

# Économiser de l'eau et ne plus polluer lors du rinçage des échantillons histologiques fixés au liquide de Bouin en utilisant un automate de déshydratation

Béatrice Porcon<sup>1</sup>, Gilles Monod<sup>2</sup>

**Résumé.** Pour rincer les tissus de poisson fixés au liquide de Bouin, j'ai détourné l'usage d'un automate de déshydratation. Avec cette technique de rinçage, on ne pollue plus les eaux usées, on économise 500 L d'eau environ à chaque cycle (10 000 L d'eau par an). Les échantillons sont mieux rincés et par conséquent les réactifs utilisés dans les étapes ultérieures (éthanol et butanol) sont moins souillés par de possibles restes de fixateur. On économise donc ces réactifs. L'ensemble des améliorations apportées par cette méthode se veut une contribution au développement durable.

**Mots clés :** économie d'eau, pollution chimique, automate de déshydratation, histologie, liquide de Bouin

## Introduction

A l'Inra, l'Unité LPGP (Laboratoire de Physiologie et Génomique des poissons) mène des recherches qui visent à produire, diffuser et valoriser des connaissances et des savoir-faire qui contribuent au développement de la pisciculture. LPGP privilégie l'étude de deux fonctions physiologiques chez le poisson : la reproduction et la croissance ainsi que le comportement. Les recherches font appel, entre autres, à des techniques d'histologie. Je travaille sur le plateau technique d'histologie où je suis notamment responsable de l'utilisation et de la maintenance de l'automate de déshydratation. Cet appareil sert à déshydrater les tissus biologiques qui, après prélèvement, ont été fixés chimiquement, pour ensuite les inclure dans la paraffine avant qu'ils soient coupés au microtome. L'un des fixateurs utilisés est le liquide de Bouin dans lequel les prélèvements, rassemblés dans des cassettes à trous, sont immergés 48 h au minimum. Au bout de ce temps là, avant la déshydratation, il est obligatoire de rincer les échantillons pendant 2 à 3 h. Si les échantillons ne sont pas suffisamment rincés, l'acide picrique présent dans ce fixateur risque de contaminer les bains d'alcool qui servent à la déshydratation ce qui nécessitera un renouvellement fréquent de ces bains.

Jusqu'en 2012 les échantillons fixés dans le liquide de Bouin étaient rincés à l'eau courante, à l'aide d'un système fabriqué au laboratoire et constitué d'un seau avec un trou sur le côté faisant office de trop-plein (**Figure 1**). Le rinçage durait entre 2 h et 3 h. Ce qui impliquait une consommation d'eau d'environ 500 L par session de rinçage, et le rejet à l'évier de résidus de liquide de Bouin. Il faut savoir que le liquide de Bouin fait partie de la classe des CMR (cancérogène, mutagène et repro-toxique). Sa composition est la suivante : solution aqueuse saturée en acide picrique 75%, formol (solution de formaldéhyde à 37%) 20%, acide acétique glacial 5%.

---

<sup>1</sup> UR Laboratoire de Physiologie et Génomique des poissons, INRA, 35042 Rennes, France  
[Beatrice.Porcon@inra.fr](mailto:Beatrice.Porcon@inra.fr)

<sup>2</sup> Mission Développement durable, INRA, Centre de Rennes Bretagne-Normandie, 35042 Rennes, France



*Figure 1. Dispositif de rinçage utilisé avant la mise au point de la méthode décrite dans cet article (photo : INRA).*

Je fais en moyenne 20 cycles de déshydratation d'échantillons fixés au liquide de Bouin par an, soit environ 10 000 L d'eau qui partaient au tout à l'égout. La technique que j'ai mise au point et que je présente ci-dessous ne produit plus que 200 L d'eau souillée traités par la filière déchets chimiques.

La durée de rinçage dépend du nombre d'échantillons à traiter :

- pour une quantité inférieure à 30 cassettes, la durée de rinçage est de 2 h environ ;
- pour une quantité supérieure à 30 cassettes, la durée de rinçage est de 3 h environ.

Pour diminuer la consommation d'eau et pour éviter de polluer les eaux usées, j'ai mis en place une nouvelle technique de rinçage en utilisant l'automate de déshydratation présenté dans la **Figure 2**.



*Figure 2. Automate de déshydratation modèle STP120 de marque MYR (photo : INRA).*

Cet automate de marque MYR acheté en 2012 est commercialisé par la société Microm. Il se compose de 9 bacs ronds en plastique de 1,8 L chacun, pour les solvants et de 3 bacs chauffants de 1,8 L pour la paraffine. Il est doté d'un panier pouvant contenir 100 cassettes et d'un couvercle.

## Description de la méthode mise au point

### Élimination du liquide de Bouin ayant servi à la fixation des échantillons

Avant de mettre les cassettes contenant les échantillons dans l'automate, il faut les égoutter. Pour cela, je mets le panier en acier inoxydable de l'automate dans un entonnoir que je positionne au dessus d'un bidon de collecte. Puis, je vide le flacon contenant les cassettes immergées dans le liquide de Bouin dans l'entonnoir. Le bidon

contenant le liquide de Bouin usagé sera ensuite traité comme déchet chimique (**Figure 3**). C'était déjà le cas avant de mettre cette technique au point.



*Figure 3. Dispositif permettant de récolter le liquide de Bouin (photo : INRA).*

### Rinçage avec l'automate

J'ai eu l'idée de détourner la fonction première de l'appareil en le regardant fonctionner. Cet automate fait des va et vient et il centrifuge en continu le panier pour mieux imprégner les échantillons d'alcool, de butanol et pour finir de paraffine. Pour le rinçage, j'ai pensé qu'il serait bien que les échantillons soient traités de la même façon pour évacuer au maximum le liquide de Bouin. Cela serait beaucoup plus efficace qu'un filet d'eau déversé pendant 2 à 3 h sans aucune agitation.

Pratiquement, je récupère le panier inox posé sur l'entonnoir et j'installe son couvercle. Je fixe ce panier directement sur l'automate en position 1 prévue à cet effet (**Figure 4**). Je mets de l'eau courante dans les bacs numérotés de 1 à 6 bis à la place de l'éthanol qu'ils contiennent habituellement. Le bac 6 bis est un bac supplémentaire dont je ne me sers que pour le rinçage. J'ai créé un programme spécial, pour que le programme s'arrête dans le bac « 6 bis ».




*Figure 3. Installation du panier sur l'automate (petites encoches à enclencher pour bien maintenir le panier autour du cercle noir) (photo : INRA).*

Puis je démarre l'automate, programmé pour quatre bacs de rinçages de 30 min et 2 bacs de rinçages de 1h. Pendant tout le temps du rinçage, le panier tourne en continu dans un sens et dans l'autre, tout doucement pour ne pas abimer les échantillons qui se trouvent dans les cassettes, les échantillons sont mieux rincés de cette façon. Entre chaque changement de bac d'eau, l'automate soulève le panier au dessus du liquide et le centrifuge (à 70 tr/min pendant 180 s) afin de l'égoutter ce qui permet d'enlever le maximum de liquide de Bouin. Le programme utilisé ici pour le rinçage est le même que celui utilisé classiquement pour les déshydratations. Ceci ne risque donc pas d'altérer les échantillons, ce d'autant plus qu'ils ont été préalablement fixés dans le liquide de Bouin, ce qui a pour conséquence de les solidifier. À l'Unité LPGP, les tissus fixés au liquide de Bouin sont les gonades (ovaires, testicules) de différentes espèces de poissons. Depuis 4 ans, aucune altération n'a été

## B. Porcon, G. Monod

observée lors des observations microscopiques réalisées sur des coupes de tissus ayant suivi le protocole de rinçage, par rapport au protocole qui était suivi avant (sans rinçage avec l'automate).

### Arrêt du rinçage

J'arrête le cycle de rinçage quand les échantillons se trouvent généralement dans le bac « 5 ». Pour cela j'appuie sur le bouton stop et sur la flèche  deux fois pour remonter le panier. Je retire de l'automate le bac « 6 bis » que je pose sur la paillasse sous hotte. Je décroche ensuite le panier qui se trouve en position « 5 » de l'automate. Puis je mets le panier contenant les échantillons dans le bac « 6 bis » pour éviter qu'ils sèchent à l'air libre. Je vide l'eau souillée de Bouin des bacs « 1 à 5 » dans le même bidon déchet que celui ayant reçu le liquide de Bouin pur. Pour finir, j'essuie les bacs avec du papier absorbant pour y verser les alcools pour la déshydratation.

### Bilan et conclusion

Grâce à l'utilisation de l'automate de déshydratation on ne pollue plus. On économise environ 500 L d'eau par rinçage, c'est à dire environ 10 000 L d'eau par an. De plus, les échantillons sont mieux rincés car les alcools sont beaucoup moins jaunes (couleur qui témoigne de la présence d'acide picrique). Par conséquent cela permet également d'économiser de l'éthanol et du butanol (on peut effectuer un automate de plus avec ces réactifs). L'ensemble des améliorations apportées par cette méthode se veut une contribution au développement durable.

### Remerciements

Adèle Branthonne et Jérôme Bugeon, membres de l'Unité LPGP, sont remerciés pour l'aide qu'ils ont apportée pour la rédaction de cet article.