

Chapitre II : Méthodes d'étude de la cellule
TD N°2 : Techniques de préparation des coupes histologiques

1- Préparation des coupes pour observation au microscope optique

Pour l'étude histologique classique, la préparation des coupes fines se fait en plusieurs étapes :

a) Prélèvement

Le prélèvement effectué sur un organe, doit se faire aussi délicatement que possible afin de ne pas meurtrir les tissus. Une fois obtenu, ce prélèvement doit immédiatement être immergé dans un grand volume de liquide fixateur.

b) Fixation

La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Les liquides fixateurs les plus utilisés en pratique courante sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange de formol et d'acide picrique). La durée de fixation et le volume du fixateur utilisé varient selon le volume des prélèvements. On recommande un volume de fixateur égal à 5 fois le volume du prélèvement.

c) Déshydratation

Le but de cette technique est d'éliminer l'eau contenue dans les organes, par un passage du prélèvement dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (de l'alcool à 50° jusqu'à l'alcool absolu 100°) puis dans des bains de xylène ou de toluène. Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe.

d) Inclusion (Enrobage)

Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine. Le prélèvement baigne dans de la paraffine fondue (chauffée à 56° C) donc devenue liquide et qui infiltre alors toute la pièce. Après 4heures d'inclusion, la paraffine liquide est coulée dans un petit moule en métal « barres de Leuckart ». Après refroidissement, on se trouve alors en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

e) Coupe (Microtomie)

Le passage du bloc de paraffine dans un microtome qui permet de réaliser des tranches de section de 2 à 5 μm d'épaisseur disposées en série régulières sous forme de rubans. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

f) Déparaffinage

le déparaffinage consiste, comme son nom l'indique, à éliminer la paraffine. Les lames sont placées sur une plaque chauffante (à 45-60°C) pendant 15 min, afin d'obtenir la liquéfaction. Éliminer la paraffine en passant les lames dans des bains de toluène ou de xylène.

g) Réhydratation

En immergeant les lames dans des bains d'alcool de degrés décroissant (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool 50°), puis dans l'eau distillée.

h) Coloration

Le but de la coloration est d'accentuer les contrastes afin de différencier les différents constituants tissulaires.

i) Montage et observation microscopique

Après avoir subi une déshydratation (par les bains d'alcool de degrés croissants puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique « baume de Canada » dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre. [Voir la vidéo dans ce lien : https://www.youtube.com/watch?v=glgx6_J6V0&feature=youtu.be].

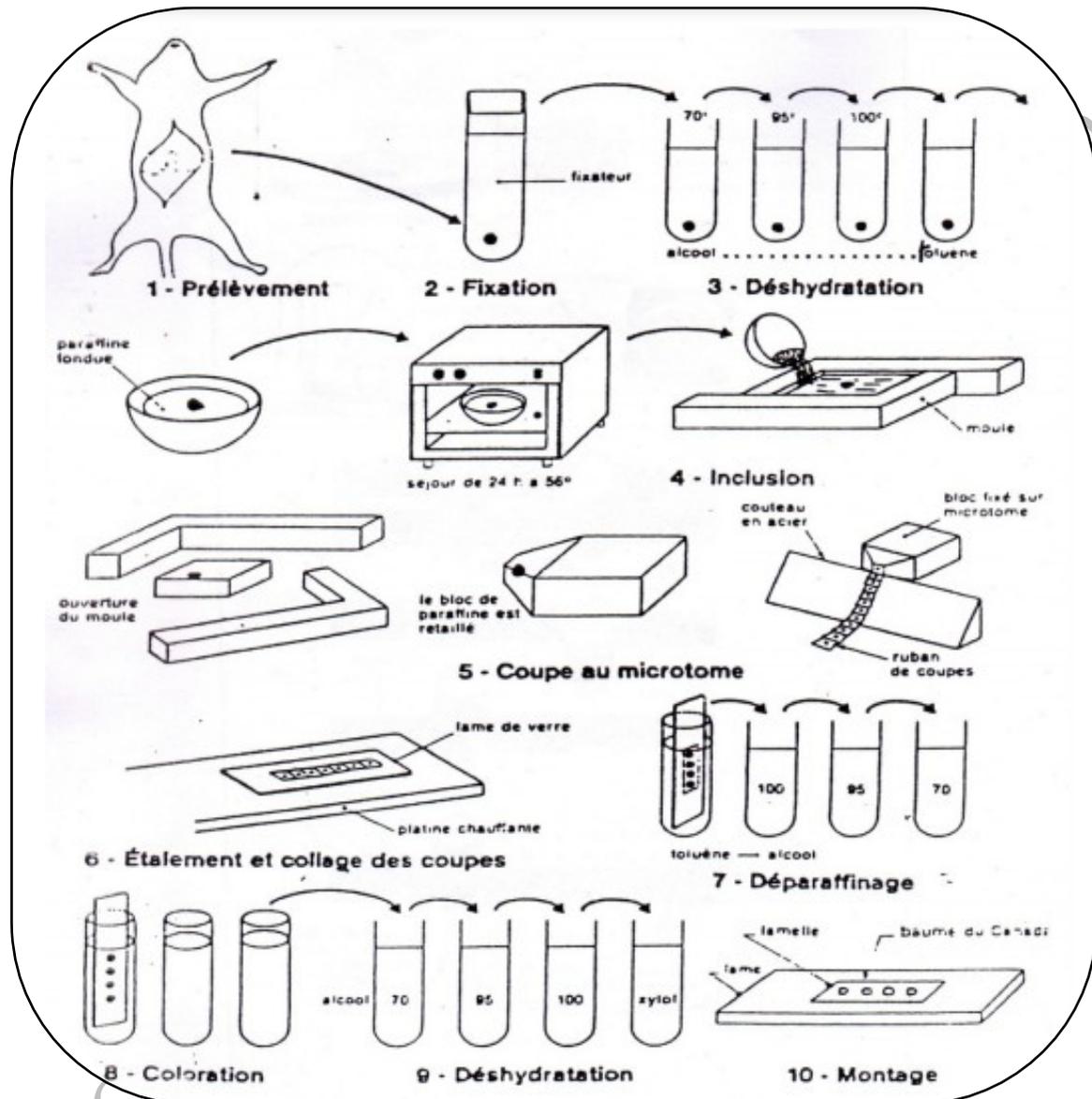


Figure1 : Préparation des coupes pour observation au microscope optique

2-Préparation des coupes pour observation au microscope électronique

La séquence de manipulation est analogue à celle qui a été exposée pour la microscopie optique.

a) Fixation

Elle se fait habituellement dans la glutaraldéhyde $C_5H_8O_2$, suivie d'une post-fixation à l'acide osmique (tétraoxyde d'osmium OsO_4).

b) Déshydratation

Les échantillons vont être passés dans des concentrations croissantes d'éthanol puis dans l'oxyde de propylène.

c) Inclusion

Les échantillons sont inclus dans une résine (araldite) qui permet une solidification de l'échantillon, par leur polymérisation.

d) Coupe (Ultramicrotomie)

Les blocs de résine renfermant l'échantillon sont coupés à l'aide d'un ultra microtome muni d'un couteau de verre ou de diamant qui permet d'obtenir des coupes ultrafines d'environ 80 nm d'épaisseur.

e) Contraste

Les coupes cellulaires sont recueillies sur une grille en cuivre. La grille est trempée dans une solution de métaux lourds (l'acétate d'uranyle et citrate de plomb) pour noircir les structures cellulaires et augmenter le contraste. La grille est ensuite introduite dans le MET pour l'observation [Voir la vidéo sur le ce lien : <https://www.youtube.com/watch?v=7-Mr19fKlu4>].

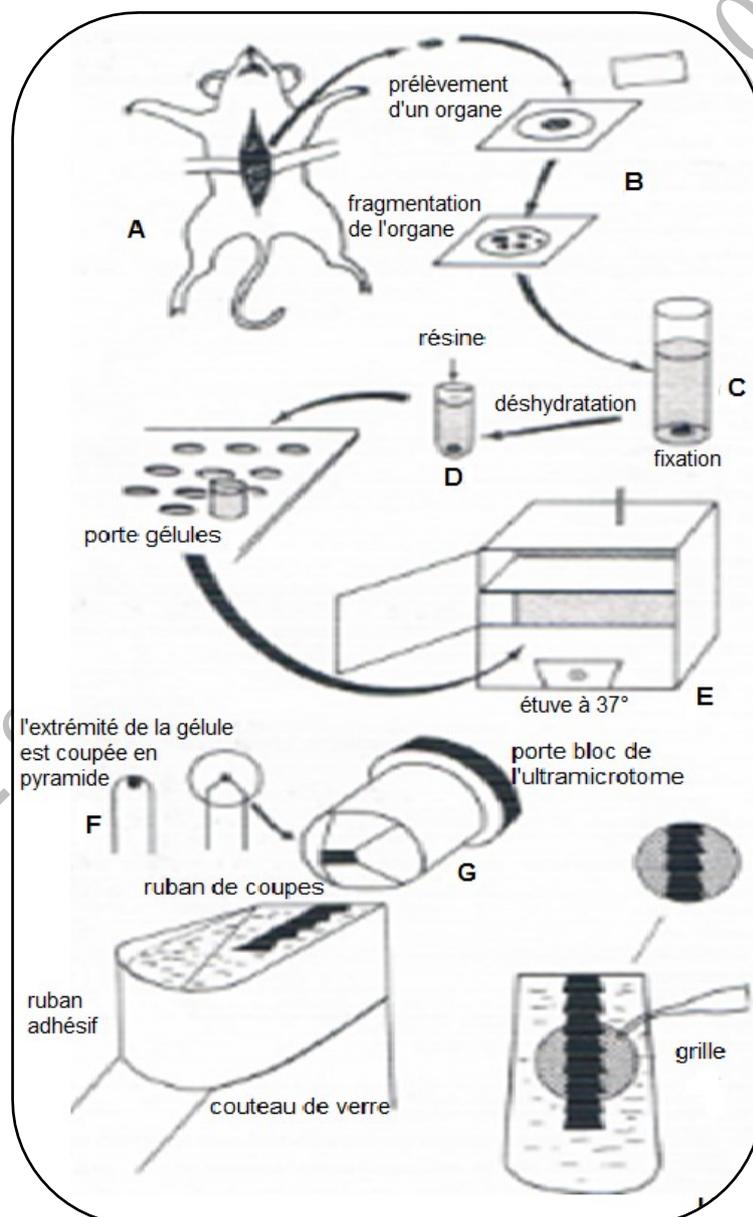


Figure2 : Préparation des coupes pour observation au microscope électronique à transmission