

### **Préalable**

La technique appelée « trichrome de Masson<sup>1</sup> » s'applique sur des coupes de tissus animaux, et fait intervenir 3 colorations successives :

- 1) Une coloration des noyaux par l'hémalum de Mayer<sup>2</sup>.
- 2) Une coloration du cytoplasme par un mélange précis de fuchsine acide et de rouge ponceau<sup>3</sup> (qui sont des colorants acides).
- 3) Une coloration élective du collagène par le vert lumière<sup>4</sup> (parfois remplacé par le bleu d'aniline).

### **Mode opératoire**

Pour ce genre de travail, les coupes sont réalisées au microtome automatique, sur des pièces enrobées à la paraffine, ce qui s'avère assez fastidieux. Nous avons également travaillé sur des coupes pratiquées avec un microtome à congélation, mais les résultats sont plus aléatoires. Considérons que nous travaillons sur des coupes de 10 à 12 µm d'épaisseur.

1. Poser les coupes sur les LPO (la coloration est meilleure sur la lame - le verre de montre rempli d'eau est à déconseiller).
2. Fixer sur le support à l'eau albumineuse, et sécher.
3. Déparaffiner dans 3 bains de xylène successifs (3' par bain).
4. Passer par des bains successifs de 3' dans de l'alcool absolu, puis à 90°, 70° et parfois même 30°.
5. Réhydratation dans l'eau durant 4' (ou passage dans du PBS<sup>5</sup>, durant le même temps).
6. Placer dans l'hémalum de Mayer pendant 10' au moins (à adapter selon la fraîcheur du colorant : un rapide contrôle au microscope permet de se faire une idée précise) ; 15' semblent constituer une durée favorable.
7. Rincer à l'eau courante, en faisant passer la lame sous l'eau du côté opposé à la préparation (sinon on risque de décoller la coupe) ; puis placer dans l'eau du robinet durant 4' (cette opération est indispensable, afin d'effectuer la différenciation<sup>6</sup> de l'hémalum) ; on peut aussi différencier dans une solution de PSB.
8. Colorer dans la fuchsine-ponceau durant 5'.
9. Rincer rapidement dans 2 bains successifs d'eau acétique<sup>7</sup> à 1 %, ou plus simplement, passage sous l'eau du côté opposé à la préparation.
10. Mordancer dans un bain d'acide phosphomolybdique à 1 %, durant +/- 10'.
11. Surtout, NE PAS RINCER.
12. Colorer ensuite durant 5' dans le bleu d'aniline (pour le vert lumière, 20'' sont largement suffisantes car son pouvoir colorant est puissant et il va empâter la préparation, en cas d'exposition plus longue).
13. Rincer dans 2 bains successifs d'eau bidistillée acétique à 1 %, durant 5' chacun.

### **Monter définitivement**

++ Monter les coupes telles quelles dans l'Aquatex.

OU

++ Appliquer les techniques successives de déshydratation à l'alcool puis passer dans le xylène et monter dans le BC, ou dans tout autre milieu dont le solvant est le xylène (ou le toluène).

<sup>1</sup> Une brève recherche sur le Net permet de constater qu'il existe nombre de « recettes », ni tout-à-fait semblables ni tout-à-fait différentes.

<sup>2</sup> Ou la trioxyhématéine ferrique, ou l'hématoxyline ferrique de Harris, ou toute autre forme d'hématoxyline à fort pouvoir colorant.

<sup>3</sup> La fuchsine ponceau est un mélange extemporané d'un volume d'une solution aqueuse de fuchsine acide (1 %) et de 2 volumes d'une solution de rouge ponceau (1 %) dans l'eau acétique à 1%.

<sup>4</sup> Vert lumière en solution à 1% dans l'acide acétique à 1% ; bleu d'aniline en solution aqueuse à 1 %.

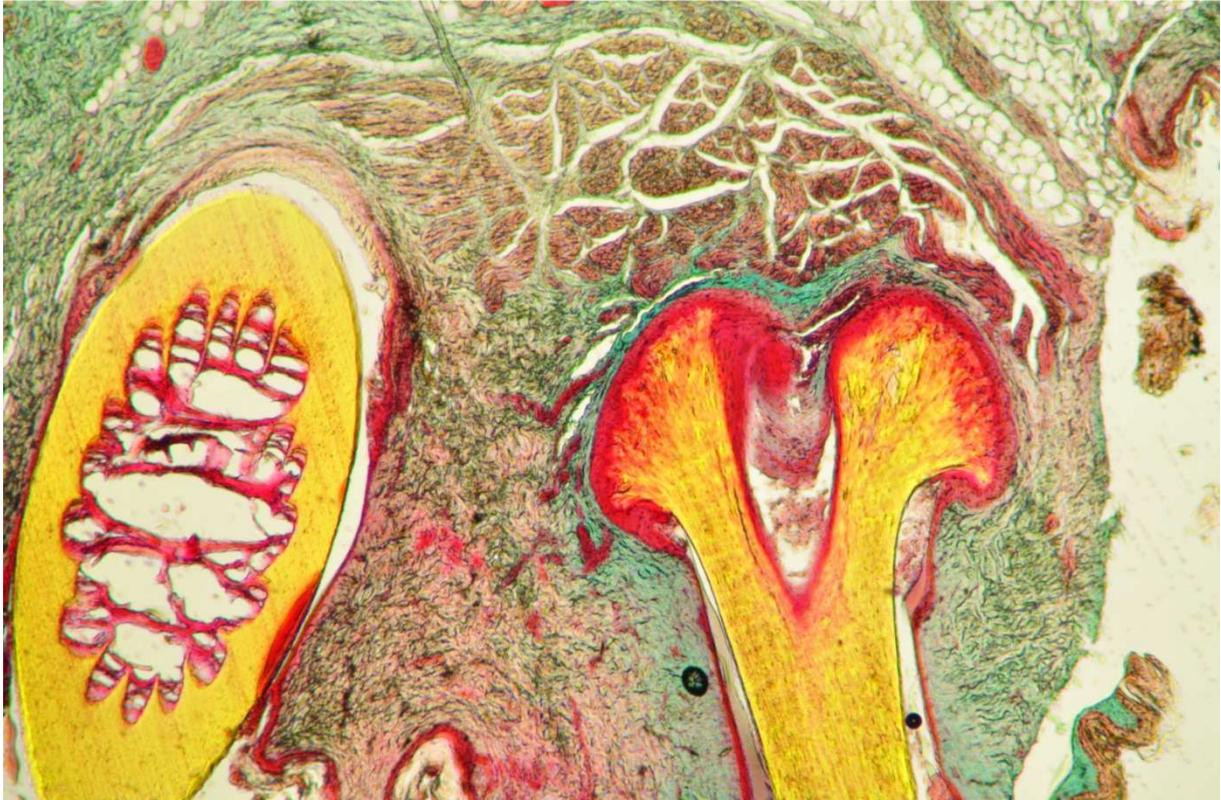
<sup>5</sup> PBS = tampon phosphate salin (comprimés se trouvant dans le commerce).

<sup>6</sup> On peut également différencier avec de l'alcool acétique à 1 %.

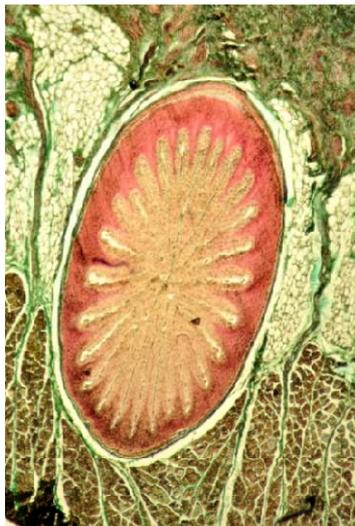
<sup>7</sup> Peut être remplacée par de l'eau bidistillée ammoniacale à 1% ; cependant, même si cela figure dans certains protocoles, nous le déconseillons car cela décolle souvent les pièces de la LPO.

++ On peut pratiquer de même avec l'alcool isopropylique, qui permet un montage très facile dans l'Euparal (ce dernier est très avide d'oxygène, et il n'y a jamais le problème des bulles).

Il faut cependant tenir compte du fait que les temps de coloration peuvent varier en fonction de l'épaisseur des coupes et du type de tissu.



Coupe réalisée dans une peau de hérisson au niveau de l'implantation des épines (préparations et photos : D. Biarrot). La coloration de la kératine en jaune résulte de l'utilisation du fixateur de Bouin, (qui contient de l'acide picrique) et non des composants du trichrome de Masson. L'épine à gauche fait l'objet d'une coupe sagittale et montre le début de sa formation, avec un centre +/- vide, et des arches de consolidation naissantes. Celle de droite a subi une coupe longitudinale, qui passe au centre du bulbe et révèle que l'épine est ouverte par le dessous ; cet orifice permet le passage du système vasculaire qui va alimenter la structure cellulaire interne. Le volume du bulbe assure un ancrage très solide du tégument, dans la peau.



◀ Coupe sagittale montrant la formation d'une épine, avec de vieux kératinocytes périphériques, durcis et cornés ; la zone centrale contient le même type de cellules, mais actives.

### Résultats généraux

- Le cytoplasme est coloré en rouge rosé.
- Les fibres élastiques en rose.
- Les fibres conjonctives (collagène) en bleu (si on utilise le bleu d'aniline) ou en vert (si vert lumière).
- Les globules rouges (hématies ou érythrocytes) et la kératine en rose - rouge vif.
- Le mucus en bleu.
- Les noyaux en brun, bleu - violet ou bleu - noir.
- Les substances basophiles en bleu - violet.