



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 [Figure 1]

La préparation des coupes histologiques se fait en plusieurs étapes :

a) Prélèvement

- Le prélèvement effectué sur un organe, doit se faire aussi délicatement que possible pour éviter la rupture des cellules tissulaires.
- Une fois obtenu, ce prélèvement doit immédiatement être immergé dans un grand volume de liquide fixateur pour empêcher l'autolyse cellulaire.

b) Fixation

- C'est l'action de tuer les cellules par des facteurs chimiques ou physiques, en conservant leur structure dans un état morphologique aussi proche que possible de l'état vivant.
- Elle peut être réalisée par un liquide fixateur ou par congélation. Les liquides fixateurs les plus utilisés en pratique courante sont le formol et 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.
- La fixation a pour but la conservation des structures et le durcissement des tissus.

c) Déshydratation

- La déshydratation est l'élimination de l'eau contenue dans l'échantillon en la remplaçant par l'éthanol.
- L'eau est retirée par un passage du prélèvement dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (de l'alcool à 50° jusqu'à l'alcool absolu 100°).
- Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe

d) Imprégnation

- L'éthanol est non miscible avec la paraffine, il est donc substitué par une solution miscible avec la paraffine.
- L'éthanol est retiré par le passage du prélèvement dans des bains de xylène ou de toluène, afin d'en éliminer les traces d'alcool absolu.
- Le xylène ou le toluène, solvant intermédiaire favorable aux échanges membranaires entre l'alcool ↔ toluène d'une part et toluène ↔ paraffine d'autre part.

e) Inclusion (Enrobage)

- Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine.
- Immerger l'échantillon dans la paraffine liquide maintenue dans une étuve à 56°
- **Mise en bloc** : Après 4 heures d'inclusion, la paraffine liquide est coulée dans un petit moule en métal « barres de Leuckart ». Après refroidissement, on obtient un bloc de paraffine solide, à l'intérieur duquel l'échantillon prélevée est inclus.
- Le but de l'inclusion est de rigidifier l'échantillon, afin de permettre la réalisation de coupes fines et régulières.

f) Confection des coupes histologiques

- Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées à l'aide d'un [microtome](#) permettant d'obtenir des tranches fines de [2 à 5 \$\mu\text{m}\$ d'épaisseur](#), disposées en série régulières sous forme de rubans.
- Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

g) Déparaffinage

- Les lames de verre sont placées sur une [plaque chauffante](#) (à 45-60°C) pendant 15 min, afin de [liquéfier la paraffine](#).
- [Éliminer la paraffine](#) en passant les lames dans des [bains de toluène](#) ou de [xylène](#).

h) Réhydratation

- La réhydratation permet [l'élimination de la paraffine intracellulaire](#), en immergeant les lames dans des [bains d'alcool de degrés décroissant](#) (de l'alcool à 100° jusqu'à l'alcool à 50°), puis dans de l'eau distillée.

i) Coloration

- La coloration permet [d'augmenter le contraste](#) afin de différencier les différents constituants cellulaires.
- La coloration des coupes se fait par différents types de colorants. On utilise les colorants convenables à l'étude.

j) Montage et observation microscopique

- 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. On obtient, ainsi, une préparation histologique prête à être observée au microscope optique.

2- Préparation des coupes pour observation au microscope électronique (MET) [Figure 2]

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

a) Fixation

- Elle se fait habituellement dans le [glutaraldéhyde](#), suivie d'une [post-fixation](#) à [l'acide osmique](#) (tétraoxyde d'osmium OsO₄).

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.

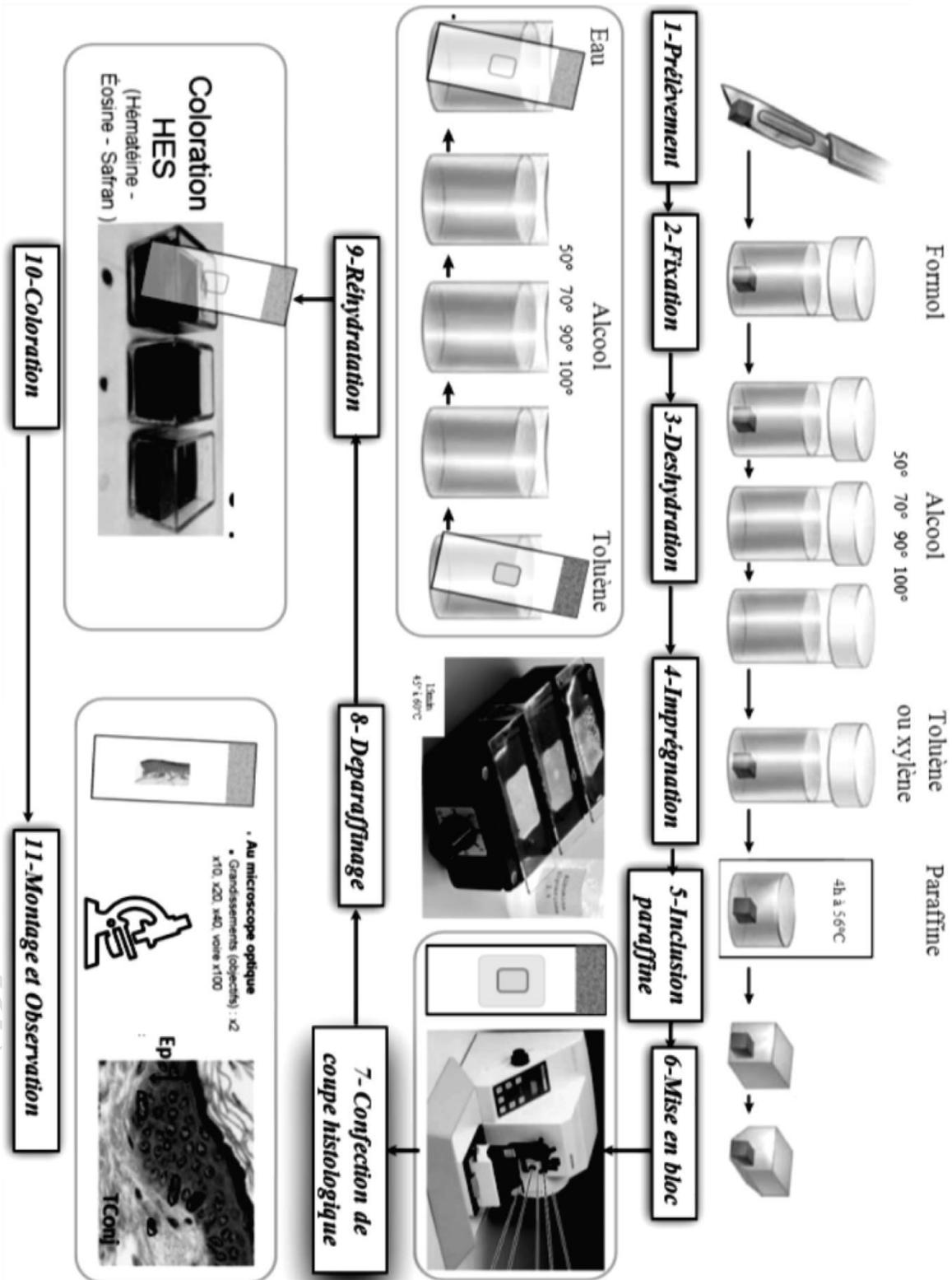


Figure 1 : Préparation des coupes pour observation au microscope optique

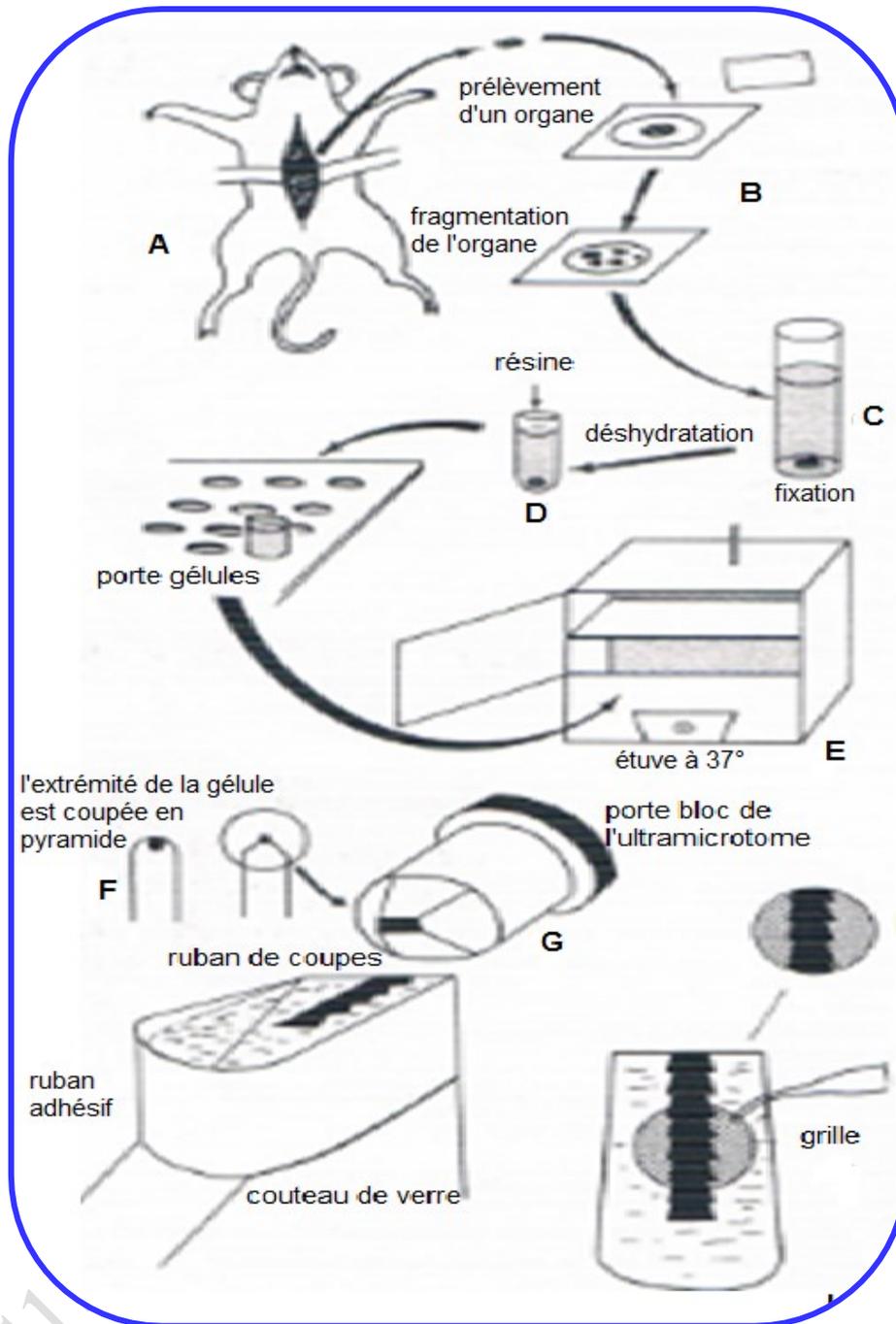


Figure2 : Préparation des coupes pour observation au microscope électronique à transmission