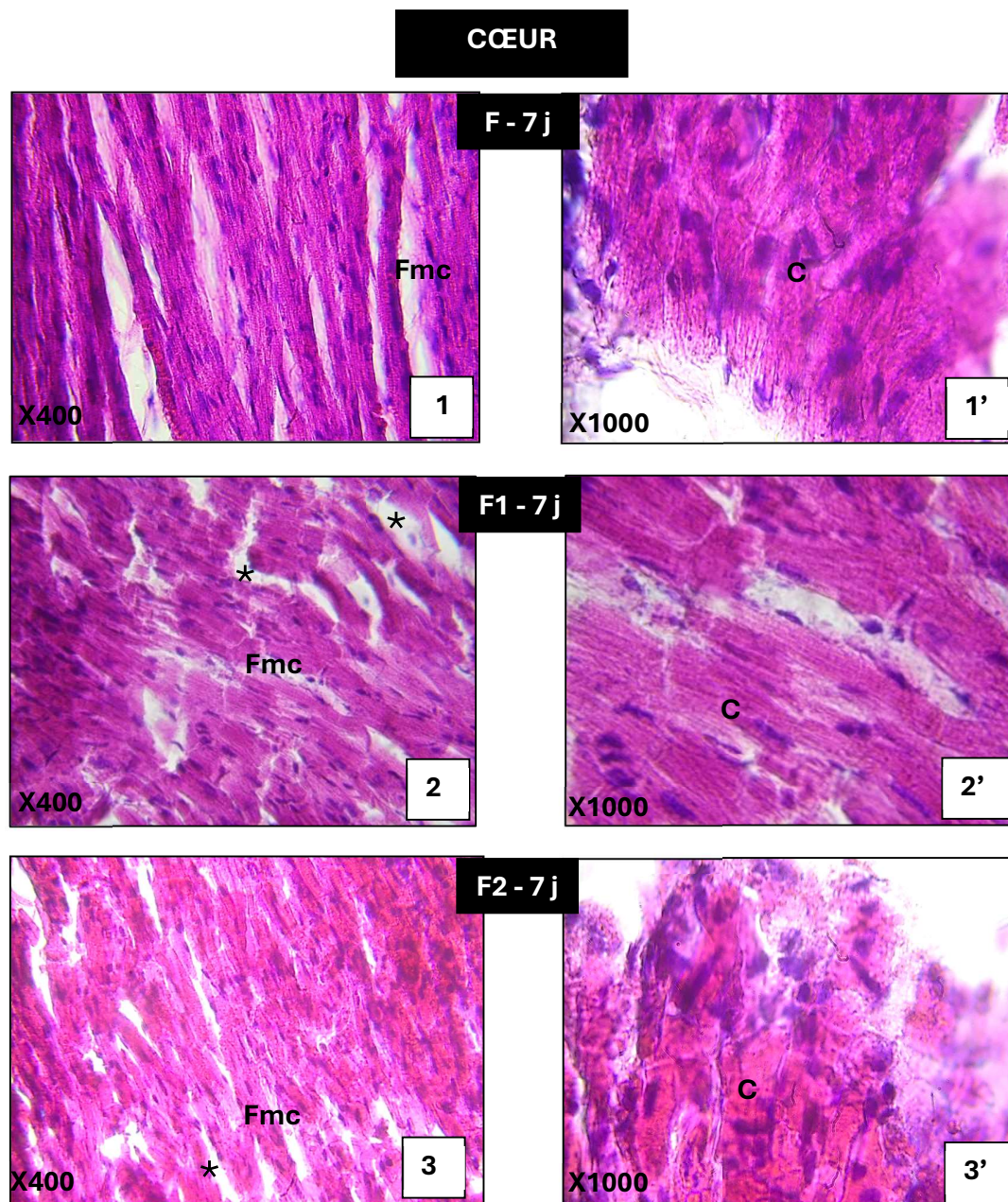


Figure 5 : Coupes histologiques du tissu cardiaque colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' : F2 : fixateur à base de sel

Fmc : fibre musculaire cardiaque ; **C** : cardiomyocytes ; **Asterisks** : la perte des éléments de la matrice extracellulaire.

2.2. Fixation de 14 jours

Après 14 jours de fixation par le formaldéhyde 10%, par le fixateur à base d'alcool et par le fixateur à base de sel, le tissu myocardique, semble perdre les éléments retrouvés de la matrice extracellulaire entre les fibres musculaires (**Fig 1, 2 et 3**).

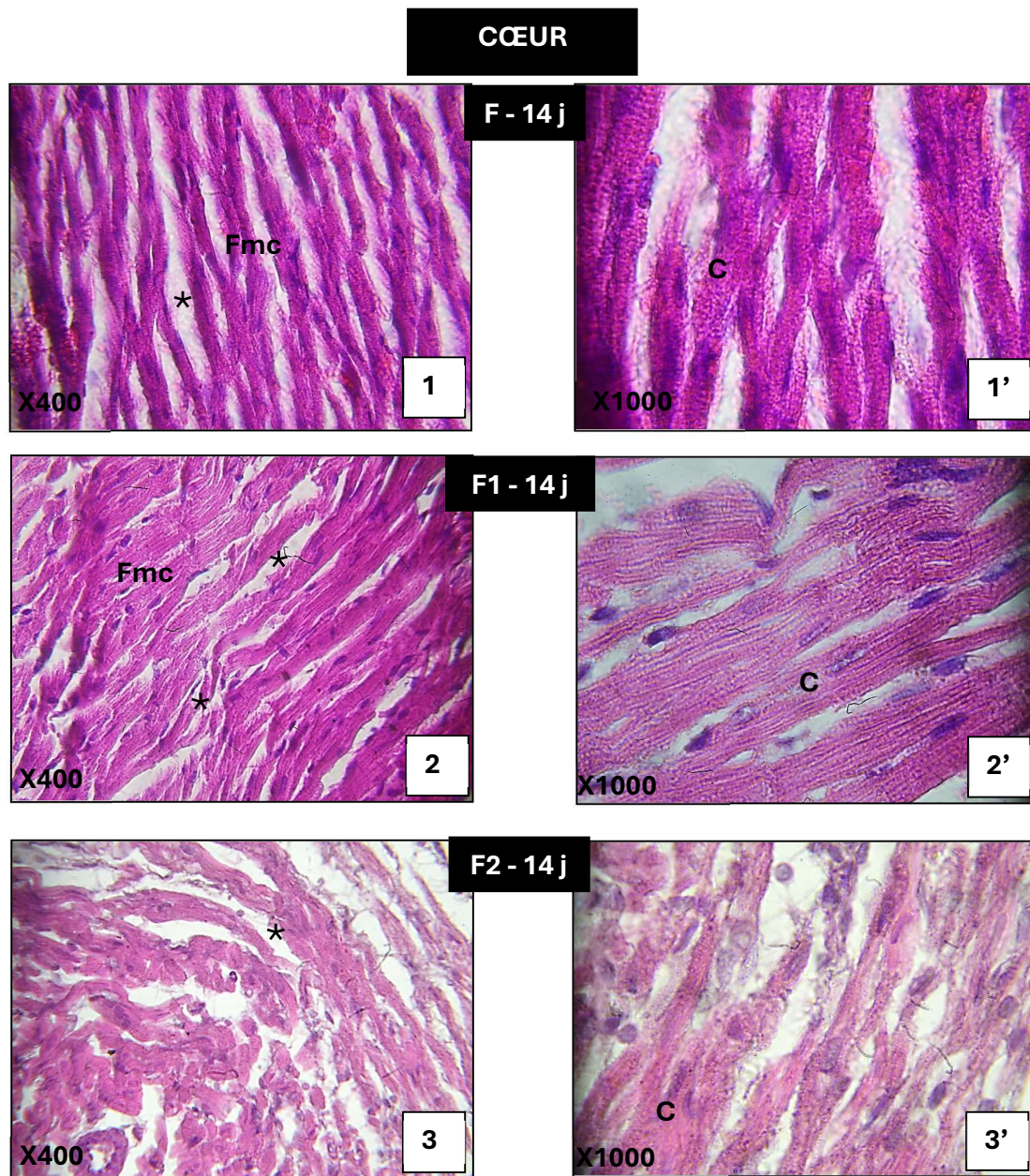


Figure 6 : Coupes histologiques du tissu cardiaque colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' : F2 : fixateur à base de sel

Fmc : fibre musculaire cardiaque ; **C** : cardiomyocytes ; **Asterisks** : la perte des éléments de la matrice extracellulaire.

2.3. Fixation de 21 jours

Après une durée de fixation de 21 jours, **les figures 1, 2 et 3** montre la même observation pour les trois fixateurs qui consiste à la perte des éléments qui compose la matrice extracellulaire.

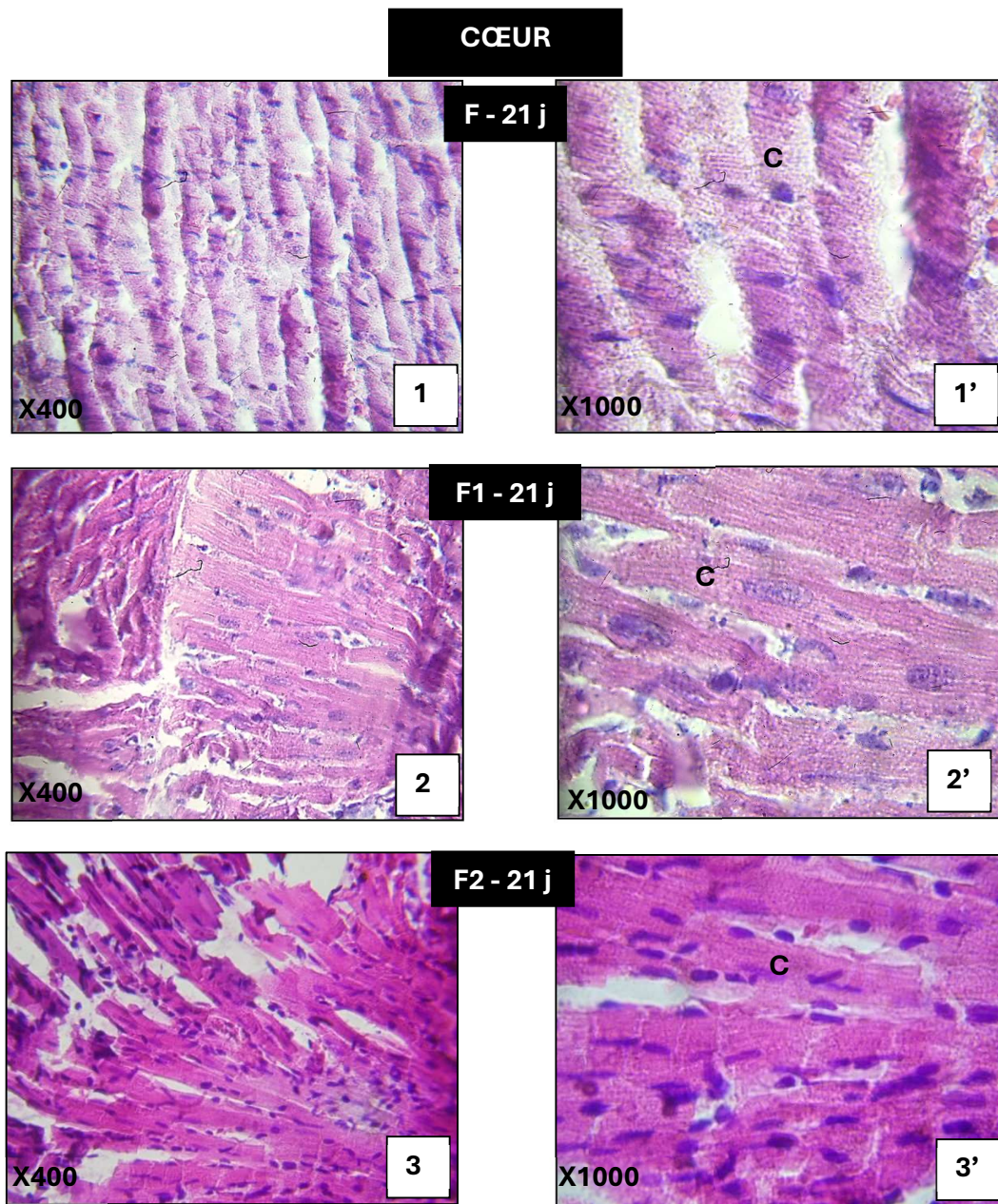


Figure 7 : Coupes histologiques du tissu cardiaque colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' : F2 : fixateur à base de sel

C : cardiomyocyte

3. Contrôle de qualité de fixation du tissu hépatique par les fixateurs formulés à base d'alcool et de

3.1. Fixation de 7 jours

Le formaldéhyde 10% ainsi que le liquide fixateur à base d'alcool montre une préservation optimale du tissu hépatique, les cellules sont bien délimitées et les noyaux bien apparents avec des espaces intercellulaire remplis de matrice extracellulaire (**Fig 1, 1', 2 et 2'**).

Cependant le fixateur à base de sel semble avoir un faible effet de conservation de l'intégrité tissulaire, des raréfactions sont observées entre les cellules (**Fig 3**).

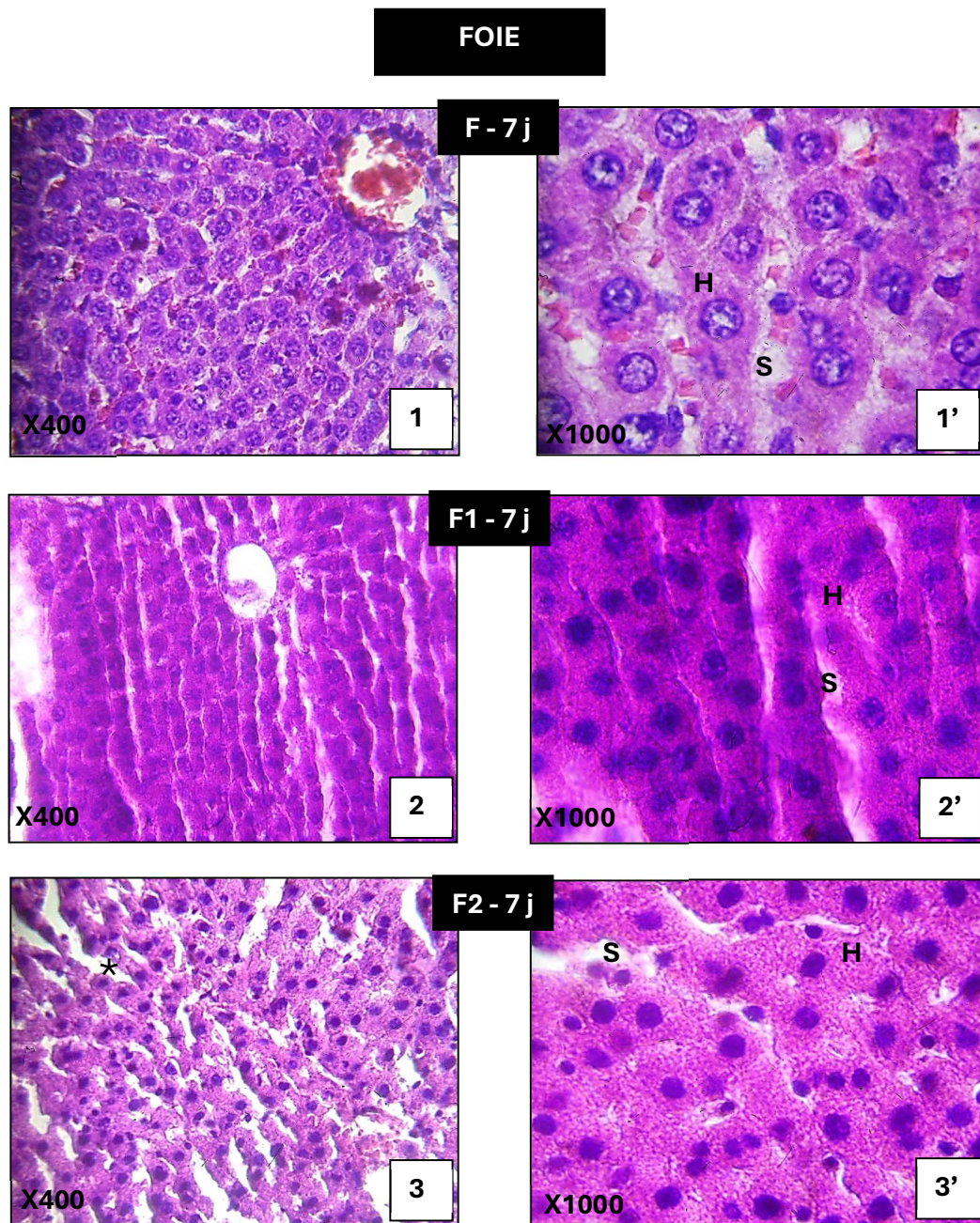


Figure 8 : coupes histologiques du tissu hépatique colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

H : hépatocyte ; S : sinusioïde ; Asterisks : des raréfactions

3.2. Fixation de 14 jours

Les mêmes observations de la durée de fixation de 7 jours, sont notées à 14 jours l'intégrité du tissu est préservé par le formaldéhyde et le liquide fixateur à base d'alcool (**Fig 1 et 2**). Cependant les espaces entre les fibres musculaire deviennent plus accentués en utilisant le liquide fixateur à base de sel (**Fig 3 et 3'**).

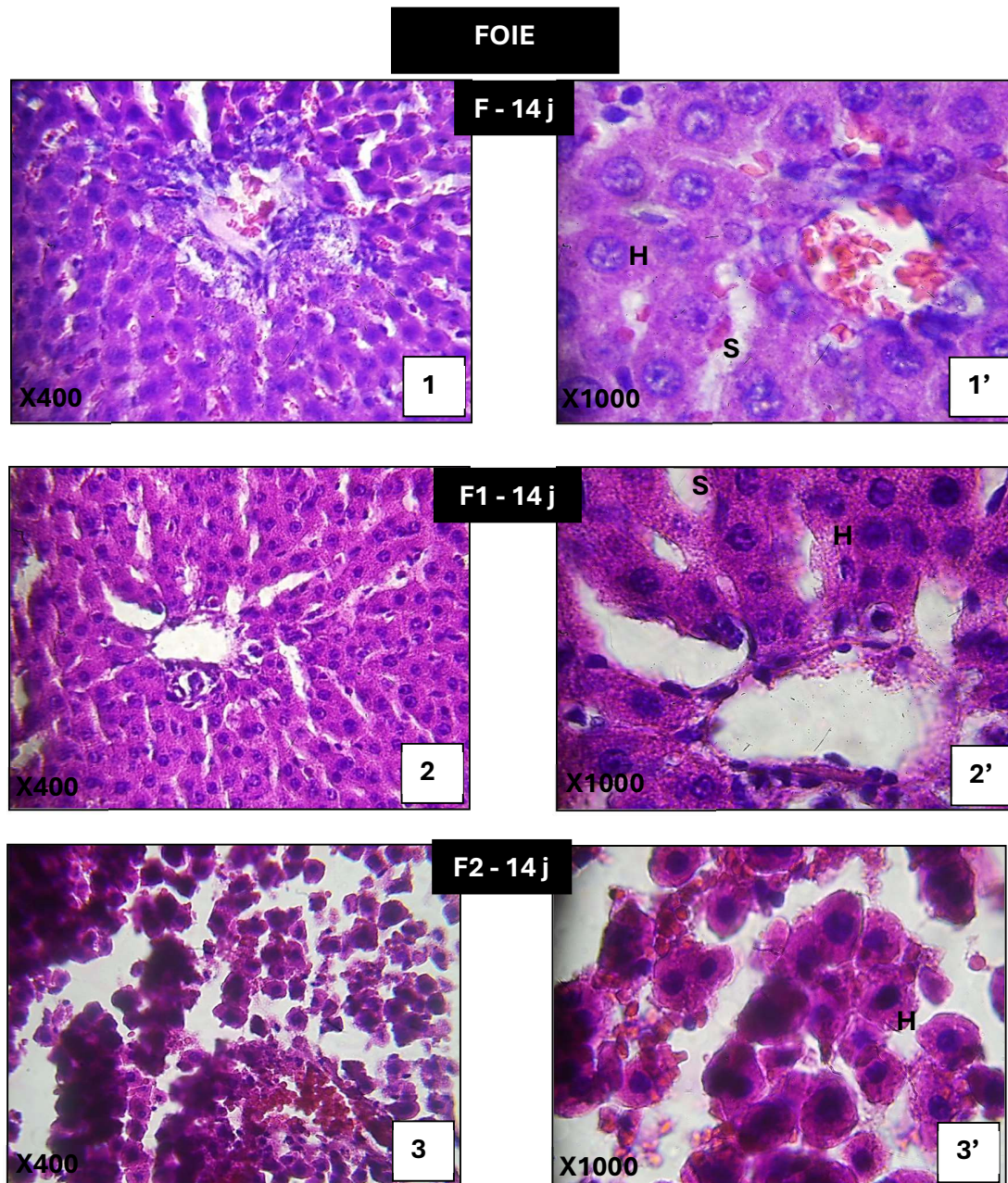


Figure 9 : coupes histologiques du tissu hépatique colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

H : hépatocyte ; S : sinusioïde

3.3. Fixation de 21 jours

Les mêmes observations de la durée de fixation de 7 et 14 jours, sont notées à 21 jours l'intégrité du tissu est préservé par le formaldéhyde et le liquide fixateur à base d'alcool (**Fig 1 et 2**). Cependant les espaces entre les fibres musculaire deviennent plus accentués en utilisant le liquide fixateur à base de sel (**Fig 3**).

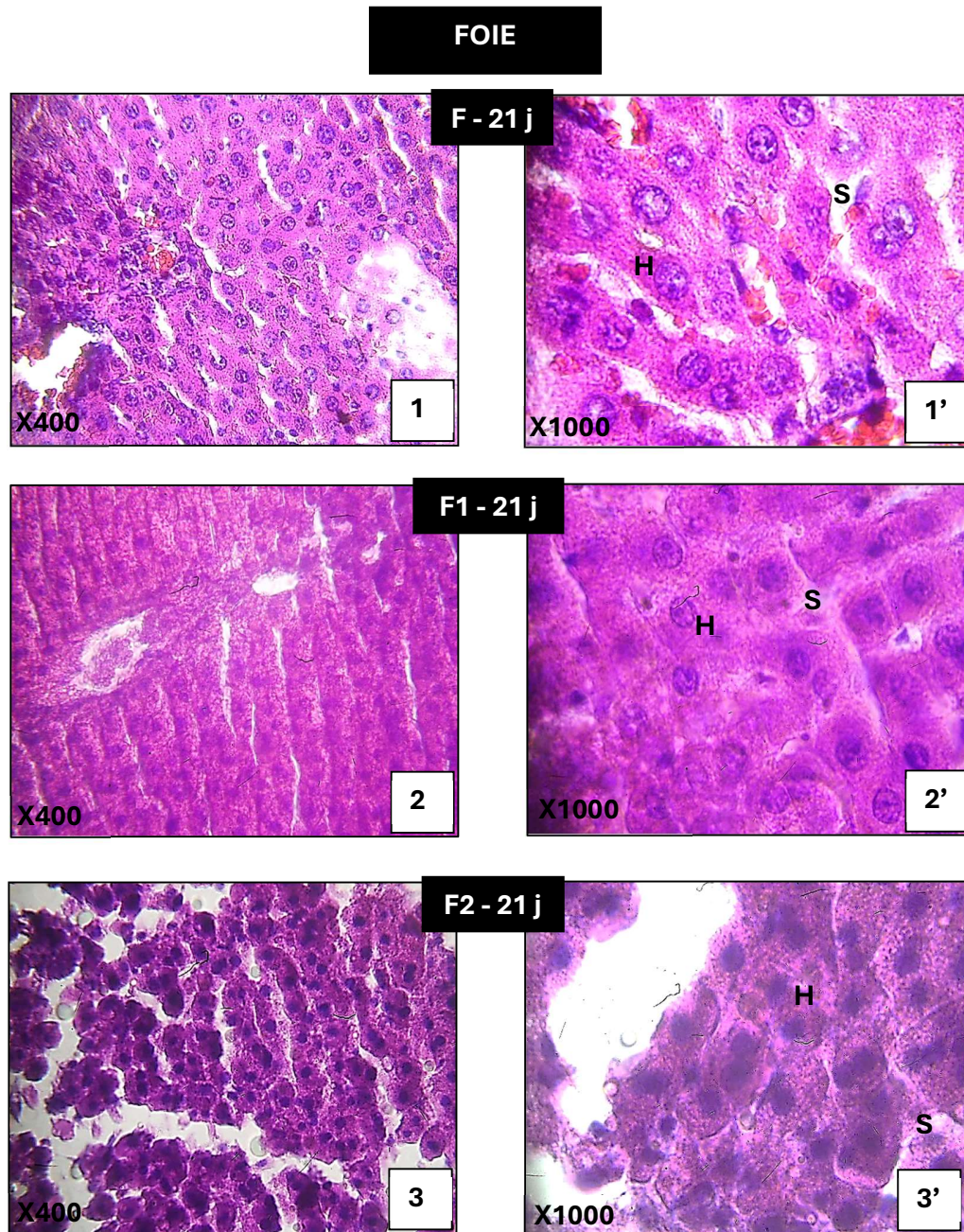


Figure 10 : coupes histologiques du tissu hépatique colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

H : hépatocyte ; S : sinusioïde

4. Contrôle de qualité de fixation du tissu rénale par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel**4.1. Fixation de 7 jours**

Le tissu rénal fixé par le formaldéhyde 10% révèle un aspect normal des cellules des corpuscules rénaux (glomérules et capsules de Bowman), avec les cellules des tubules rénaux, ils sont bien délimités, leur noyau est visible. En général l'intégrité tissulaire est préservée (**Fig 1 et 1'**).

Le tissu fixé par le fixateur à base d'alcool semble avoir conservateur inférieur au formaldéhyde (**Fig 2**). De même que pour le cas du fixateur à base de sel.

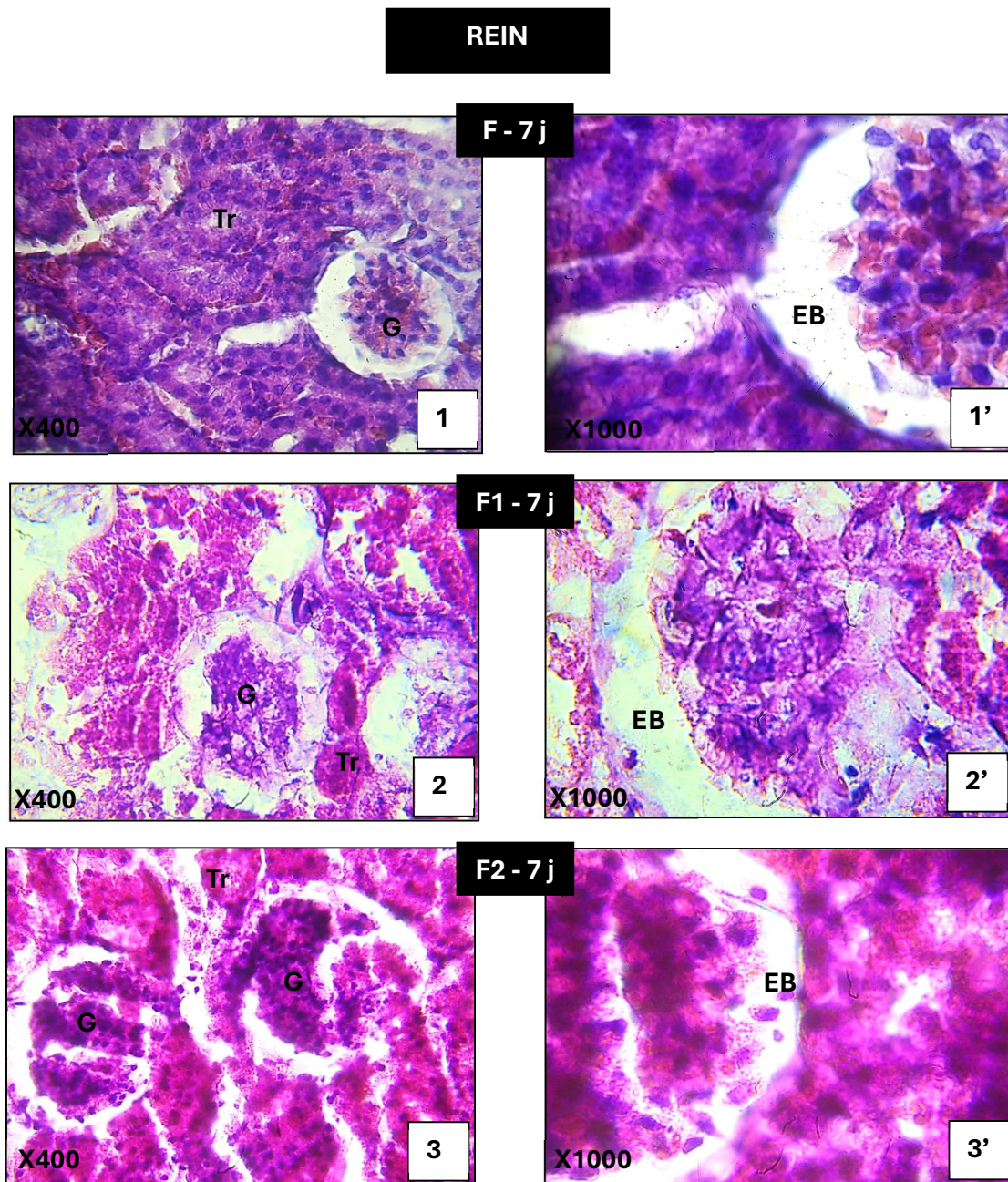


Figure 11 : coupes histologiques du cortex rénal colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

G : glomérule ; Tr : tube rénal ; EB : espace de Bowman

4.2. Fixation de 14 et 21 jours

Les mêmes observations sont notées pour la fixation d'une durée de 7 jours pour les trois fixateurs (**Fig 1, 2 et 3**). Avec une diminution de qualité tissulaire de tissu fixé par le fixateur à base de sel avec la prolongation du temps (présence de raréfactions entre les cellules (**Fig 3 et 3'**)).

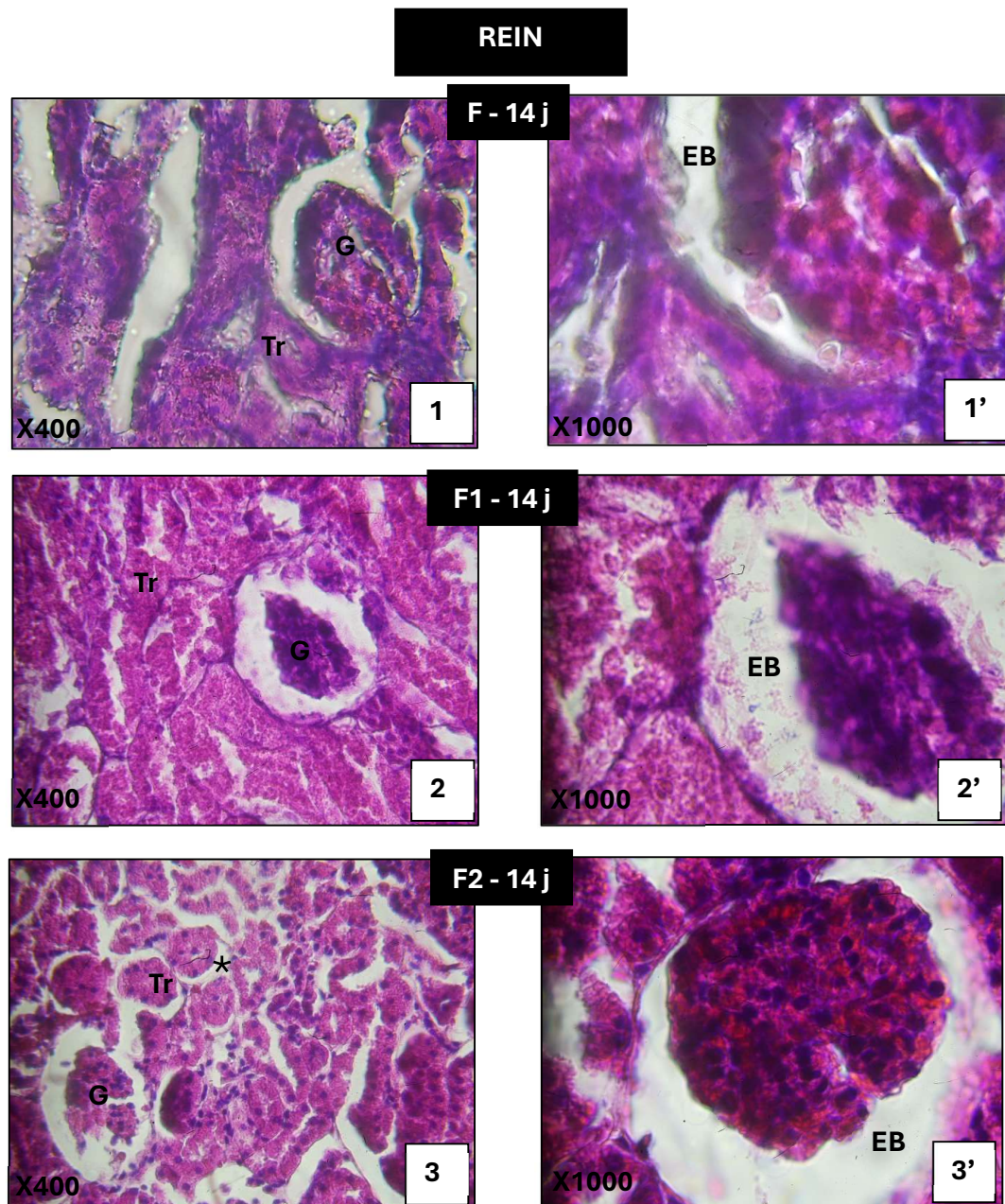


Figure 12 : coupes histologiques du cortex rénal colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

G : glomérule ; Tr : tube rénal ; EB : espace de Bowman

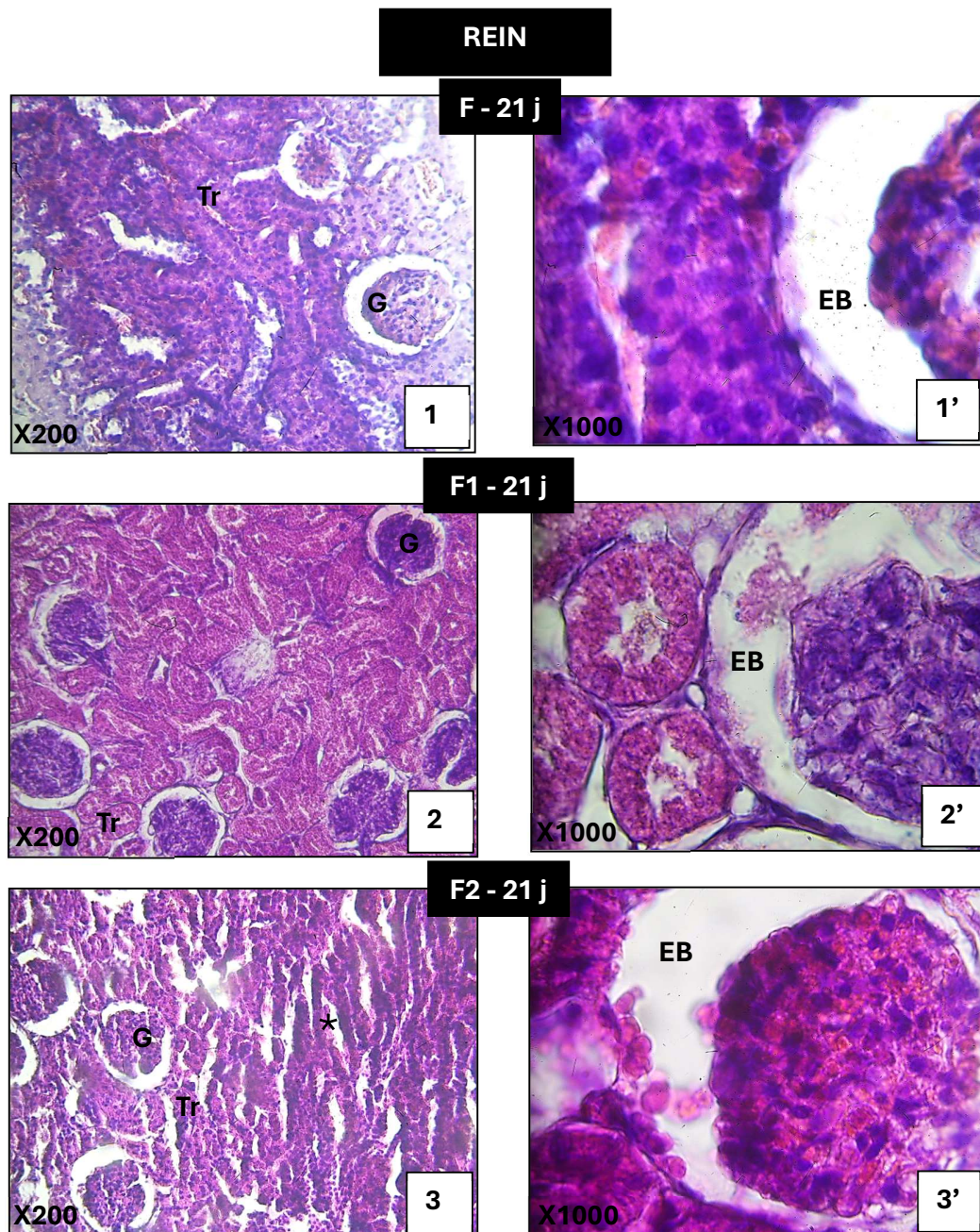


Figure 13 : coupes histologiques du cortex rénal colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' : F2 : fixateur à base de sel

G : glomérule ; Tr : tube rénal ; EB : espace de Bowman ; Asterisks : des raréfactions

5. 4. Contrôle de qualité de fixation du tissu intestinale par les fixateurs formulés à base d'alcool et de sel**5.1. Fixation de 7 jours**

Le formaldéhyde 10% a préservé l'intégrité et la cohésion tissulaire des différentes couches de l'intestin grêle (la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse), en plus il a conservé la morphologie naturelle des cellules (**Fig 1 et 1'**).

Les différentes couches de l'intestin grêle fixé avec le fixateur à base d'alcool ont été préservés, l'architecture globale du tissu est maintenue, avec une coloration optimale (**Fig 2**). De même que pour le fixateur à base de sel (**Fig 3**).

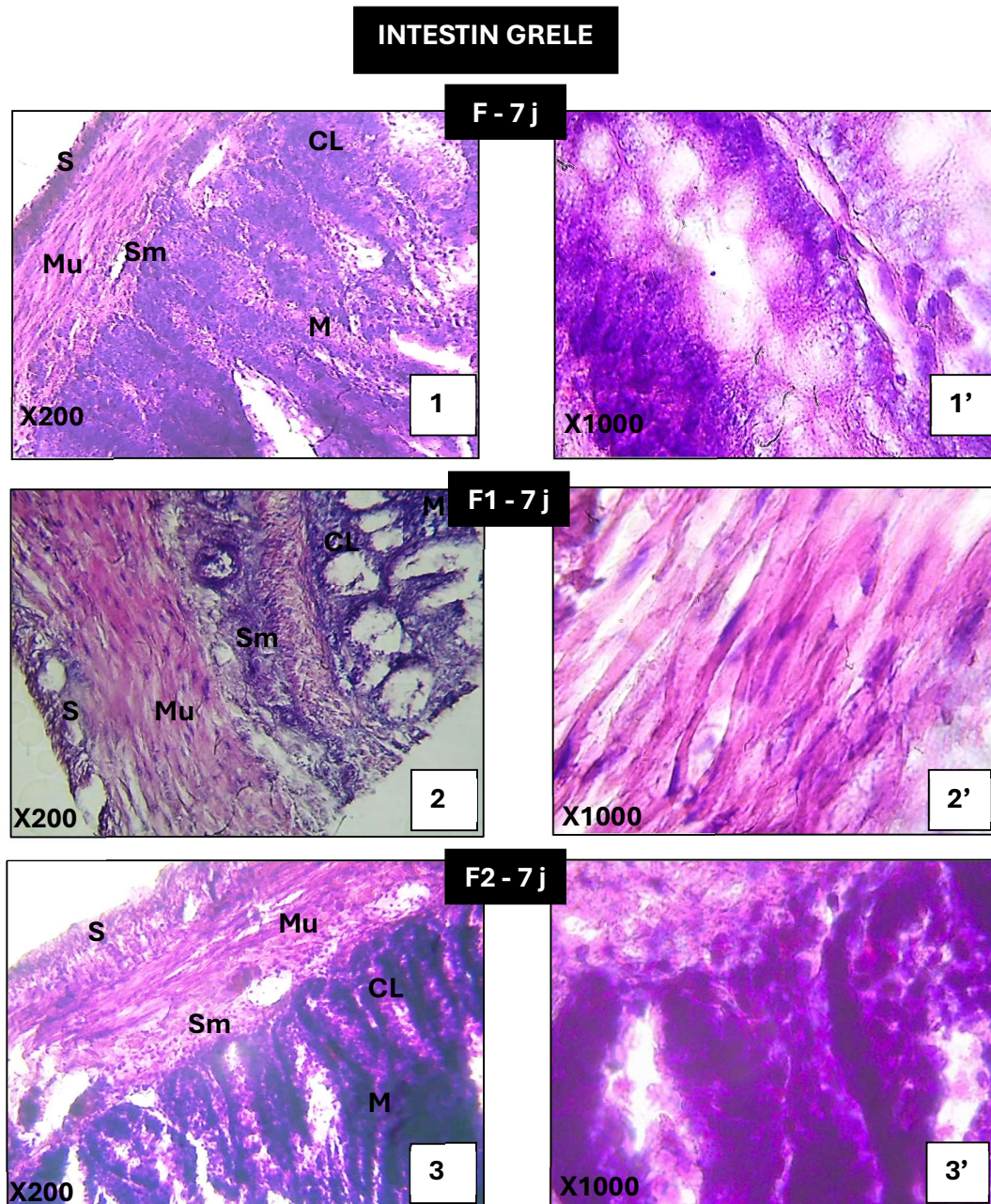


Figure 14 : coupes histologiques de l'intestin grêle colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

M : muqueuse ; Sm : sous-muqueuse ; Mu : musculature ; S : séreuse ; CL : crypte de Lieberkühn

5.2. Fixation de 14 jours

La coupe histologique montre une muqueuse intestinale bien préservée après fixation au formaldéhyde 10%, caractérisée par la présence de nombreuses cryptes de Lieberkühn, qui sont bien visibles (**fig 1**), les cellules épithéliales glandulaires sont délimitées, leur noyau est rond et bien visible comme le montre la figure B.

De même que pour De même que pour le fixateur à base d'alcool (**fig 2**).

Le tissu intestinale fixé avec le fixateur à base de sel montre une perte de l'intégrité tissulaire, et la présence d'artefacts (**fig 3 et 3'**).

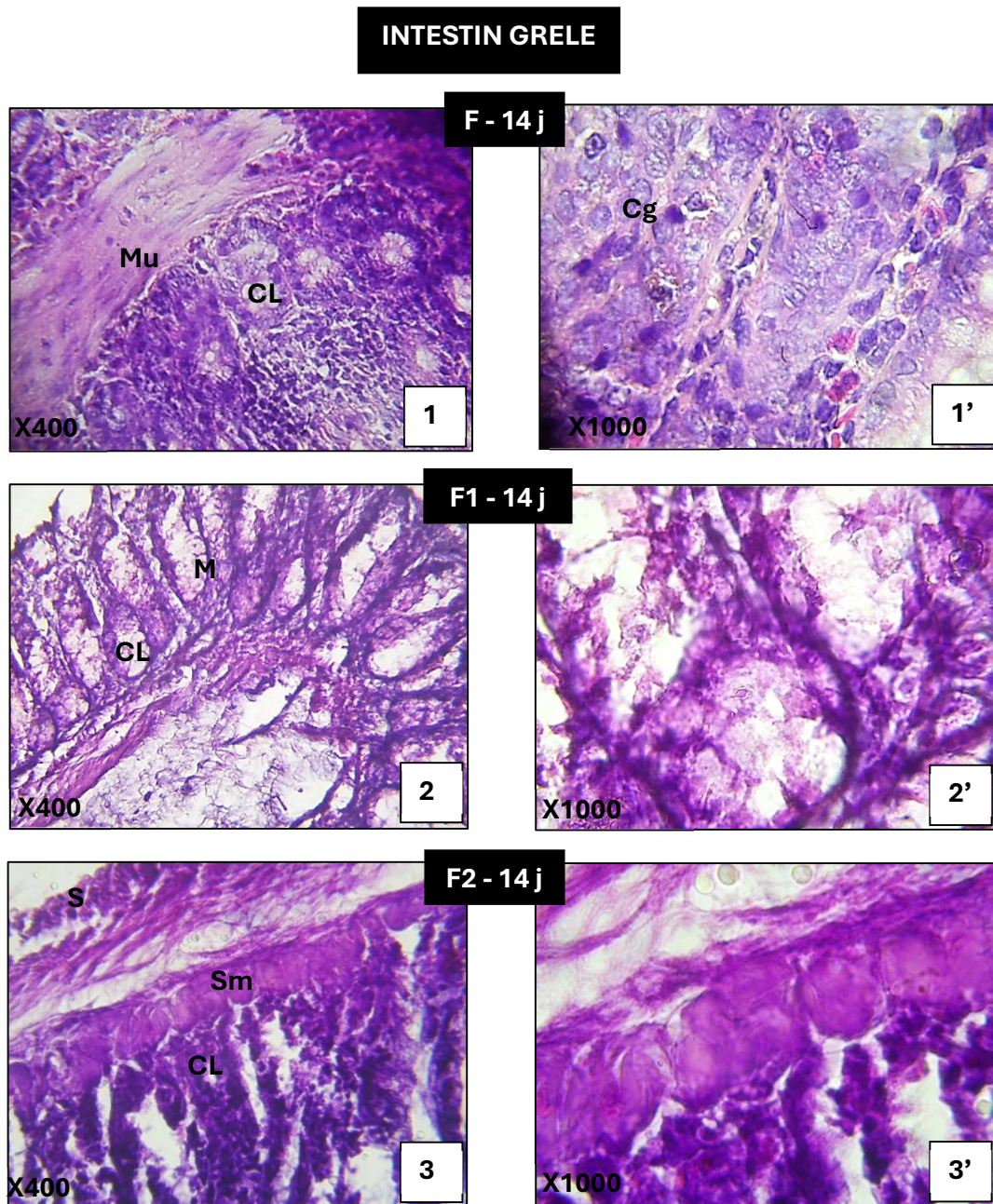


Figure 15 : coupes histologiques de l'intestin grêle colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

M : muqueuse ; **Sm** : sous-muqueuse ; **Mu** : musculature ; **S** : séreuse ; **CL** : crypte de Lieberkühn ; **Cg** : cellule glandulaire

5.3. Fixation de 21 jours

Après cette période de fixation par le formaldéhyde 10%, le tissu intestinale a montré une perte de qualité, les cellules glandulaires sont peu visibles, mais l'intégrité tissulaire en général est préservée de façon minimale (**Fig 1 et 1'**). La même observation est notée pour la fixation à base d'alcool (**Fig 2**). Pour le tissu fixé par le liquide fixateur à base de sel une désintégration des couches de la paroi intestinale est observée muqueuse, sous muqueuse, musculuse détachées les unes des autres (**Fig 3**).

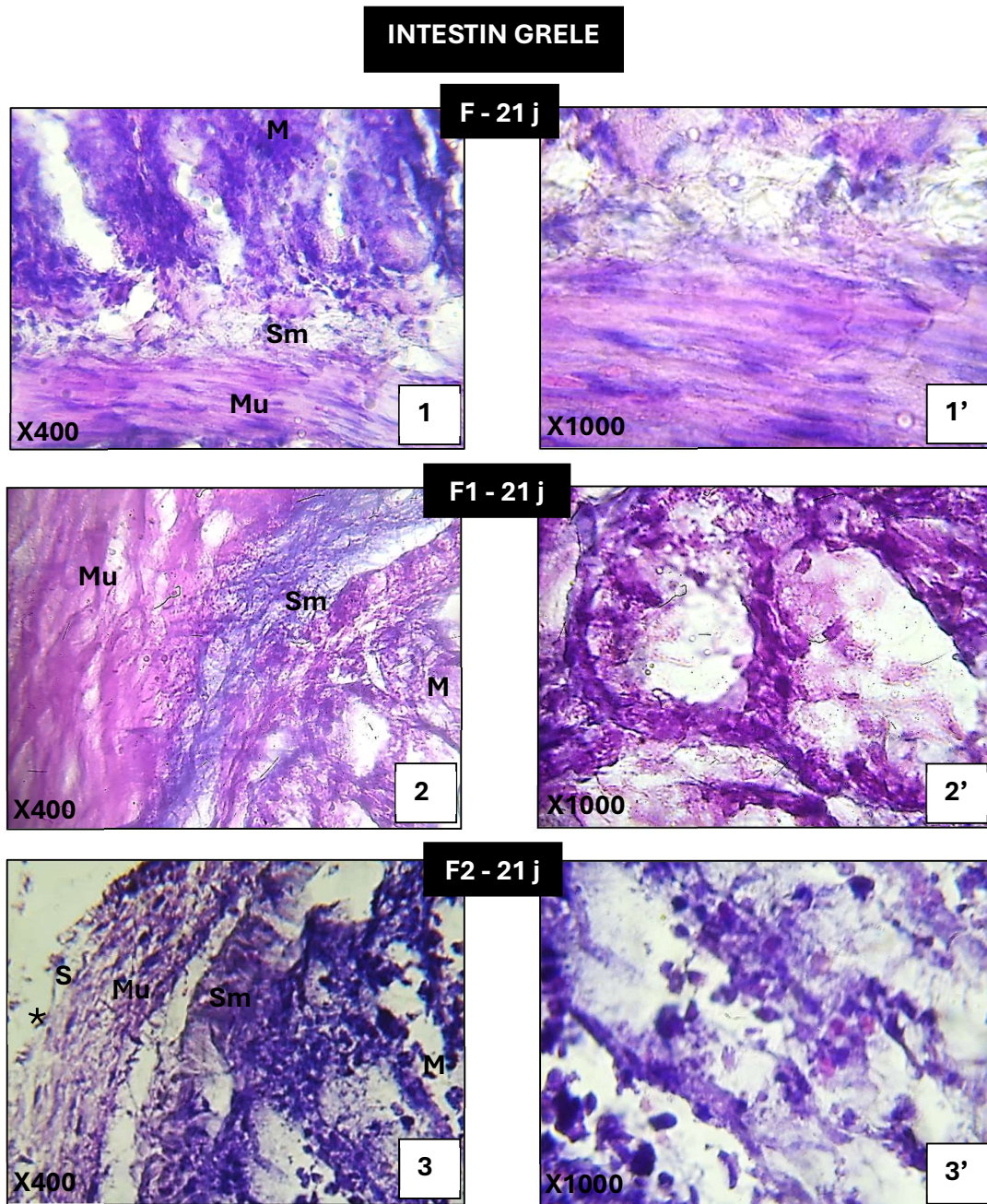


Figure 16 : coupes histologiques de l'intestin grêle colorées à H&E

1-1' : F : formaldéhyde 10%. : 2-2' : F1 : fixateur à base d'alcool d'alcool. 3-3' fixateur à base de sel

M : muqueuse ; **Sm** : sous-muqueuse ; **Mu** : musculature ; **S** : séreuse ; **CL** : crypte de Lieberkühn

CHAPITRE IV : DISCUSSION

Chapitre IV : Discussion

Dans notre travail nous avons procédé à une étude comparative de l'effet conservateur de différents liquides fixateurs : F : formaldéhyde 10 %, F1 : fixateur à base d'alcool et F2 (fixateur à base de sel) sur les tissus : nerveux, cardiaque, hépatique, rénal et intestinal du rat à différentes périodes : 7, 14, et 21 jours. Nos observations microscopiques ont démontré des différences qualitatives de la nature du fixateur, la nature du tissu et la durée de fixation.

Pour ce qui est du tissu nerveux, la fixation par le F, a montré une bonne préservation de la substance grise et des corps cellulaires neuronaux, avec une fixation partielle des lipides myéliniques en fonction du temps ceci s'explique par l'action du formaldéhyde qui fixe surtout les protéines par réticulation sans stabiliser complètement les lipides (Bancroft & Gamble, 2008).

Pour le F1, il a été observé une cohésion cellulaire progressive, avec une légère dissolution lipidique en fonction du temps, ceci s'explique par l'effet coagulant de l'éthanol et l'action combinée de l'isopropanol, du glycérol et de l'acide acétique qui équilibrent la déshydratation (Carson & Hladik, 2009).

Pour le F2, il a été observé une bonne préservation globale de l'intégrité neuronale avec stabilisation des lipides membranaires en fonction du temps ceci s'explique par le rôle du chlorure de zinc et du saccharose qui protègent les membranes lipidiques mais perdent en efficacité sur le long terme (Hayat, 2000).

Par ailleurs, le tissu cardiaque, sa fixation par le F a montré la bonne conservation des fibres myocardiques et des noyaux centraux jusqu'à 14 jours, ceci s'explique par la réticulation efficace des protéines contractiles par le formol (Bozzola & Russell, 1999).

Pour le F1, il a été observé une préservation au début avec apparition de fissures et de rétraction progressive en fonction du temps, ceci s'explique par l'effet déshydratant des alcools, partiellement compensé par le glycérol et l'acide acétique (Bozzola & Russell, 1999 ; Foxetal.,1985).

Pour le F2, une bonne préservation a été noté initialement avec dégradation partielle après 14 jours, ceci s'explique par la capacité du chlorure de zinc à coaguler les protéines mais aussi à provoquer un shrinkage (rétrécissement) cellulaire prolongé (Bancroft & Gamble, 2008).

Par ailleurs, la fixation du tissu hépatique

par le F a montré la préservation de l'architecture polygonale des hépatocytes et des sinusoides en fonction du temps ceci s'explique par la réticulation des protéines par le formol (Bancroft&Gamble,2008).

Pour le F1, il a été observé une conservation remarquable de l'intégrité cellulaire avec cohésion des cordons hépatocytaires en fonction du temps ceci s'explique par la synergie entre éthanol, isopropanol, glycérol et acide acétique qui limitent la rétraction (Carson & Hladik,2009).

Pour le F2, il a été observé une bonne préservation initiale suivie d'artefacts et de rétraction en fonction du temps ceci s'explique par l'effet du chlorure de zinc qui stabilise les protéines mais altère la matrice extracellulaire riche en collagène et d'autres filaments à long terme (Carson & Hladik, 2009).

Le tissu rénal, fixé par le F, a montré la bonne conservation des glomérules, de la membrane basale et des tubes rénaux en fonction du temps, ceci s'explique par la fixation des protéines intracellulaires par le formol (Bancroft & Gamble, 2008). Pour le F1, il a été observé une bonne préservation des structures parenchymateuses et de la matrice extracellulaire en fonction du temps, ceci s'explique par l'action combinée des alcools et du glycérol pour limiter l'autolyse et la rétraction (Carson & Hladik, 2009).

Pour le F2, il a été observé une bonne intégrité corticale mais avec fissures après 21 jours, ceci s'explique par la précipitation des protéines par le $ZnCl_2$ et l'effet protecteur du NaCl, avec apparition de shrinkage à long terme (Kiernan, 2000).

Le dernier tissu, le tissu intestinal sa fixation par le F a montré une conservation optimale des différentes couches de la paroi intestinale en fonction du temps, grâce à l'action du formol qui fixe efficacement les protéines tout en maintenant l'architecture générale du tissu (Bancroft & Gamble, 2008).

Pour le F1, il a été observé une bonne cohésion épithéliale et une structure glandulaire stable au fil du temps, en raison de la synergie entre l'éthanol, l'isopropanol, le glycérol et l'acide acétique, qui limite la rétraction et préserve les villosités (Fox et al., 1985).

Pour le F2, il a été constaté une préservation quasi complète jusqu'à 21 jours, avec apparition d'artefacts après une semaine, à cause de la fragilité naturelle du tissu intestinal combinée à l'effet prolongé du chlorure de zinc, qui peut détériorer les structures délicates (Carson & Hladik, 2009).

CONCLUSION

CONCLUSION

Notre travail a eu pour objectif de formuler deux fixateurs alternatifs au formaldéhyde à 10 %, dans le but de réduire les risques sanitaires et environnementaux qui lui sont associés.

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- Le fixateur à base de sel a montré une capacité de préservation du tissu nerveux et une bonne conservation des nucléoprotéines. Toutefois, il a entraîné une perte partielle des composants de la matrice extracellulaire, notamment dans les tissus riches en protéines.

- Le fixateur à base d'alcool a permis une bonne préservation de la cohésion cellulaire dans les tissus épithéliaux, hépatiques et rénaux. En revanche, une rétraction progressive accompagnée de fissures a été observée dans les tissus musculaires.

Concernant le tissu nerveux, ce fixateur a induit une dissolution partielle des lipides myéliniques, altérant ainsi la structure de la gaine de myéline.

En conséquence :

- il est recommandé d'utiliser le fixateur à base de sel pour la préservation du tissu nerveux et des nucléoprotéines, tout en tenant compte de sa limitation concernant la conservation de la matrice extracellulaire, en particulier dans les tissus riches en protéines.

- Le fixateur à base d'alcool est à privilégier pour les tissus épithéliaux, hépatiques et rénaux, où il assure une bonne cohésion cellulaire. Cependant, son utilisation pour les tissus musculaires et nerveux doit être limitée, en raison de la rétraction musculaire observée et de la dissolution des lipides myéliniques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Accart, N., Sergi, F., & Rooke, R. (2014). Revisiting fixation and embedding techniques for optimal detection of dendritic cell subsets in tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 62(9), 661–671. <https://doi.org/10.1369/0022155414539963>
2. Ajileye, A., & Esan, E. (2022). Fixation and fixatives in histopathology: a review. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 15(1), 231–243. <https://doi.org/10.4314/bajopas.v15i1.32>
3. Al-Saraj, A. (2010). Use of saturated sodium chloride solution as a tissue fixative. *Al-Mağallaʿ Al-ʿirāqīyyaʿ Li-l-ʿulūm Al-bayṭariyyaʿ/ Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 24(1), 53–58. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2010.5582>
4. Amir, H., & K. (2024). *Titre de l'article. Titre de la revue. (Compléter le titre exact et la revue)*
5. Bancroft, J. D., & Gamble, M. (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques* (6th ed.). Churchill Livingstone Elsevier.
6. Betsou, F., Lehmann, S., Ashton, G., Barnes, M., Benson, E. E., Coppola, D., ... & Womack, C. (2010). Standard Preanalytical Coding for Biospecimens: Defining the Sample PREanalytical Code. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 19(4), 1004–1011. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-1268>
7. Bhat, A. H., & Hussein, S. (2021). Fixation and different types of fixatives: Their role and functions: A review. *International Journal of Clinical and Diagnostic Pathology*, 4(4), 113–119. <https://doi.org/10.33545/pathol.2021.v4.i4b.433>
8. Baker, J. R. (1958). *Principles of Biological Microtechnique*. Methuen.
9. Buesa, R. J. (2008). Histology without formalin? *Annals of Diagnostic Pathology*, 12(5), 387–396. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.06.002>
10. Bullock, G. R. (1984). The current status of fixation for electron microscopy: A review. *Journal of Microscopy*, 133(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1984.tb00458.x>
11. Carson, F. L., & Hladik, C. (2009). *Histotechnology: A Self-Instructional Text* (3rd ed.). ASCP Press.

12. Dağdeviren, T., Yolcu, H. K., & Ünver, B. (2024b). Histological fixation process and fixatives. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 12(8), 1482–1486. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v12i8.1482-1486.6808>
13. Dapson, R. W. (2023). Histological Fixation: A Comprehensive Review. *Journal of Histotechnology*, 46(1).
14. Eltoum, I. A., Fredenburgh, J., Myers, R. B., & Grizzle, W. E. (2001). Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *Journal of Histotechnology*, 24(3), 173–190.
15. Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(5), pdb.prot4986.
16. Fitzgibbons, P. L., Bradley, L. A., Fatheree, L. A., Alsabeh, R., Fulton, R. S., Goldsmith, J. D., ... & Zander, D. S. (2023). Principles of Fixation for Surgical Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 147(4).
17. Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., & Roller, P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 33(8), 845–853. <https://doi.org/10.1177/33.8.3894502>
18. Frayn, K. N. (2010). *Metabolic Regulation: A Human Perspective* (3rd ed.). Oxford: Wiley-Blackwell.
19. Juleen, L. (2021). Formaldehyde Exposure and Asthma Development: Mechanisms and Prevention. *Respiratory Medicine*, 176, 106239. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2021.106239>
20. Hassan U, Baig M.K, Mushtaq S. (2015). Importance of pH of Fixatives Used for Fixation of Histopathology Specimens – An Un-Recognized Issue. *Journal of Islamabad Medical & Dental College (JIMDC)*, 4(3), 103-105
21. Hayat, M. A. (2000). *Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications*. Cambridge University Press.
22. Hernán Reingruber, J. (2018). Formaldehyde Exposure and Its Health Effects: Review and Regulatory Approaches. *Environmental Health Perspectives*, 126(9), 096002. <https://doi.org/10.1289/EHP2162>

23. IARC. (2012). *Formaldehyde*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 100F, 401–435. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
24. IARC (International Agency for Research on Cancer). (2017). *WHO Classification of Tumours*. WHO Press.
25. ISBER (International Society for Biological and Environmental Repositories). (2018). *Best Practices: Recommendations for Repositories* (4th ed.). ISBER.
26. Grigorev, I., & Korzhevskii, D. (2018b). Current technologies for fixation of biological material for immunohistochemical Analysis (Review). *Sovremennye Tehnologii V Medicine*, 10(2), 156. <https://doi.org/10.17691/stm2018.10.2.19>
27. Grizzle, W. E. (2021). Special histochemical and immunohistochemical problems related to the fixation of tissues. *Biotechniques*, 70(2), 63–74.
<https://doi.org/10.2144/btn-2020-0093>
28. Gürgen, H. Ö., & Yildirim, F. (2020). *Kedi ve Köpek Dokularının Farklı Fiksatiflerle Tespiti ve Histolojik Görünümlerinin Karşılaştırılması*. 17(3), 242–247.
<https://doi.org/10.32707/ERCIVET.828418>
29. Kareem, N. D. A. (2024b). A brief overview of the role and function of fixative and fixation: review. *University of Thi-Qar Journal of Agricultural Research*, 13(1), 264–271. <https://doi.org/10.54174/87ae4c06>
30. Khoshakhlagh, A. H., Mohammadzadeh, M., Ghobakhloo, S., Cheng, H., Gruszecka-Kosowska, A., & Knight, J. (2024). Health risk assessment from inhalation exposure to indoor formaldehyde: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 471, 134307. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134307>
31. Kiernan, J. A. (2000). Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*, 00-1, 8–12.
<https://doi.org/10.1017/S1551929500057060>
32. Kiernan, J. A. (2015). *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice* (5th ed.). Scion Publishing.
33. Lam, J., Koustas, E., Sutton, P., Padula, A. M., Cabana, M. D., Vesterinen, H., Griffiths, C., Dickie, M., Daniels, N., Whitaker, E., & Woodruff, T. J. (2021). Exposure to formaldehyde and asthma outcomes: A systematic review, meta-analysis, and

- economic assessment. *PLoS ONE*, 16(3), e0248258. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248258>
34. Mazur, A.I., Marcsisin, E.J., Bird, B., Miljkoviš, M., Max, & Diem (2012). Evaluating Different Fixation Protocols for Spectral Cytopathology, Part I.
 35. Mohammed, H. O. H. E., & MSaad, A. (2014). ASSESMENT OF EFFICACY OF THE TISSUE FIXATION SATURATED SODIUM CHLORIDE SOLUTION. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Production*, 5(1). <https://ejournals.uofk.edu/index.php/vet/article/view/241/0>
 36. Musiał, A., Gryglewski, R. W., Kielczewski, S., Loukas, M., & Wajda, J. (2016b). Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. *PubMed*, 56(3), 31–40. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28275269>
 37. Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2021). When tissue antigens and antibodies get along: Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—The red, brown, and blue technique. *Veterinary Pathology*, 58(5), 866–880. <https://doi.org/10.1177/0300985821998400>
 38. Ramos-Vera, C. (2022). Considerations for pH and Buffering in Histological Fixation. *Histotechnology*, 45(2), 111–118.
 39. Reingruber, H., & Pontel, L. B. (2018). Formaldehyde metabolism and its impact on human health. *Current Opinion in Toxicology*, 9, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.07.001>
 40. Swenberg, J. A., Moeller, B. C., Lu, K., Rager, J. E., Fry, R. C., & Starr, T. B. (2013). Formaldehyde carcinogenicity research: 30 years and counting for mode of action, epidemiology, and cancer risk assessment. *Toxicologic Pathology*, 41(2), 181–189. <https://doi.org/10.1177/0192623312466459>
 41. Shabihkhani, M., Lucey, G. M., Wei, B., Mareninov, S., Lou, J. J., Vinters, H. V., ... & Yong, W. H. (2014). The effect of surgical tissue procurement conditions on the quality of cancer tissue biobanks. *Clinical Biochemistry*, 47(4–5), 258–266.
 42. Spector, A. A. (1988). Fatty acid binding to plasma albumin. *Journal of Lipid Research*, 29(3), 283–300.
 43. Titford, M. E. (2022). *Histopathology and Histotechnology: A Concise Guide*. CAP Press.

44. Titford, M. (2009). The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry*, 84(4), 159–163. <https://doi.org/10.1080/10520290902988441>
45. Tuğba, D. (2024). Effects of Fixative Osmolarity and Ion Composition on Tissue Preservation. *Journal of Biomedical Research*, 38(2).
46. Unhale, S. A., Skubitz, A. P., Solomon, R., & Hubel, A. (2012). Stabilization of tissue specimens for pathological examination and biomedical research. *Biopreservation and Biobanking*, 10(6), 493–500. <https://doi.org/10.1089/bio.2012.0031>
47. Wang, M., Ji, X., Wang, B., Li, Q., & Zhou, J. (2018). Simultaneous evaluation of the preservative effect of RNAlater on different tissues by biomolecular and histological analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 16(6), 426–433. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0055>
48. Wehrl, H. F., Bezrukov, I., Wiehr, S., Lehnhoff, M., Fuchs, K., Mannheim, J. G., Quintanilla-Martinez, L., Kohlhofer, U., Kneilling, M., Pichler, B. J., & Sauter, A. W. (2015). Assessment of murine brain tissue shrinkage caused by different histological fixatives using magnetic resonance and computed tomography imaging. *PubMed*, 30(5), 601–613. <https://doi.org/10.14670/hh-30.601>
49. Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., & Battifora, H. (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *The American Journal of Surgical Pathology*, 24(7), 1016–1019.
50. Wester, K., Asplund, A., Bäckvall, H., Micke, P., Derveniece, A., Hartmane, I., Malmström, P., & Pontén, F. (2003). Zinc-Based fixative improves preservation of genomic DNA and proteins in histoprocessing of human tissues. *Laboratory Investigation*, 83(6), 889–899. <https://doi.org/10.1097/01.lab.0000074892.53211.a5>

ANNEXE

1. Solutions et réactifs :

- Ethanol
- Isopropanol 2.
- Glycérol.
- Acide acétique glacial.
- Chlorure de zinc.
- Saccharose.
- Chlorure de sodium.
- Tris base.
- Acide chlorhydrique HCl.
- Formol 36%.
- Ethanol 70%, 95% et 100%.
- Xylène.
- Eukitt.
- Paraffine.
- Hématoxyline.
- Eosine 0,5%.
- Violet de crésyl 0,5%.
- Eau distillé et eau du robinet.
- Eau physiologique.

2. Verreries :

- Bêchers de (100mL, 1000mL).
- Eprouvette de (50mL, 100mL, 1000mL).
- Flacon de 1L.
- Fiole jugée de (500mL, 1000mL).
- Pipette pasteur.
- Entonnoir en verre.
- Lames et lamelles.

3. Appareillages :

- Agitateur magnétique et barreaux.
- Balance de précision.
- PH mètre.
- Station d'enrobage de tissus.
- Automate de circulation.
- Microtome.

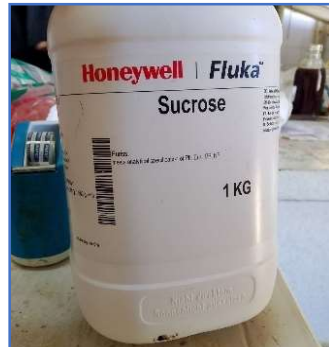
- Bain marie.
- Four pasteur.
- Microscope photonique.

4. Autres matériels :

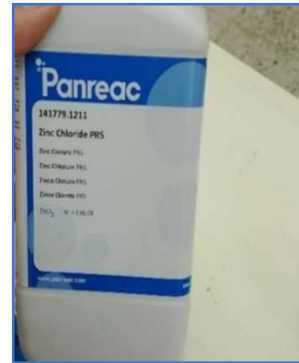
- Papier filtre.
- Cassettes d'inclusion en plastiques.
- Moule en métal.
- Panier porte lames.
- Trousse de dissection.
- Boite de pétri en verre.
- Portes lames.
- Bacs et paniers de colorations.



isopropanol 2



Saccharose



chlorure de zinc



L'eau distillé



Chloroforme



Balance de précision



Agitateur magnétique



pH mètre



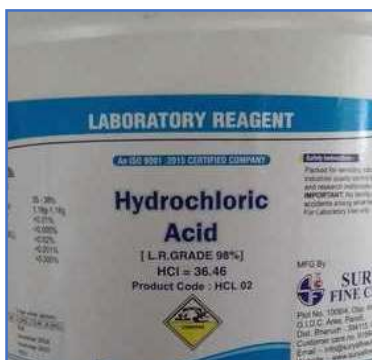
Station d'enrobage de
tissus



Bain marie



Microtome



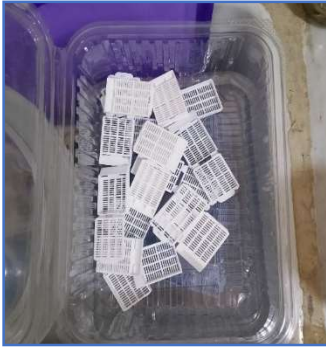
Acide chlorhydrique



Four pasteur



Automate de
circulation



**Cassettes d'inclusion
en plastique**



**Milieu de montage:
Eukitt**



Lames et lamelles



Tris base



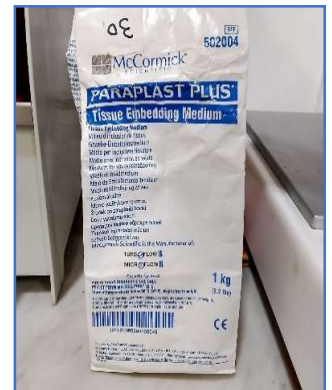
Batterie de coloration



Hotte chimique



Porte lames



Paraffine



Trousse de dissection



microscope optique Optika

5. Préparation des liquides fixateurs :

F	F1	F2
La solution fixatrice a été préparée en diluant un volume de formaldéhyde concentré ($\geq 37\%$) dans neuf volumes de tampon phosphate à pH 7,2, afin d'obtenir une solution finale à 10 % de formaldéhyde tamponné, soit environ 4 % de formaldéhyde actif.	La solution fixatrice à base d'Alcool a été préparée en mélangeant les composants suivants : - 700 mL d'éthanol - 50 mL d'isopropanol - 20 mL d'acide acétique glacial - 30 mL de glycérol - 15 mL de tampon phosphate (pH 7,2)	La solution fixatrice à base de zinc a été préparée en mélangeant les composants suivants : - 10 g de (ZnCl_2) - 9 g de (NaCl) - 100 g de sucrose - 500 mL de tampon Tris-HCl (pH 7.4)

Tableau 2 : composition et préparation des liquides fixateurs F, F1, F2**6. Les étapes de déshydratation et éclaircissement :**

Des trois bains d'alcool sont réalisés pour la déshydratation :

- Deux bains d'alcool 70° pendant 2 heures pour chacun
- Deux bains d'alcool 95° pendant 2 heures pour chacun
- Deux bains d'alcool 100° pendant 2 heures pour chacun

Ensuite deux bains de toluène ont été faits pour l'éclaircissement (l'élimination d'alcool) pendant 2 heures pour chacun

7. Les étapes de réhydratation

La réhydratation est pour but de remplacer le xylène par de l'eau, grâce à une série de bains d'alcool à concentrations décroissantes (100%, 95%, 70%)

- Un bain d'alcool 100% pendant 2 min
- Un bain d'alcool 95% pendant 2 min

- Un bain d'alcool 70% pendant 2 min
- Un dernier bain consiste à un passage des lames dans l'eau distillé

8. Les étapes de la coloration hématoxyline-éosine :

- Coloration des lames dans l'hématoxyline pendant 6 minutes
- Rinçage dans de l'eau courante
- Coloration des lames dans l'éosine pendant 1 minute
- Rinçage dans l'eau courante

9. Les étapes de la coloration de Nissl :

Immersion des lames pendant 5 minutes dans les bains suivants :

- Xylène
- Xylène
- Alcool 100%
- Alcool 100%
- Alcool 95%
- Alcool 70%

Après les lames sont colorées dans le violet de crésyl pendant 20 minutes, et différenciées dans l'eau distillé pendant 2 minutes.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et Agro-Ecologie



Laboratoire des Sciences Animales & Recherche en Biobanking
Laboratoire de Biotechnologie de Productions Végétales

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

*Formulation de deux fixateurs de biospécimens : étude histologique
comparative avec des tissus fixés au formaldéhyde*

Présenté par

M. ABBAS Marwa & M. BOUSLIMANI Hana

Devant le Jury :

TERZAALI. D	MCA	ISV, Blida1	Présidente
MOKRANE. A	MCA	UMTO, Blida1	Examinatrice
DJAZOULI ALIM. F.Z	Professeur	SNV, Blida1	Promotrice
RBAIA. I	Doctorante	SNV, Blida1	Co-promotrice

Session 2024 / 2025

Mokrane