

Système d'Informations Halieutiques

Action Paramètres biologiques

Dubroca Laurent¹
Elie Nicolas³
Kellner Kristell²
Le Meleder Anna¹
Parrad Sophie¹
Sauger Carine¹
Nadège Villain-Naud²
Août 2023 – V.1.0



1 : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, IFREMER, Laboratoire Ressources Halieutiques de Port-en-Bessin, 14520 Port-en-Bessin-Huppain, France.

2 : Université de Caen Normandie, Biologie des Organismes et Ecosystèmes Aquatiques (UMR 8067 BOREA) MNHN, Sorbonne Université, UCN, CNRS-7208, IRD, UA, équipe EMERGE, Esplanade de la Paix 14032 Caen, France

3 : Université de Caen Normandie, UNICAEN, SF 4206 ICORE, CMABIO3, 14000 Caen, France

Protocoles pour l'étude histologique de gonades de poissons marins

Sommaire

1. Contexte.....	4
2. Liste de matériels.....	5
2.1. Réactifs chimiques.....	5
2.2. Équipements.....	6
3. Échantillonnage et fixation.....	8
3.1. Paramètres macroscopiques à récolter.....	8
3.2. Étiquettes d'identification pour les cassettes.....	9
3.3. Photographie des gonades.....	10
3.4. Extraction des gonades des poissons plats.....	11
3.5. Extraction des gonades des poissons ronds.....	13
3.6. Homogénéité cellulaire.....	15
4. Redécoupe des échantillons et conservation.....	17
5. Déshydratation et inclusion en paraffine.....	18
5.1. Déshydratation Manuelle.....	18
5.2. Inclusion en blocs de paraffine.....	20
6. Coupes au Microtome.....	21
7. Colorations et montage des lames.....	22
7.1. Coloration au trichrome de Prenant-Gabe.....	22
7.2. Montage entre lame et lamelle.....	24
8. Nettoyage, numérisation et stockage.....	27
8.1. Nettoyage des lames.....	27
8.2. Numérisation des lames.....	27
8.3. Stockage des lames et blocs de paraffine.....	28
Bibliographie.....	29
Annexes.....	31

1. Contexte

Ce recueil de protocoles a été mis en place dans le cadre du projet MATO (MATurité Objective des poissons par histologie quantitative) et dans le cadre de la thèse de Carine Sauger. Le projet MATO financé par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) a pour but d'améliorer la détermination de la maturité sexuelle chez certaines espèces en utilisant l'histologie couplé à la stéréologie.

Ce présent document (version 1.0 de juin 2023) recueille les protocoles utilisés pour l'étude de gonades femelles de poissons marins et des différentes structures cellulaires retrouvées dans les ovaires pour les espèces suivantes : la plie (*Pleuronectes platessa*), la cardine franche (*Lepidorhombus whiffiagonis*), la cardine quatre tâches (*Lepidorhombus boscii*), le rouget barbet de roche (*Mullus surmuletus*) et le merlan bleu (*Micromesistius poutassou*) (Sauger et al., 2019).

Les protocoles présents détaillent les méthodes utilisées, de la récolte de l'échantillon frais jusqu'au montage de la lame histologique et sa coloration, en passant par l'inclusion dans la paraffine (Manfred, 1968; Martoja-Pierson & Martoja, 1967). Il a été mis en place de façon à favoriser une approche manuelle des méthodes d'histologie.

Pour la méthode détaillée de la lecture des lames via la stéréologie, référez-vous à 'Stereology reading protocol' (Dubroca et al., 2023). Pour les descriptions détaillées des cellules de la lignée germinale d'une des espèces citées ci-dessous, référez-vous à leurs lexiques.

Nous remercions le laboratoire BOREA de l'Université de Caen Normandie pour les protocoles présentés ci-dessous.

2. Liste de matériels

2.1. Réactifs chimiques

Pour chaque produit, reportez-vous à la fiche signalétique appropriée fournie par le fabricant. Assurez-vous de manipuler les réactifs chimiques sous une hotte et de porter un équipement de protection adapté, soit une blouse de laboratoire, des gants en nitrile et des lunettes de protection.

- **Fixateur de Davidson** (voir préparation [Annexe 4](#)). **Le fixateur de Davidson est inflammable et toxique si inhalé, avalé ou absorbé par la peau.**
- **Éthanol** (absolu, C_6H_6O , $M_w=46.07$) (CHIMIE-PLUS Laboratoires, ref.40079). Pour toute dilution d'éthanol, se référer à la table de Gay-Lussac ([Annexe 3](#)). **L'éthanol est inflammable.**
- **Butanol** (absolu, $C_4H_{10}O$, $M_w=74.12$) (CHIMIE-PLUS Laboratoires, ref.24022). **Le butanol est inflammable et toxique si inhalé, avalé ou absorbé par la peau.**
- **Paraffine** (VWR, ref.2079-A, Klinipath). **Il y a présence de butanol dans les déchets de paraffine après déshydratation.**
- **Diasolv®** (Diapath, ref.X0016). **Le diasolv® est inflammable et toxique si inhalé, avalé ou absorbé par la peau.**
- **Vert lumière (0.2°)** ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$, $M_w=792.86$) (ROTH, ref.7706.3) (voir préparation [Annexe 5](#)). **Le Vert lumière est dangereux pour l'environnement.**
- **Hématoxyline** ($C_{16}H_{14}O_6.nH_2O$, $M_w=302.28$) (Sigmaaldrich, ref.H3136) (voir préparation [Annexe 5](#)). **L'hématoxyline est inflammable.**
- **Éosine Y (1°)** ($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, $M_w=691.85$) (Éosin Y disodium salt, Sigmaaldrich, ref.E4382) (voir préparation [Annexe 5](#)). **L'éosine est dangereux pour l'environnement.**
- **Acide phosphomolybdique (1°)** ($H_3[P(Mo_3O_{10})_4].nH_2O$, $M_w=1825.25$)(VWR, ref.20616.138) (voir préparation [Annexe 5](#)).
- Eau distillée (dH_2O)
- **Diamount®** (Diapath, ref.030400). **Le diamount® est inflammable et toxique si inhalé, avalé ou absorbé par la peau.**
- **Glycérol** ($C_3H_8O_3$, $M_w=92.09$) (86°, ROTH, ref.7533.3)
- **Formaldéhyde** (CH_2O , $M_w=30.03$) (37°, ROTH, ref.7398.5)
- Eau de mer filtrée
- **Acide acétique** ($C_2H_4O_2$, $M_w=60.05$) (VWR, ref.20103.295)
- **Acide sulfurique** (H_2SO_4 , $M_w=98.08$) (95°, VWR, ref.20700.298)
- **Ammonium Iron (II) sulphate hexahydrate** ($H_8FeN_2O_8S_2.6H_2O$, $M_w=392.13$) (VWR, ref.24257.260)

2.2. Équipements

- Kit de dissection (scalpel, sonde cannelée, ciseau, pince fine) ([Fig. 1](#))
- Feutre fin, crayon de papier
- Longue pince en inox (30cm)
- Appareil photo (Nous avons utilisé le Olympus TOUGH F2.0)
- Planche à dissection
- Règle graduée (cm)
- Cassettes d'inclusion, histocassettes (Simport, ref.M512)
- Eppendorf (VWR, ref.525-1134) ou enveloppe pour otolith
- Balance de précision (>1kg, précision 0.01g)
- Balance (max5kg, précision 1g)
- Boite de pétri (ou petit contenant pour placer les gonades)
- Étiquettes d'identification pour les cassettes d'inclusion, en papier conventionnel (0.5x5cm) ([Annexe 1](#))
- Étiquettes d'identification pour poisson (petit bout de papier avec le numéro du poisson)
- Feuille de saisie de données ([Annexe 2](#))
- Réfrigérateur (4-1°C)
- Sorbonne/hotte
- Flacon de prélèvement avec opercule (2L) ([Fig. 5](#))
- Éprouvette graduée (1000mL)
- Poubelle déchets laboratoire (aiguille, lames...)
- Poubelle déchets chimiques
- Papier absorbant
- Moule en silicone (24 moules, 14x2.6x1cm, Blumtal) ([Fig. 2](#))
- Étuve (60°C max)
- Bêcher en inox avec bec verseur et poignée (500mL) (BOCHEM, ref.8501)
- 5 contenants refermable pour les bains
- Microtome (Leica, ref.14045746960)
- Lame de rasoir pour microtome (Microm Microtech35+, ref.201219-74)
- Bain marie (55°C with reverse osmosis treated water)
- Pic en inox
- Lames de microscope/lames histologiques (GHÄASEL, ref.BPB036)
- Pinceau avec fin poils souples
- Microscope



Figure 1. Kit de dissection



Figure 2. Moules en silicone pour inclure les échantillons en bloc de paraffine

- Pain de glace
- Chronomètre
- Filtres (à café)
- Entonnoir (DUTSCHER, ref.PNB013)
- Cuillère-spatule
- 16 cuves pour coloration de lame (Simport, ref.M900-12B)
- Portes lames (Simport, ref.M900-12B) ([Fig. 3](#))
- 8 flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stockage des produits à l'obscurité
- Pipettes jetables (10mL, EPPENDORF, ref. 0030127722)
- Lamelles (2.4x5cm, Biosigma, ref.VB5650)
- Pipettes compte-gouttes jetables (VWR, ref.612-4494)
- Plateau en plastique
- Scanner (Nous avons utilise le VS120 Olympus model driven by Olympus VS-ASW software)
- Boite en carton de stockage ([Fig. 4](#))



Figure 3. Portes lames



Figure 4. Cardboard storage box.



Figure 5. Plastic sample bottle with seal

3. Échantillonnage et fixation

3.1. Paramètres macroscopiques à récolter

Les données à récolter pour chaque poissons dans l'[Annexe 2](#) sont les suivantes :

- **ID Poisson** (IFREMER : **ID Otolithe**)
- **Nom espèce** (IFREMER : Index de codification type Rubin)
- **Division CIEM** (Division du CIEM où l'individu a été pêché)
- **Rectangle Stat CIEM** (Rectangle statistique halieutiques du CIEM où l'individu a été pêché)
- **Date** (JJ/MM/AAA)
- **Longueur totale poisson** (Précision au 1cm ou ½cm, arrondi à l'inférieur)
- **Poids poisson non vidé** (Précision de 1g, arrondi à l'inférieur)
- **Présence parasites** (Présence : Y ou Absence : N)
- **Age**
- **Maturité visuelle** (Échelle SMSF du CIEM, 2018)
- **Poids foie en g** (Précision de 0.01g, arrondi à l'inférieur)
- **Poids gonade dorsale/droite en g** (Précision de 0.01g, arrondi à l'inférieur)
- **Poids gonade ventrale/gauche en g** (Précision de 0.01g, arrondi à l'inférieur)
- **Nombre de sections**
- **Navire** (IFREMER : Nom du navire ayant effectué la pêche)

La **Longueur totale du poisson** et le **Poids non vidé du poisson** doivent être pris en suivant les recommandations préconisées par les **protocoles des campagnes associées** (IFREMER : Guides d'identification SIH (Garren, 2020)).

Le **ID Otolithe** est un identifiant unique à l'individu. Il est généré par Imagine (Elleboode et al., 2022). Cet identifiant suivra l'échantillons tout au long de son traitement et les informations associées seront incorporées à la base de données Imagine, comme préconisé par l'IFREMER.

Le **Nombre de sections** est le nombre d'échantillon gonadique extrait de l'individu. Par exemple : si, pour un individu, une section a été échantillonnée pour les 2 ovaires, il y a donc 2 échantillons pour cet unique individu. Indiquer « 2 » dans cette colonne pour cet individu.

La **Maturité visuelle** est estimée en suivant les critères de l'échelle WKASMSF (ICES, 2018) ([Tableau 1](#)). Cette échelle européenne en 6 phases de maturité est une échelle universelle pour tous les poissons osseux. Chacune des phases de maturité est associé à des critères visuels prédéfinis (aspect des gonades, couleurs, contenus...) (ICES, 2012, 2018). Pour les espèces identifiées pendant les campagnes IFREMER, des fiches d'identifications de la maturité sexuelles ont été créées (Le Meleder & Dubroca, 2023).

Tableau 1. Échelle de maturité du CIEM « WKASMSF » (ICES, 2018).

Statut	Code	Phase de maturité
Sexuellement immature	A	IMMATURE
Sexuellement mature	B	EN DÉVELOPPEMENT
	C	EN PONTE
	D	RÉGRESSION/RÉGÉNÉRATION
	E	OMISSION DE PONTE
	F	ANORMAL

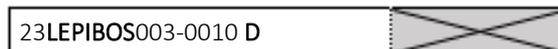
3.2. Étiquettes d'identification pour les cassettes

Pour chaque échantillon, une étiquette d'identification ([Annexe 1](#)) en papier classique et de taille standardisée aux cassettes d'inclusion sera placée dans chaque histocassette, pliée en deux. L'**ID Otolithe** inscrite sur l'étiquette sera générée par Imagine (Elleboode et al., 2022) et peut être écrit sur l'étiquette au crayon de papier, ou à l'encre d'imprimante.

Sur chaque étiquette, mettre l'**ID Otolithe** + **position de la gonade échantillonnée**

- Étiquette pour poissons plats :
 - o Gonade ventrale = **ID Otolithe** + V
 - o Gonade dorsale = **ID Otolithe** + D
- Étiquette pour poissons ronds :
 - o Gonade gauche = **ID Otolithe** + G
 - o Gonade droite = **ID Otolithe** + D

Exemple d'une étiquette :



Ne rien écrire sur la partie grisée !
Cette partie est incluse dans le bloc de paraffine.

3.3. Photographie des gonades

Pour chaque individu, plusieurs photos sont à prendre. Ces photos doivent permettre d'identifier l'individu qui est pris en photo, mais également son sexe et sa phase de maturité. De plus, elles sont ajoutées au répertoire de données « **A gonad photographs dataset for fish of commercial interest** » (Le Meleder, Sauger, Dubroca, et al., 2022), et utilisée pour compléter les fiches d'identification visuelle de la maturité des poissons d'intérêts commerciaux (<https://lm-anna.github.io/MaturityScaleTools/>) (Le Meleder & Dubroca, 2022).

Voici la liste des différentes photographies à prendre :

- Photo du poisson en entier sur une règle graduée
- Photo des gonades à l'intérieur de la cavité abdominale du poissons (avec ou sans les gonades en fonction des besoins des mareyeurs) (Fig. 6ab)
- Photo des gonades à l'extérieur du poissons (Fig. 6c)



Figure 6. Différents types de photo : a) Gonades à l'intérieur du poisson avec les organes ; b) gonades à l'intérieur du poisson sans les organes ; c) gonades à l'extérieur du poisson

La prise de photos doit être réalisée sur un fond blanc, avec une règle graduée, et avec, dans la mesure du possible, une luminosité homogène entre toutes les photos. De plus, sur chaque photo doit figurer l'**ID Poisson**. Dans le cas des photos des gonades à l'extérieur du poisson, toujours placer la gonade dorsale/gauche en haut et la gonade ventrale/droite en bas.

Pour plus de détails autour des méthodes de photographie des gonades de poisson, voir le « **Protocole de photographie des gonades de poissons** » (Le Meleder, Sauger, & Dubroca, 2022).

3.4. Extraction des gonades des poissons plats

- **Peser** (au gramme arrondi à l'inférieur) à l'aide de la balance et **mesurer** (au cm arrondi à l'inférieur) l'individu.
- **Récolter les otolithes** dans une pochette/Eppendorf étiqueté avec l'**ID Otolithe** de l'individu.
- En plaçant le poisson sur le ventre, faire une incision en diagonale passant en dessous de la caudale, puis parallèle à la ligne latérale. Déplier la chair afin de **mettre en évidence la gonade dorsale sans la couper**, comme montré ci-dessous (Le Meleder, Sauger, & Dubroca, 2022) (Figure 3).
- **Estimer la phase de maturité** en suivant les critères de l'échelle WKASMSF (ICES, 2018).
- **Prendre une photo** de l'individu en entier, sur un fond blanc (ou de couleur uniforme) avec la gonade apparente dans la cavité, une règle et son **ID Otolithe** (Fig. 7).
- **Extraire délicatement la première gonade**. Chez les femelles, il faudra sectionner l'ovaire à la base de l'oviducte, là où les 2 ovaires sont connectés entre eux, afin de pouvoir le sortir de la cavité. **La gonade extraite du dos du poisson plat est la gonade dorsale (D)**. Celle extraite depuis le ventre est la ventrale (V).
- Retourner le poisson en le mettant sur le dos et faites la même incision que précédemment afin d'**extraire la gonade ventrale**.
- **Prendre une photo des deux gonades** détachées, à l'extérieur de la cavité sur un fond blanc (ou de couleur uniforme), avec une règle graduée et son **ID Otolithe** (Fig. 8). Si possible, séparer les deux gonades et **positionner la gonade dorsale en dessus de la gonade ventrale**.



Figure 7. Photo de Cardine en entière sur fond blanc avec gonade apparente, une règle et son ID Otolithe



Figure 8. Photo des deux gonades à l'extérieur de la cavité, sur un fond blanc, avec une règle graduée et son ID Otolithe.

- **Peser** séparément **chaque gonade** sur la balance de précision (à 0.01g).
- **Vérifier la présence de parasites** dans le poisson.
- **Récupérer le foie et le peser** sur la balance de précision (à 0.01g).
- Si les gonades ont une longueur de plus de 3 cm, **faire une section de 2 cm dans la partie centrale de la gonade**. **Attention à ne pas prendre une section où la paroi gonadique n'est pas éventrée !**
- Placer **une section de gonade à plat dans une histocassette** avec une **étiquette d'identification** (Annexe 1). Éviter de faire toucher l'échantillon et l'étiquette en papier.
- Fermer l'histocassette et, sous une sorbonne avec des gants en nitrile, **submerger les histocassettes dans le fixateur de Davidson** pendant **24h à 48h** au réfrigérateur (48h pour les gros échantillons d'ovaire avec œufs hydratés).

POUR CHAQUE INDIVIDU (poissons plats)

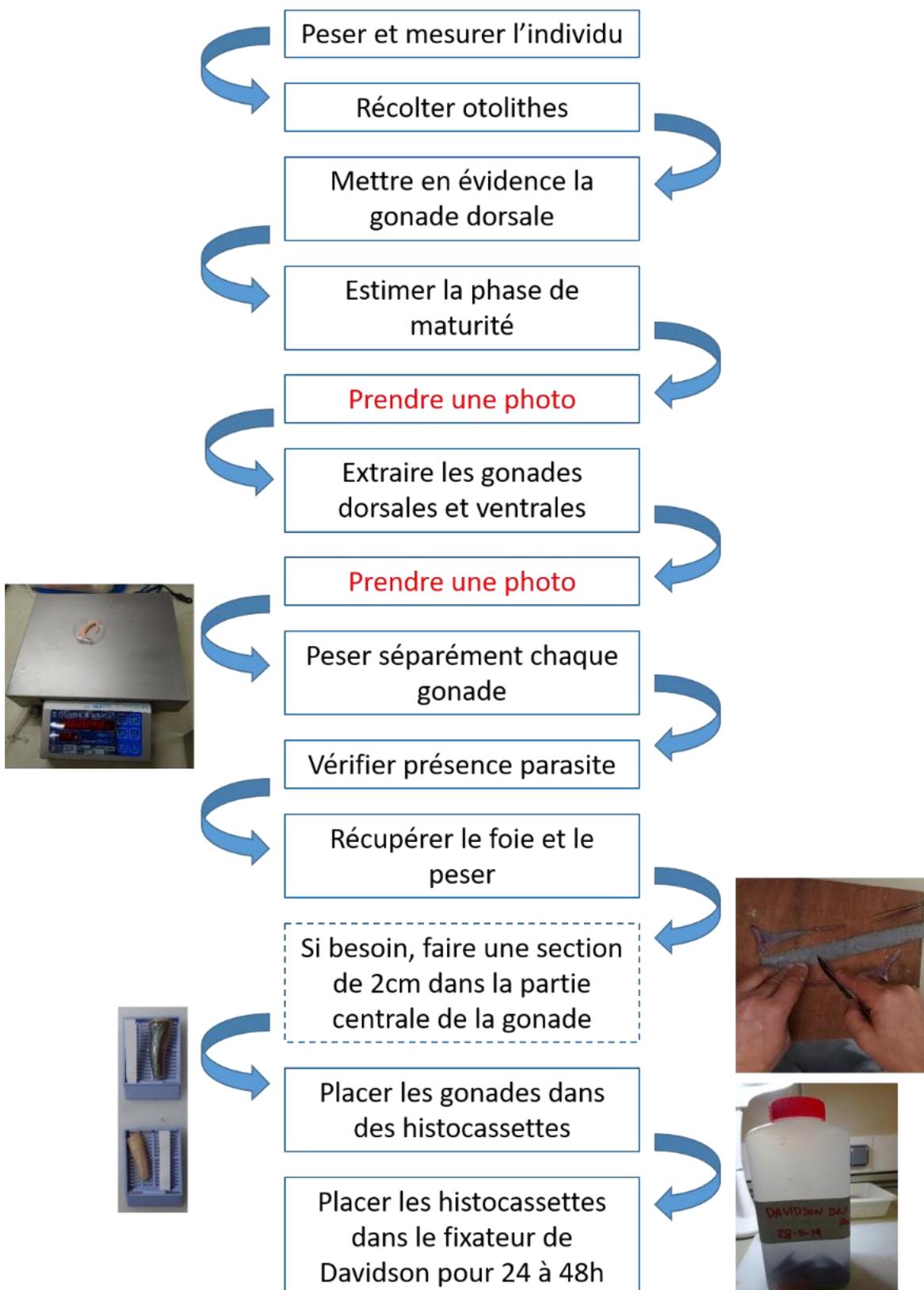


Figure 9. Diagramme des étapes d'extraction de gonade de poisson plat.

3.5. Extraction des gonades des poissons ronds

- **Peser** (au gramme arrondi à l'inférieur) et **mesurer** (au cm arrondi à l'inférieur) l'individu.
- **Récolter les otolithes** dans une pochette/Eppendorf étiquetée avec l'**ID Otolithe** de l'individu.
- En plaçant le poisson sur le dos, faire une **incision aux ciseaux** allant de l'**orifice génital jusqu'au niveau des nageoires pelviennes**. Afin de ne pas endommager les gonades qui peuvent se retrouver juste en dessous, il est fortement conseillé d'utiliser une **sonde cannelée**. Par la suite, faite **quatre incisions en diagonales** comme indiqué ci-dessous ([Fig. 10](#)).



Figure 10. Zones d'incisions pour l'ouverture de la cavité abdominale des poissons ronds

- Déplier la chair afin de **mettre en évidence les gonades** et **prendre une photo** de l'individu en entier, sur un fond blanc (ou de couleur uniforme) avec la gonade apparente dans la cavité, une règle et son **ID Otolithe** ([Fig. 11](#)) (Le Meleder, Sauger, & Dubroca, 2022).
- **Estimer la phase de maturité** en suivant les critères de l'échelle WKASMSF (ICES, 2018).
- **Extraire délicatement les deux gonades** en sectionnant à la base de l'orifice génital. Attention à l'orientation des gonades. En ouvrant le poisson par le ventre et en orientant la tête de l'individu vers la gauche, la **gonade dans la partie supérieure du poisson sera la gauche (G)** et la **gonade dans la partie inférieure sera la droite (D)** ([Fig. 12](#)).
- **Prendre une photo des deux gonades** détachées, à l'extérieur de la cavité ([Fig. 12](#)).



Figure 12. Ouverture de la cavité abdominale et mise en évidence des gonades

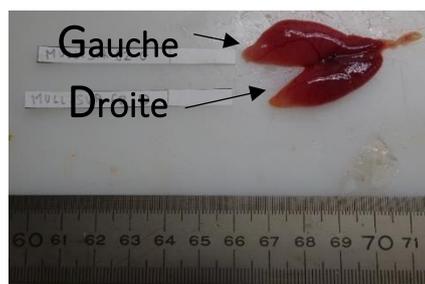


Figure 11. Photographie des gonades à l'extérieur du poisson

- Chez les femelles, les ovaires sont souvent connectés entre eux vers la partie médiane ou inférieure des ovaires. Cela implique qu'il y a de **forts risques de déchirements de la paroi gonadique sera déchirée lors de la séparation des ovaires**.
- **Séparer les deux gonades** et **peser les séparément** sur la balance de précision (à 0.01g).
- **Vérifier la présence de parasites** dans le poisson.
- **Récupérer le foie et le peser** sur la balance de précision (à 0.01g).

- Si les gonades ont une longueur de plus de 3 cm, faire une section de 2 cm dans la partie centrale de la gonade. **Attention à ne pas prendre une section où la paroi gonadique n'est pas éventrée !**
- Placer une section de gonade à plat dans une histocassette avec une étiquette d'identification ([Annexe 1](#)). Éviter de faire toucher l'échantillon et l'étiquette en papier.
- Fermer l'histocassette et, sous une sorbonne avec des gants en nitrile, **submerger les histocassettes dans le fixateur de Davidson** pendant 24h à 48h au réfrigérateur (48h pour les gros échantillons d'ovaire avec œufs hydratés).

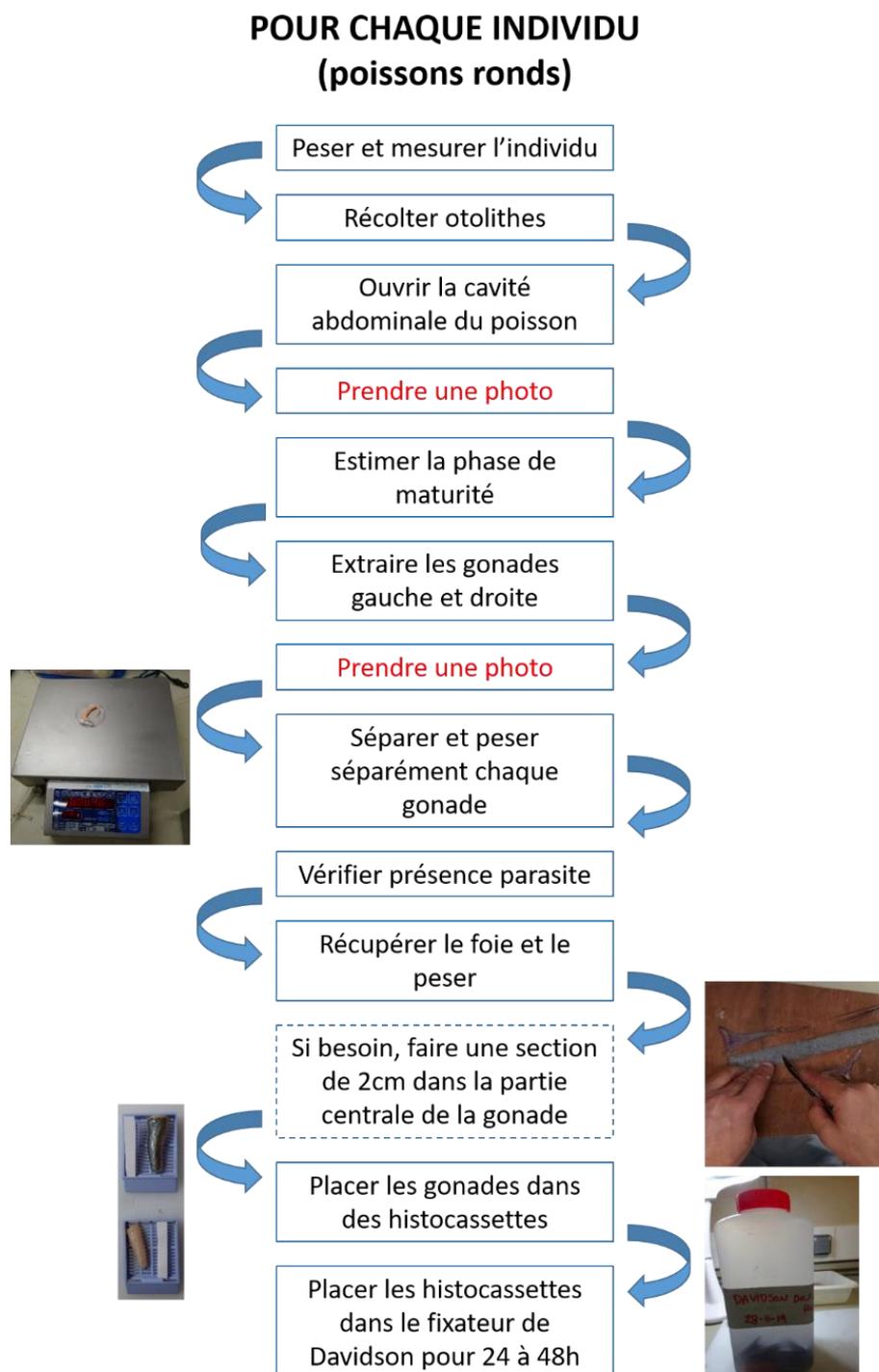


Figure 13. Diagramme des étapes d'extraction de gonade de poisson rond.

3.6. Homogénéité cellulaire

Pour les poissons marins, la première fois qu'un suivi histologique pour une espèce est mis en place, il est nécessaire de vérifier l'homogénéité cellulaire au sein de la gonade. Cela permet de contrôler s'il y aura des différences de structures cellulaires en fonction de l'endroit de prélèvement de la section dans la gonade.

Cette vérification se fait :

- **qu'une seule fois par espèce et par sexe**
- sur 15 individus à des phases de maturité identiques (de préférence pêchés en même temps)
- pas sur des individus immatures
- avec des gonades de plus de 4cm de long
- éviter les individus en ponte si possible

La méthodologie d'échantillonnage est identique à celle présentée aux sections 3.4 et 3.5, la seule différence intervient lors de la coupe des gonades, **après les avoir pesées et prises en photos.**

- Orienter les gonades afin d'avoir la gonade Dorsale/Gauche en haut et la Ventrale/Droite en bas. La partie de la gonade qui était la plus proche de la tête du poisson est orientée à gauche, c'est la partie antérieure de la gonade. La partie de la gonade qui était la plus proche de la queue du poisson est orienté vers la droite, c'est la partie postérieure de la gonade.
- **Couper les gonades en 3 sections de au moins 1cm (2cm maximum).** Une section dans la partie antérieure, une section dans la partie médiane de la gonade et une section dans la partie postérieure. **Attention à ne pas éventrer la paroi gonadique des sections !**
- Dans chaque histocassette, mettre une **étiquette d'identification** ([Annexe 1](#)) avec l'**ID Otolithe + position de la gonade échantillonnée + la position de la section.** **Position section : 1 = Antérieure, 2 = Médian, 3 = Postérieure** ([Fig. 14](#)).
- Exemple d'étiquette pour une section centrale de la gonade dorsale (D2) d'une cardine quatre tâche (LEPIBOS) : 
- Placer **une section de gonade à plat dans chaque histocassette** ([Annexe 1](#)). Éviter de faire toucher l'échantillon et l'étiquette en papier.
- Fermer l'historcassette et, sous une sorbonne avec des gants en nitrile, **submerger les histocassettes dans le fixateur de Davidson** pendant **24 à 48h** au réfrigérateur (48h pour les gros échantillons d'ovaires avec œufs hydratés).

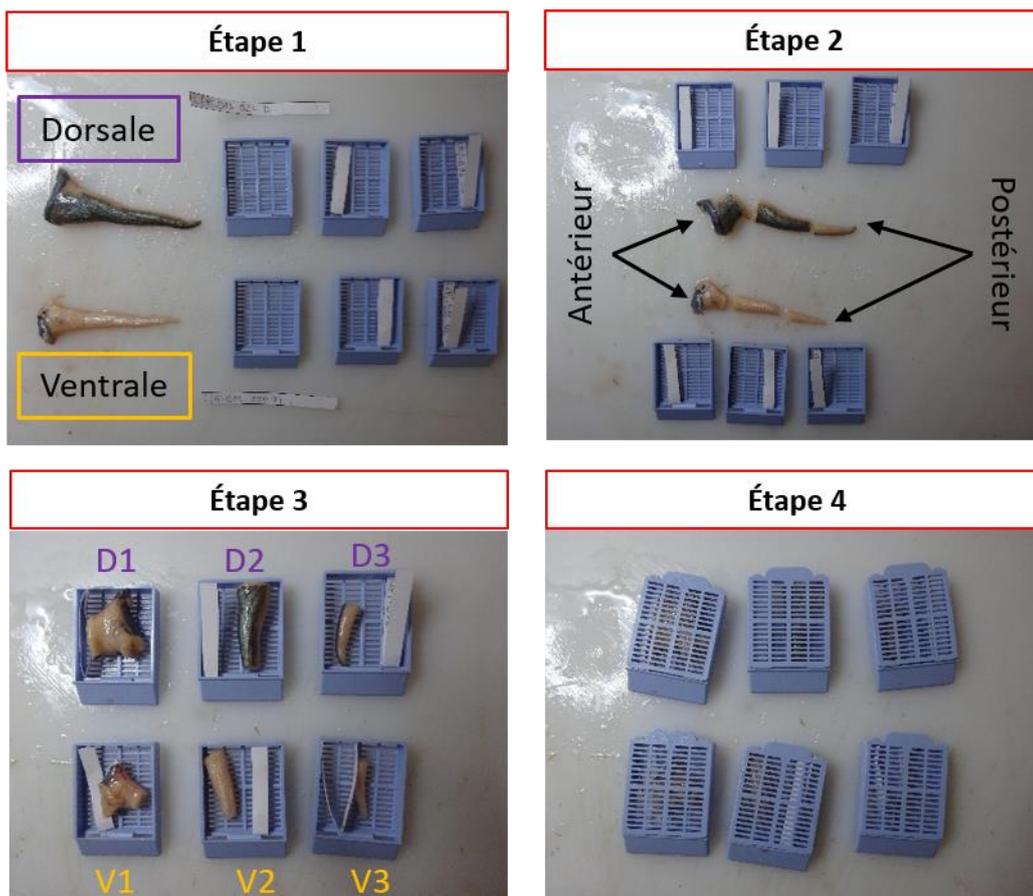


Figure 14. Diagramme des étapes d'extraction de gonades pour la validation d'homogénéité.

4. Redécoupe des échantillons et conservation

Après avoir séjournée dans le fixateur de Davidson pour une durée de 24h à 48h à 4°C, les échantillons prendront une texture caoutchouteuse et **doivent être placés dans de l'éthanol 70°**.

Pour cela, **sous une sorbonne et en portant des gants en nitrile**, utiliser une grande pince en inox pour retirer les histocassettes du fixateur de Davidson et les poser sur du papier absorbant ([Fig. 16](#)). Le papier absorbant viendra absorber le trop plein de fixateur.

Si le fixateur de Davidson est trouble (utilisation pour plus de 120 échantillons et/ou après des ovaires riches en ovocytes hydratés), les vider dans une poubelle adaptée (poubelle produits liquides inflammables avec entonnoir de sécurité) afin de récupérer les histocassettes plus rapidement.

Pour chaque histocassette, **vérifiez que l'étiquette ne soit pas collée à l'échantillon**. Si c'est le cas, il y a de forts risques que l'étiquette se déchire lorsque vous la décollez de l'échantillon. Une nouvelle étiquette en papier devra donc être préparée.

Par la suite, **recouper un bord de chaque échantillon**, afin de préparer un bord droit pour l'inclusion et faciliter la coupe ([Fig. 15](#)).

Remplacez l'échantillon et l'étiquette dans l'histocassette avant de la refermer et la submerger dans **l'éthanol à 70°**. Les échantillons peuvent rester plusieurs mois dans l'éthanol à température ambiante.



Figure 16. Matériels à préparer sous hotte.



Figure 15. Redécoupe des bords d'un échantillon.

Déchets :

- Le fixateur de Davidson et l'éthanol sont à éliminer dans un bidon **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE + étiquette CMR**.

5. Déshydratation et inclusion en paraffine

5.1. Déshydratation Manuelle

Suite à la redécoupe des échantillons, ces derniers passent 24 à 48h dans de l'éthanol 70), voir plusieurs semaines si besoin.

Avant la déshydratation manuelle, **n'oublier pas de faire fondre 500mL de paraffine en avance (au moins 24h avant) dans deux béciers en étuve** à une température légèrement supérieure au point de fusion de la paraffine utilisée (60°C). Changer les bains de paraffine quand ceux-ci ne sont plus limpides. **Couvrir les béciers de paraffine avec un couvercle ou de l'aluminium afin d'empêcher les vapeurs de butanol de se disperser dans l'étuve.**

Pour un volume de 500mL de paraffine et 15 échantillons de 2 cm, changer les bains d'éthanol et butanol au bout de 3 fournées d'échantillons, ou si les alcools sont colorés ou troubles.

- Manipulations sous sorbonne avec des gants en Nitrile et vêtements de protection.
- Éviter l'inhalation de produits toxiques (fixateur de Davidson & butanol) 
- Utiliser la grande pince en inox pour passer les échantillons d'un flacon à un autre

Avec une longue pince en inox, placer les cassettes d'inclusion dans les bains suivants ([Fig. 17](#)) :

- 1- Ethanol à 70° pendant 24 à 48h voir plusieurs semaines si besoin
- 2- Ethanol à 95° pendant 24 à 48h
- 3- Ethanol à 100° pendant 24 à 48h
- 4- Butanol 100° pendant 24 à 48h voir plusieurs semaines si besoin
- 5- Mise en paraffine liquide pendant 12 à 24h dans l'étuve à 60°C
- 6- Changement du bain de paraffine pendant 12 à 24h dans l'étuve à 60 °C
- 7- Inclusion des échantillons ([Section 5.2](#))

Déchets :

- Le fixateur de Davidson, l'éthanol et le butanol sont à éliminer dans les bidons **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE + étiquette CMR.**
- La paraffine après solidification par refroidissement est à jeter dans des fûts (car présence de butanol dans les bains de paraffine) **UN 2926 SOLIDE ORGANIQUE INFLAMMABLE, TOXIQUE**

Nettoyage de paraffine :

- **Sur les surfaces :** utiliser un couteau à mastiquer pour enlever le gros des morceaux et les éclaboussures de paraffine. Passer une éponge avec de l'eau chaude et savon liquide. Terminez le nettoyage avec du papier absorbant imbibé légèrement d'éthanol à 70°.
- Pour les **outils en inox** (pinces, pics) : les enrouler dans du papier absorbant et les passer à l'étuve une nuit à une température légèrement supérieure au point de fusion de la paraffine.

DÉSHYDRATATION

----- PRÉLÈVEMENT -----

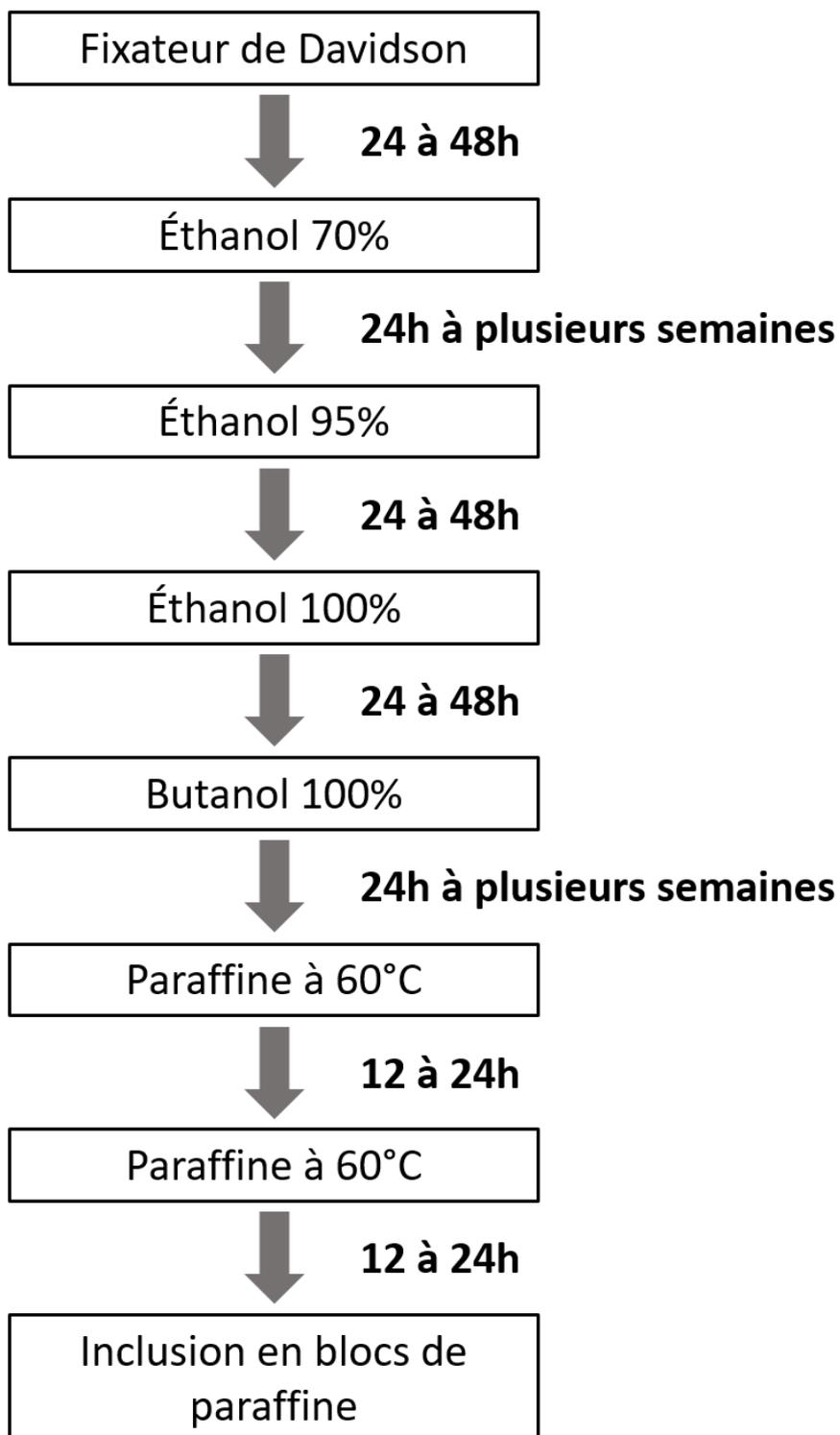


Figure 17. Schéma des différentes étapes de déshydratation manuelle des échantillons histologiques de gonades de poisson

5.2. Inclusion en blocs de paraffine

Ne pas oublier de placer le b cher avec 500mL de paraffine pour l'inclusion dans l'étuve (60 C) au moins 24h avant cette étape.

Manipulations avec gants en nitrile et blouse

Une fois les échantillons ayant fini de séjourner dans le deuxième bain de paraffine liquide ([section 5.1](#)), ils sont prêts à être inclus dans un bloc de paraffine.

- Faire fondre préalablement la paraffine dans un b cher à bec verseur en inox dans l'étuve (60 C)
- **Remettre le b cher verseur avec la paraffine dans l'étuve entre chaque utilisation !**
-  viter de mettre les mains sur le b cher (engendre refroidissement et colmatage de paraffine)
- Mettre une pince fine dans l'étuve pour la garder chaude
- **Remettre la pince fine dans l'étuve, sur un morceau de papier absorbant, entre chaque utilisation !**
- Sortir les histocassettes une à une pour éviter le colmatage de la paraffine

Pour un échantillon :

- A l'aide d'une grande pince en inox, sortir une cassette du pot de paraffine dans l'étuve.
- Poser la cassette sur le plateau en plastique, l'ouvrir et à l'aide de la petite pince chauffée, enlever l'échantillon et son étiquette.
- Sortir le b cher en inox de l'étuve et remplir le moule en silicone au $\frac{3}{4}$ de paraffine ([Fig. 18a](#)).
- Remettre le b cher dans l'étuve et prendre la pince chauffée.
- Avec la pince chauffée, poser l'échantillon à la verticale au centre du moule, le bord plat (red coup ) doit être positionné tête bas sur le fond du moule ([Fig. 18b](#)).
- Rajouter l'étiquette de l'échantillon sur le rebord, en insérant la moitié de la partie grisée de l'étiquette dans la paraffine. La partie écrite doit se trouver côté extérieur, pour pouvoir ensuite la replier sur l'échantillon ([Fig. 18c](#)).
- Remettre la pince fine dans l'étuve et sortez le b cher en inox afin de compléter le moule avec de la paraffine, jusqu'à obtenir un d me de paraffine ([Fig. 18d](#)).
- Remettre le b cher en inox contenant la paraffine dans l'étuve.

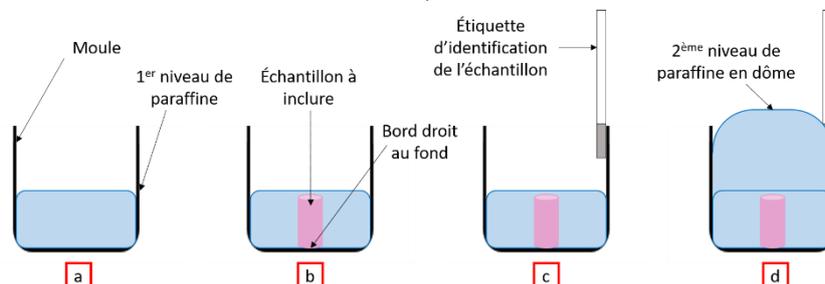


Figure 18. Schéma des différentes étapes d'inclusion dans la paraffine des échantillons histologiques : a) remplir le moule aux $\frac{3}{4}$ de paraffine ; b) placer l'échantillon avec une pince chauffée ; c) ajouter l'étiquette d'identification ; d) compléter le moule avec de la paraffine jusqu'à obtenir un d me

Si besoin, les blocs peuvent être démoulé au moins 15 minutes après inclusion, une fois que la paraffine a durci. Le moule peut-être nettoyé et réutilisé juste après. Les blocs peuvent aussi être placé au frigo et démoulé plus tard.

Laisser les échantillons en blocs de paraffine au moins 24h au réfrigérateur avant la coupe au microtome !

6. Coupes au Microtome

La manipulation d'un microtome nécessite une formation de sécurité au préalable !

- Garder les blocs de paraffine sur un pain de glace avant de les couper (facilite la coupe)
- Couper en sections de 3µm
- Mettre la platine à un angle de 5° pour les gros échantillons (plus de 5mm)
- Utiliser une lame usagée pour dégrossir le bloc de paraffine
- Utiliser une lame neuve pour la coupe afin d'éviter les stries provoquées par l'utilisation de lames usagées
- Ne pas prendre la première coupe du ruban
- Garder un geste à vitesse régulière permet de ne pas avoir de pliures sur les coupes
- Dans le bain-marie, ne pas laisser les coupes plus de 2 minutes
- Choisissez les sections les plus jolies (section entières et complètes). Pour les séparer, utiliser le pic sur les jointures entre deux sections
- Mettre plusieurs sections d'un même échantillon par lame
- Éviter les sections avec des pliures, bulles d'air et stries
- Éviter de mettre les échantillons trop près des bords de la lame
- **Vérifier que la paroi gonadique est complète !** (microscope)

Annoter les lames au crayon de papier et les mettre dans l'étuve (37°C) au moins 12h (peut rester plusieurs jours) sur un plateau recouvert de papier absorbant.

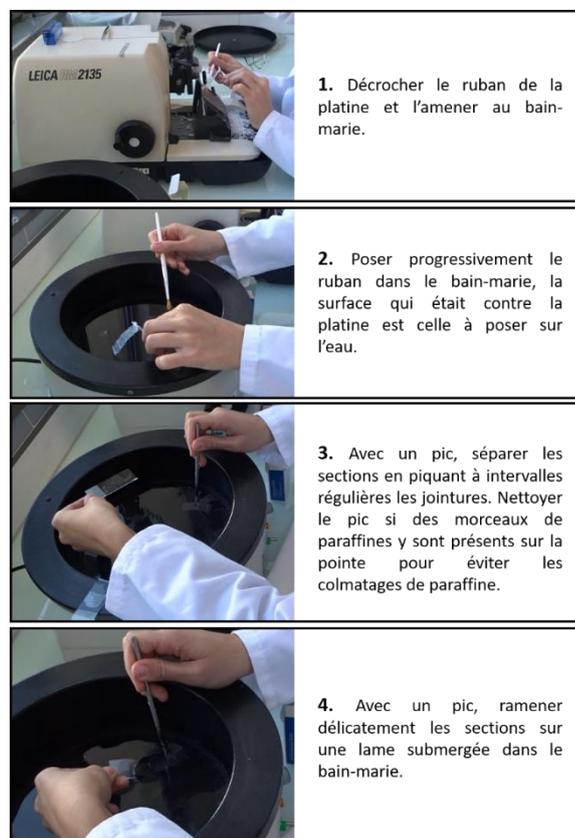


Figure 19. Diagramme des différentes étapes de préparation des sections d'échantillons coupées au microtome.

7. Colorations et montage des lames

7.1. Coloration au trichrome de Prenant-Gabe

Après séchage des lames dans une étuve à 37°C (une nuit minimum), les lames peuvent être colorées. La coloration au **trichrome de Prenant-Gabe** met en évidence les tissus conjonctifs en vert, les muqueuses en rose et les noyaux en gris.

Toutes les étapes suivantes se déroulent par bain des lames dans les différentes solutions, sous une sorbonne, avec port de blouse et gants en nitrile, pour éviter de respirer les vapeurs d'alcool et de diasolv. 

Les bains sont à préparer préalablement dans des cuves en plastiques ([Fig. 20](#)). Elles sont remplies de façon à ce que toutes les lames soient entièrement dans les produits lors de l'immersion des portes lames ([Fig. 3](#)) et sont annotées avec les produits qu'elles contiennent ainsi que la durée de bain à réaliser. L'utilisation d'un ou plusieurs chronomètres est indispensable. Chaque étape de la coloration est à réaliser à la suite.

Les passages à l'eau distillée se font dans des flacons ou des cuves en faisant un mouvement de va et vient avec le porte lames. Les rinçages à l'eau courante ou à l'eau distillée se font avec une pissette ([Fig. 21](#)).

Déparaffinage :

- 1- Diasolv : 5 minutes
- 2- Diasolv : 5 minutes

Hydratation :

- 3- Ethanol 100% : 5 minutes
- 4- Ethanol 100% : 5 minutes
- 5- Ethanol 95% : 5 minutes
- 6- Ethanol 70% : 5 minutes
- 7- Eau distillée : passage

Coloration :

- 8- Hématoxyline de Groat 1% : 1 minute précisément (coloration des noyaux en gris ardoise)
Les solutions d'hématoxyline contiennent de l'hématéine et un mordant métallique. Ce mordant est responsable de la coloration.
- 9- Eau courante : rinçage jusqu'à éclaircissement
- 10- Eau distillée : Passage
- 11- Eosine Y aqueux 1% : 8 minutes (coloration du cytoplasme en rose). L'éosine colore les cytoplasmes en rose et les fibres dans une gamme de roses plus ou moins vifs selon l'acidophilie des différents éléments
- 12- Eau distillée : rinçage
- 13- Acide phosphomolybdique 1% aqueux : 30 secondes (différentiation éosine/vert lumière)(à changer après 3 passages)
- 14- Vert lumière aqueux 0.2% : 30 secondes (coloration du tissu conjonctif en vert)

Déshydratation :

- 15- Ethanol 100% : 5 minutes (premier bain à changer à chaque passage)
- 16- Ethanol 100% : 5 minutes
- 17- Diasolv : 5 minutes (à changer dès que besoin)



Figure 20. Cuvettes en plastique annotées avec les produits de coloration et les temps de bain.



Figure 21. Rinçage à l'eau distillée avec une pissette.

Déchets :

- Les alcools + colorants, alcool + Diasolv sont à éliminer dans les bidons **UN 1993 LIQUIDE INFLAMMABLE TOXIQUE**
- L'éosine et le vert lumière ne sont pas toxiques. Il convient de les éliminer dans un bidon **UN 3082 MATIERE DANGEREUSE DU POINT DE VUE DE L'ENVIRONNEMENT LIQUIDE**
- L'hématoxyline de Groat est à éliminer dans un bidon **UN 2810 LIQUIDE ORGANIQUE TOXIQUE** (présence de métaux lourds, toxiques)

7.2. Montage entre lame et lamelle

Sous sorbonne, en portant blouse, gants en nitrile et lunettes de sécurité, monter les lamelles sur les lames en utilisant du Diamount.

À l'aide d'une pipette en plastique jetable, déposer quelques gouttes de Diamount sur les lames, puis placer la lamelle par-dessus ([Fig. 22](#)). Éviter les bulles d'air et ne pas laisser la lamelle dépasser de la lame.

Mettre les lames montées sur un plateau recouvert de papier absorbant, et mettre le tout en étuve (60°C) 24h pour la polymérisation de la colle. Elles peuvent ensuite être sorties, nettoyées et rangées ([Section 8](#)).

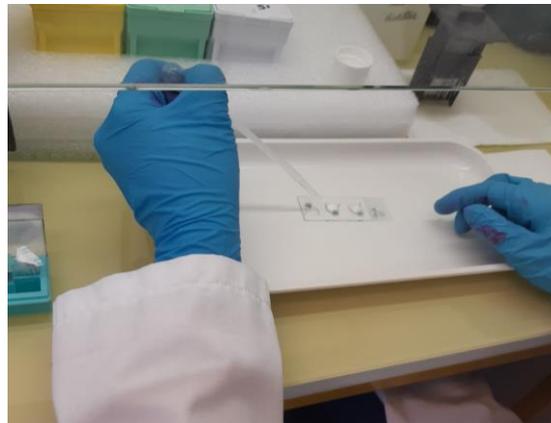


Figure 22. Montage des lames au Diamount

Nettoyage :

- La hotte peut être nettoyée avec de l'éthanol.
- Les lames et lamelles cassées doivent être jetées dans une poubelle jaune pour déchets de laboratoire.

COLORATION AU TRICHROME DE PRENANT-GABE

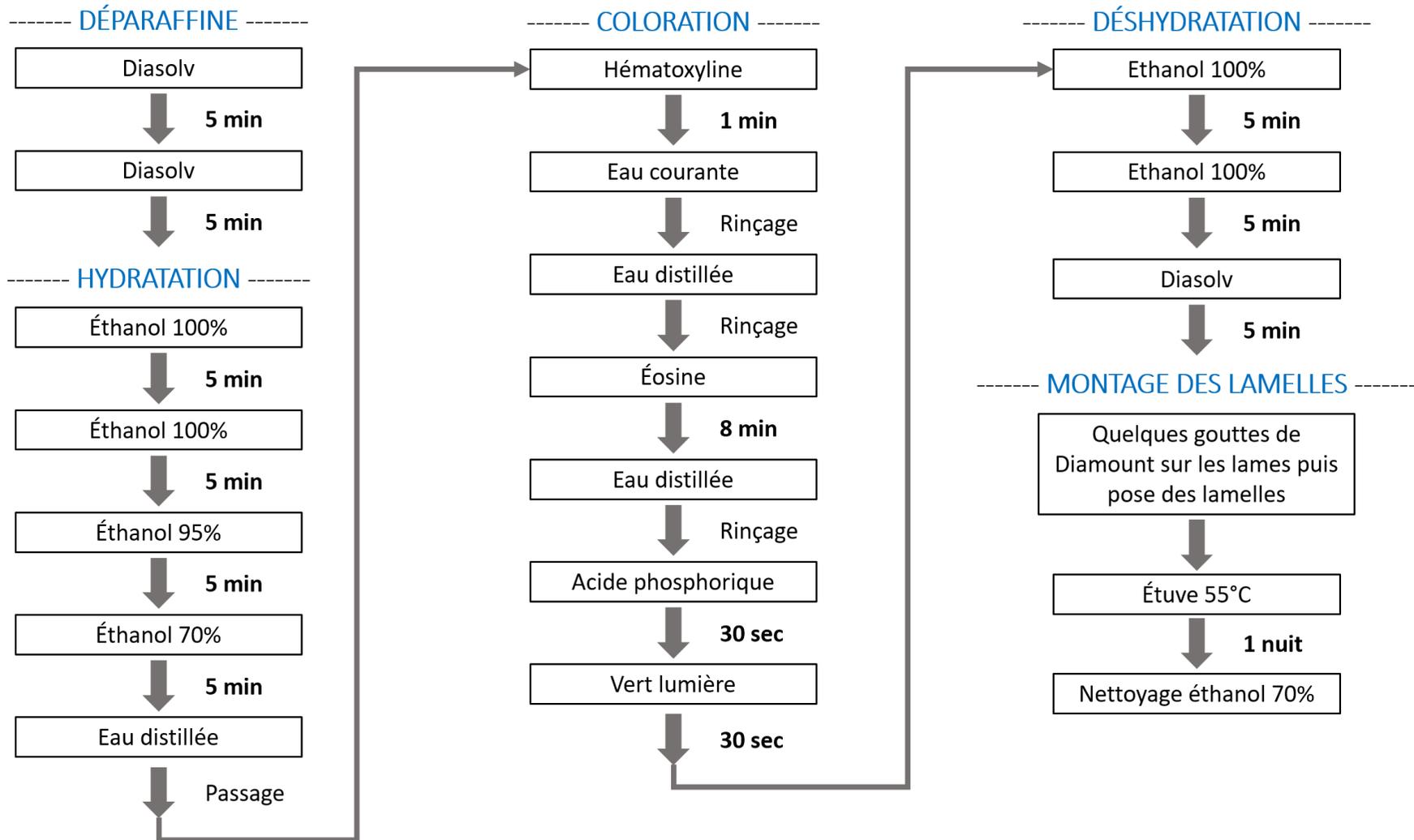


Figure 23. Diagramme des étapes de coloration avec le trichrome de Prenant-Gabe.

8. Nettoyage, numérisation et stockage

8.1. Nettoyage des lames

Si un excédent de Diamount® est sur les lames, il est possible d'enlever le gros de l'agent collant en grattant avec une lame. Submerger la lame quelques minutes dans de l'éthanol peut aussi ramollir la colle afin de l'enlever plus facilement. Avant de scanner les lames, bien les nettoyer avec un papier absorbant imbibé d'éthanol.

Ranger les lames dans une boîte à lames histologiques.

8.2. Numérisation des lames

Il est possible de numériser les lames afin de conserver une copie virtuelle des coupes. Le scanner utilisé au cours du projet MATO est le modèle Olympus VS120 piloté par le logiciel Olympus VS-ASW. Il a été paramétré pour réaliser les scans des lames à un grossissement x20 et réaliser une acquisition d'images à 3 profondeurs différents dans un espace de 3µm (épaisseur du ruban de paraffine). Ces 3 images ont par la suite été automatiquement fusionnées par le scanner en gardant le pixel le plus net entre les 3 profondeurs.

Après l'étape de l'overview, il est nécessaire de délimiter la zone de scan qui est souhaitée. Pour cela, sélectionner le meilleur motif parmi les coupes présentent sur la lame selon les critères suivants :

- Paroi gonadique complète
- Pas de plis, trous, déchirures
- Bonne coloration, ni trop intense, ni trop faible
- Coupe entière dans la zone du scan

Dans le cas où aucune des coupes ne respecte l'entièreté de ces critères, choisir celle qui s'en rapproche le plus. Une fois le motif choisi, placer les points de focus en faisant attention à ne pas les placer sur une zone sans tissus.

A la fin de la numérisation, les scans des lames sont au format « .vsi ». **Ne pas oublier de sauvegarder l'ensemble des fichiers de sortie du scanner sur un disque dur à la fin de la journée.**

La lecture des lames numérisée s'effectue avec le logiciel QuPath (version 0.3.2)(Bankhead et al., 2017). Pour plus de détails, voir le protocole rédigé par Carine Sauger dans le cadre de sa thèse (Berthelin et al., 2023; Dubroca et al., 2023; Kellner & Sauger, 2019).

8.3. Stockage des lames et blocs de paraffine

Si les lames histologiques ne sont plus utilisées, elles peuvent être rangées dans les petites boîtes en carton qui contenaient les nouvelles lames histologiques. Annoter correctement les boîtes (espèce, sexe, date, projet).

Les blocs de paraffine avec échantillon peuvent être entourés de scotch. Un tour de 1½ de scotch suffit pour recouvrir la partie du bloc coupé (avec l'échantillon en vue) et l'étiquette. **Attention de scotcher l'étiquette dans le bon sens, afin de pouvoir lire le nom de l'échantillon !**

De plus, il est conseillé de ranger les blocs dans des sachets « ziplocs », annotés correctement (espèces, sexe, date, projet). Ces sachets peuvent ensuite être rangés dans un carton, stocker dans un endroit sec, frais et ventilé.

Bibliographie

- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath : Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
- Berthelin, C., Dubroca, L., Kellner, K., Le Meleder, A., Martin, V., & Sauger, C. (2023). *Lexicon of histological structures found in the ovaries and during the oogenesis of the striped red mullet, Mullus surmuletus (Linnaeus, 1758)*. <https://doi.org/10.13155/75174>
- Dubroca, L., Elie, N., Heude-Berthelin, C., Kellner, K., Le Meleder, A., Lepoittevin, M., Martin, V., Nivet, T., Sauger, C., & Villain-Naud, N. (2023). *Stereology reading protocol when using quantitative histology for the determination of sexual maturity in fish ovaries*. <https://doi.org/10.13155/75173>
- Elleboode, R., Badts, V., Bonnet, C., Destreez, C., & Prigent, G. (2022). *Guide d'utilisation de l'interface de saisie IMAGINE : Integration and Management tool for biological INDICES (Version 1) [Pdf]*. Ifremer. <https://doi.org/10.13155/86111>
- Garren, F. (2020). *Fiche d'aide à l'identification / Poissons, céphalopodes, décapodes et crustacés / Mer du Nord, Manche, Golfe de Gascogne et Mer Celtique*. 91.
- ICES. (2012). *Report of the Workshop for maturity staging chairs (WKMATCH)*. ICES CM 2012\ACOM:58, 59.
- ICES. (2018). *Report of the Workshop for Advancing Sexual Maturity Staging in Fish (WKASMSF)*. ICES CM/EOSG: 38. 75 pp., 79.
- Kellner, K., & Sauger, C. (2019). *Lexique des structures histologiques des ovaires et de l'ovogenèse de la plie, Pleuronectes platessa (Linné, 1758)*. 34.

- Le Meleder, A., & Dubroca, L. (2022). *MaturityScaleTools : A maturity identification tool for fish of commercial interest* [Logiciel]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7079655>
- Le Meleder, A., & Dubroca, L. (2023). *LM-Anna/MaturityScaleTools : A maturity identification tool for fish of commercial interest* [Logiciel]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8214855>
- Le Meleder, A., Sauger, C., & Dubroca, L. (2022). *Protocole de photographie des gonades de poisson*. <https://doi.org/10.13155/89703>
- Le Meleder, A., Sauger, C., Dubroca, L., Parrad, S., Varenne, F., & Martin-Baillet, V. (2022). *A gonad photographs dataset for fish of commercial interest* [jeu de données]. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7079594>
- Manfred, G. (1968). *Techniques histologiques*. Masson et Cie.
- Martoja-Pierson, M., & Martoja, R. (1967). *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson et Cie. Paris.
- Sauger, C., Quinquis, J., Dubroca, L., Parrad, S., Kellner, K., & Heude-Berthelin, C. (2019). *Sample collection protocol for the extraction of female gonads in the megrim (*Lepidorhombus spp.*) for maturity staging through histology*. 15.

Annexe 2 : Feuille de prise de données

ID Otolithe	Nom espèce	Division CIEM	Rectangle Stat CIEM	Date	Longueur totale poisson (cm)	Poids poisson non vidé (g)	Présence parasites	Age (an)	Maturité visuelle	Poids foie (g)	Poids gonade dorsale/droite (g)	Poids gonade ventrale/gauche (g)	Nombre de sections	Navire	Code_Station	LatDec	LongDec	Depth (m)	

Annexe 3 : Table de Gay-Lussac

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale	95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25									
	90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41								
	85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56							
	80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83						
	75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2					
	70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64				
	65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15			
	60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76		
	55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47	
	50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	
	45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	11,41
	40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	25,55
	35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	43,59
	30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	67,45
	25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65	100,73
20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	150,55	
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	233,64	
10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50	399,85	

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale **x (en bleu)** pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.

- Manipulation sous hotte avec des gants en Nitrile et vêtements de protection.

Annexe 4 : Davidson

Pour 4 litres de Davidson, ajouter dans l'ordre ci-dessous :

- 400ml de glycérol
- 800ml de formaldéhyde
- 1200ml d'éthanol 95%
- 1200ml d'eau de mer filtrée
- 360 ml d'acide acétique

- Ajouter l'acide acétique au dernier moment avant utilisation
- Stockage pré-Davidson (sans acide acétique) plusieurs mois au frigo
- Stockage Davidson plusieurs semaines

- Manipulation sous hotte avec des gants en nitrile et des vêtements de protection.
- Les échantillons doivent être complètement submergés.
- Ne pas dépasser les 1.8L par flacon de prélèvement (évite les déversements accidentels lors de la manipulation)
- Les flacons doivent être correctement identifiés (date, nom du projet, espèces, produit)
- À conserver à 4°C, même sans échantillons.
- Lors du transfert des échantillons du fixateur de Davidson à l'éthanol 70%, si le fixateur de Davidson est trouble (utilisation pour plus de 150 échantillons et/ou après des ovaires riches en ovocytes hydratés), il est possible de vider dans une poubelle adaptée (poubelle produits liquides inflammables avec entonnoir de sécurité) afin de récupérer les histocassettes plus rapidement.

- Le fixateur de Davidson étant une **substance dangereuse (classification H315, H319, H317, H341 et H350 selon le règlement CE n°1272/2008)**, sa manipulation doit se faire **sous sorbonne avec des gants en Nitrile et les protections adaptées** (blouse, lunettes de protection, chaussures fermées,...)
- Éviter l'inhalation de produits toxiques (Davidson) 
- Les flacons doivent être rangés dans un endroit adapté : **NE PAS LES STOCKER DANS UN FRIGO AVEC DES PRODUITS DESTINÉS À LA CONSOMMATION**

Annexe 5 : Colorants Trichrome de Prenant-Gabe

- Vert Lumière 0.2% :

- | | |
|--|------------|
| ○ Vert Lumière (en poudre) | 2g |
| ○ Acide acétique (C ₂ H ₄ O ₂) | 10 gouttes |
| ○ Eau distillée | QSP 1L |

Couleur verte

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection
- Filtrer avant usage
- Stockage indéfiniment à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Récupérable après usage

- Hématoxyline de Groat :

- | | |
|---|-------|
| ○ Solution A : | |
| ▪ Eau distillée | 500ml |
| ▪ Acide sulfurique concentré (H ₂ SO ₄) | 8ml |
| ▪ Ammonium Fer III sulfate (H ₄ NO ₈ S ₂ Fe, 12H ₂ O – MW=482.19) | 10g |
| ○ Solution B : | |
| ▪ Ethanol 95° | 500ml |
| ▪ Hématoxyline | 5g |

Mélanger A + B. Attendre 30 minutes (dépôt).
Couleur violette

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection
- Filtrer avant usage
- Stockage 2 à 3 mois à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Changer quand couleur brune

- Eosine 1% :

- | | |
|-------------------|--------|
| ○ Eosine Y (ou B) | 10g |
| ○ Eau distillée | QSP 1L |

Couleur rouge

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection
- Filtrer avant usage
- Stockage indéfiniment à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Récupérable après usage

- Acide phosphomolybdique 1% :

- | | |
|---|--------|
| ○ Acide phosphomolybdique (H ₃ [P(MO ₃ O ₁₀) ₄], 10H ₂ O – MW = 1824.96) | 10g |
| ○ Eau distillée | QSP 1L |

Couleur Jaune

- Manipulation sous sorbonne avec des gants en Nitrile, blouse, chaussures fermées et lunettes de protection.
- Stockage indéfiniment à l'obscurité. Flacons brun ou recouverts d'aluminium pour stocker les produits
- Changer après quelques passages