



Université Mohammed V-Agdal
Faculté des Sciences de Rabat
Laboratoire de Zoologie et de Biologie générale



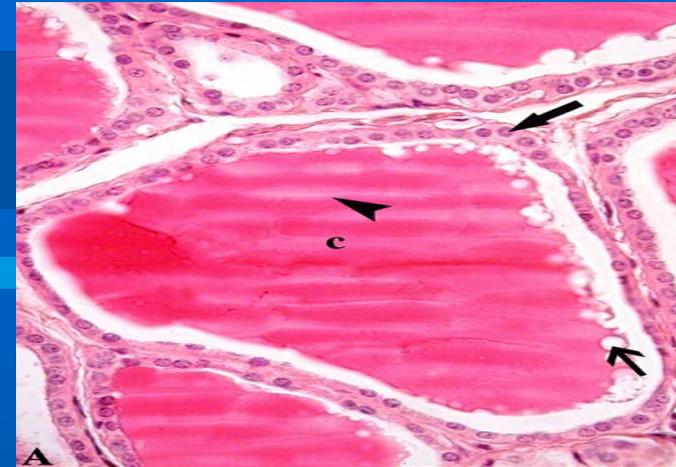
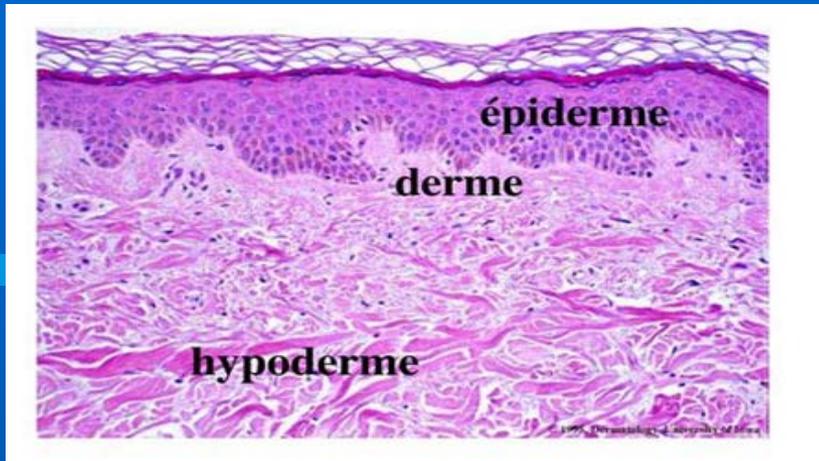
Les techniques de préparation des coupes pour les microscopies optique et électronique



M10 : E1 (Biologie Générale)

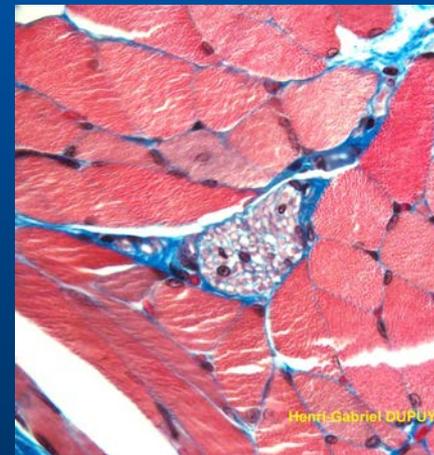
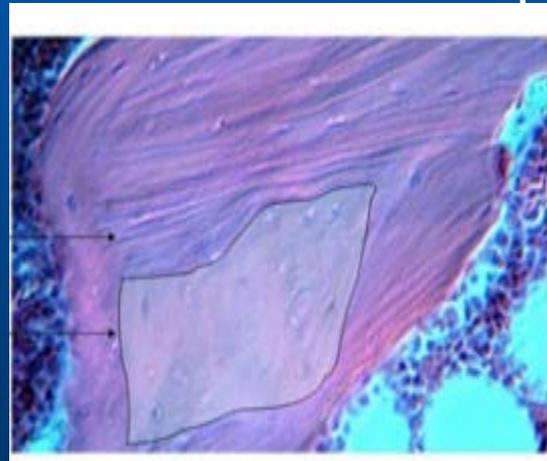
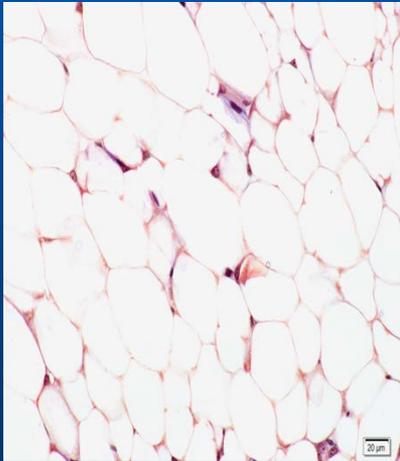
Histologie-Embryologie

Pr. Mariam Naciri



Epithelium de la peau

Epithelium glandulaire (Thyroïde)



Tissus adipeux

L'OS

Muscle

Principes généraux

- 1/ Prélèvement,
- 2/ Fixation,
- 3/ Déshydratation (Alcool et Toluène),
- 4/ Inclusion (paraffine, résine),
- 5/ Coupe (microtome),
- 6/ Colorations,
- 7/ Observation (microscope).

Examens histologiques

- Les examens histologiques sont en règle réalisés après traitement du matériel par des agents:
 - physiques ou chimiques (fixateurs) qui tuent les cellules
 - préserver au maximum leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques.

Préparations biologiques

Les cellules ou tissus peuvent être préparés sous forme:

- frottis,
- d'observations vitale
- empreinte
- Coupe biologique (6 étapes)

1/ Prélèvement

Le matériel est prélevé de différentes façons :

- **Biopsie** (directe comme pour la peau, le muscle ou avec endoscopie pour les organes des appareils respiratoire, digestif, urinaire).
- **Ponction** à l'aiguille (comme pour le liquide pleural, péritonéal, articulaire, pour les ganglions, les seins, la moelle osseuse).

Le matériel histologique peut aussi provenir :

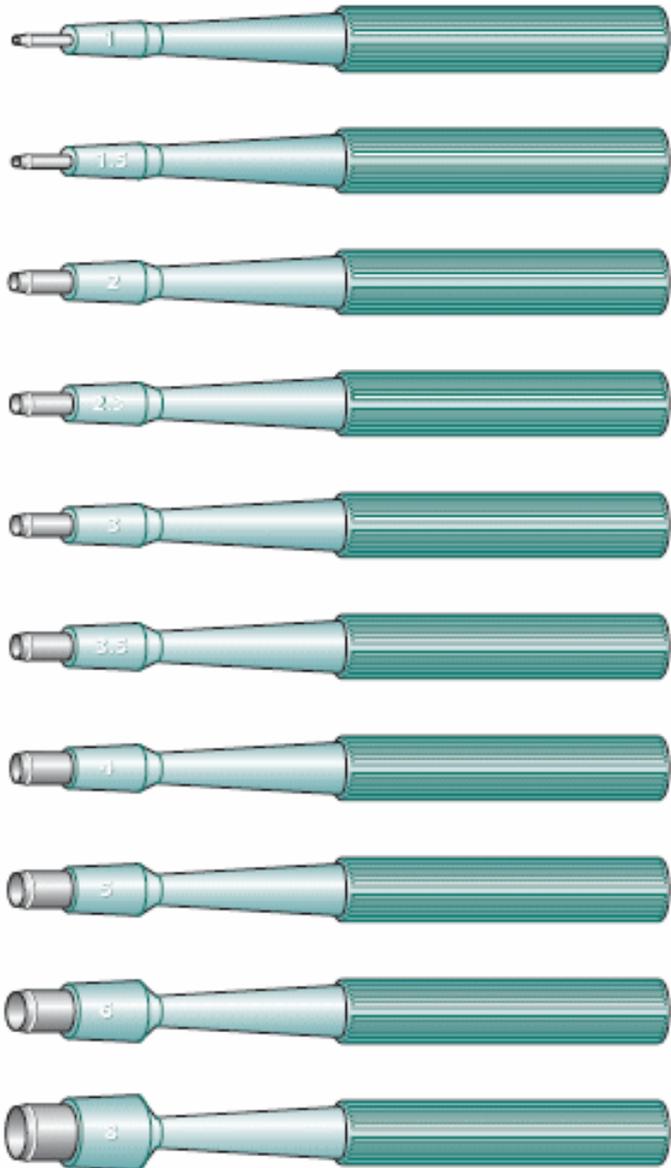
- D'une **pièce opératoire**
- D'une **autopsie**
- Ou de **la dissection d'organe en expérimentation animale.**

Biopsie

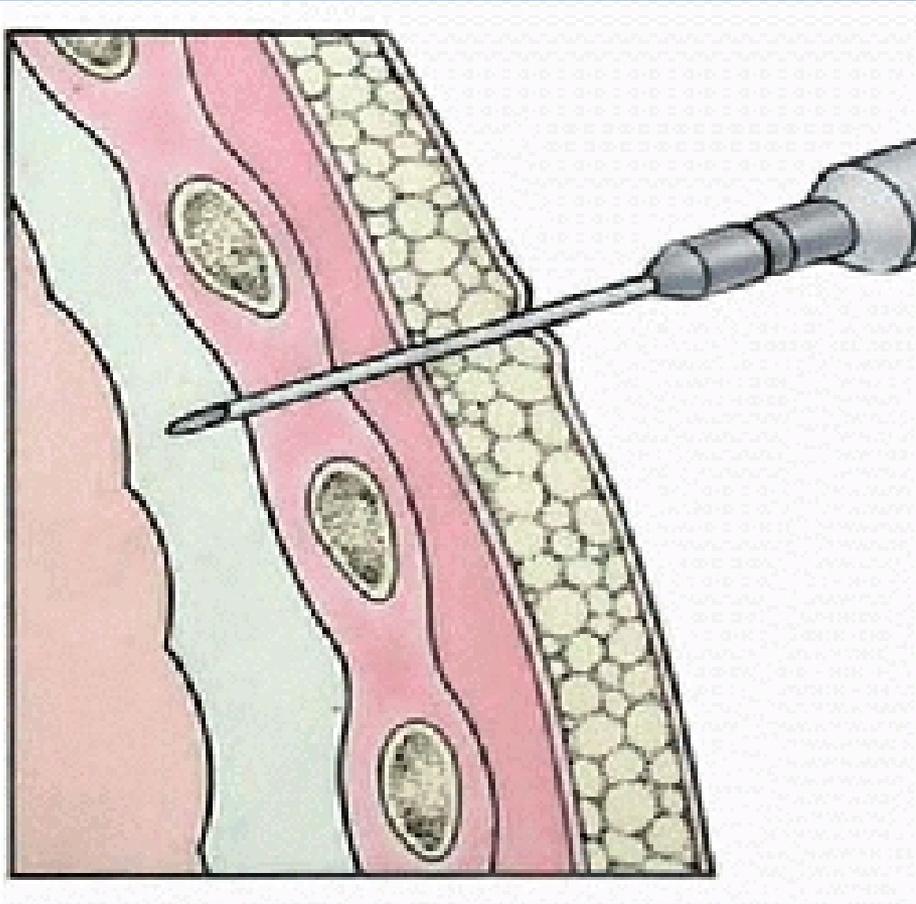
- Prélèvement d'un fragment tissulaire effectué sur le malade permettant de vérifier un diagnostic donné après analyse au microscope.
- Une biopsie est un prélèvement d'un échantillon de tissus de l'organisme effectué afin de procéder à un examen, microscopique le plus souvent, ou, parfois, **biochimique**, **immunologique**, **génétiq**ue ou bien **bactériologique**.

Biopsie

Lorsqu'une biopsie est obtenue à l'aide d'une aiguille, l'échantillonnage dépend de la conception de l'aiguille et de l'énergie de son insertion dans le tissu. L'aiguille utilisée est un tube creux avec une pointe capable de perforer les tissus.



Biopsie



Comme l'aiguille s'enfonce dans le tissu, ce dernier va s'accumuler dans le tube creux. Lorsque l'aiguille est retirée du tissu, l'échantillon reste dans le tube et l'aiguille peut être récupérée pour l'analyse.

TECHNIQUE HISTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE



Biopsie cutanée

Conservation

Afin de conserver l'échantillon dans un état le plus proche possible de l'état in vivo, deux moyens de conservation peuvent être utilisés :

- La congélation, utilisée pour les prélèvements dont le diagnostic doit être connu rapidement ;
- La fixation par un produit chimique comme le formol ou le bouin, qui a pour effet de polymériser les protéines présentes dans l'organe.

Les Frottis

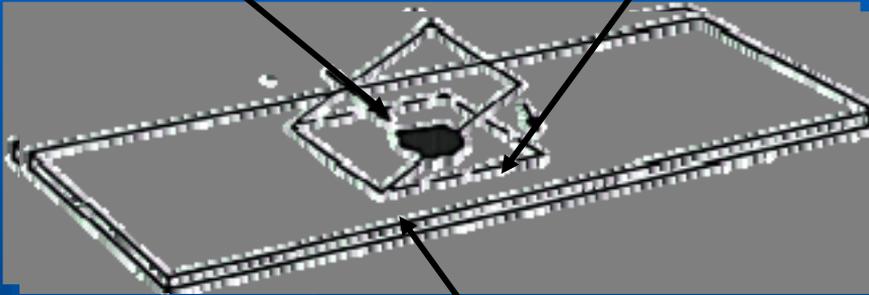
Les frottis qui peuvent être analysés au MO sont :

- **Frottis sanguin** ou de **moelle osseuse** pour le diagnostic de nombreuses maladies (Anémies, Leucémie, etc.)
- **Les frottis vaginaux** sont utilisés pour :
 - Dépistage de cancers
 - Infections

OBSERVATION DE CELLULES VIVANTES

Liquide physiologique

Lame en verre



Lamelle

Des cellules vivantes peuvent être observées **entre lame et lamelle** afin d'évaluer leurs fonctions (par exemple, mobilité des spermatozoïdes).

LES ETAPES DE LA TECHNIQUE HISTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE



Le plus souvent, le **matériel histologique** (= cellules contenues dans un tissu) est **fixé, inclus, coupé et coloré** afin de pouvoir l'observer au microscope.

Prélèvement d'un organe et Fixation

But: **Fig**er les tissus dans l'état le plus proche de leur état initial

Moyens: -Citez des fixateurs

-Le liquide de BOUIN



2/ Fixation

- La conservation des structures et le durcissement des pièces.
- Immédiatement après le prélèvement
- Par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur.
- Les liquides fixateurs les plus utilisés sont **le formol** ou **le liquide de Bouin** (mélange de formol et d'acide picrique).
- La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements:
 - quelques heures pour un petit fragment biopsique
 - plusieurs semaines pour un cerveau humain entier.



le formol seul (formaldéhyde dilué) dans l'eau courante

- bon marché,
- incolore,
- permet la fixation de grosses pièces,
- permet l'immunohistologie
- MAIS
 - allergisant,
 - carcinogène

2/ Fixation

- être rapide,
- permettre des colorations topographiques,
- permettre l'immunohistologie,
- être peu ou pas toxique.
- préserver les structures tissulaires et cellulaires,
- éviter les artefacts (gonflements, rétractions),

Il n'y a pas de fixateur idéal

- Il faut le choisir en fonction de ses avantages et inconvénients.
- Parmi des centaines disponibles !

- Les fixateurs contenant du formol (1)
 - AFA (Acide acétique Formol Alcool)

- très rapide (risques de surfixation),
- permet les marquages immunohistologiques.

MAIS

- peu pénétrant.

idéal pour les biopsies

- Les fixateurs contenant du formol (2)

- Bouin (Acide acétique Formol Acide picrique)

- rapide,

- pénétrant,

- légères rétractions tissulaires,

- très belles colorations topographiques,

MAIS

- ne permet que difficilement l'immunohistologie,

- coloré : tache ! (et ne part qu'avec l'épiderme).

Idéal pour voir des gg. lymphatiques dans le tissu adipeux

Quel que soit le fixateur, le prélèvement doit être échantillonné et la taille des échantillons adaptée à celle de la cassette d'inclusion.



3/ Déshydratation

L'eau tissulaire est remplacée par de la paraffine.

Mais ces milieux ne sont pas miscibles entre eux.

On procède donc par étapes en remplaçant :

- l'eau par un alcool (70°, 95°, 100°)
- l'alcool par un solvant organique (Toluène),
- Toluène par la paraffine

3/ Déshydratation

Élimination de l'eau permettant ensuite l'inclusion dans la paraffine



70°

95°

Alcool

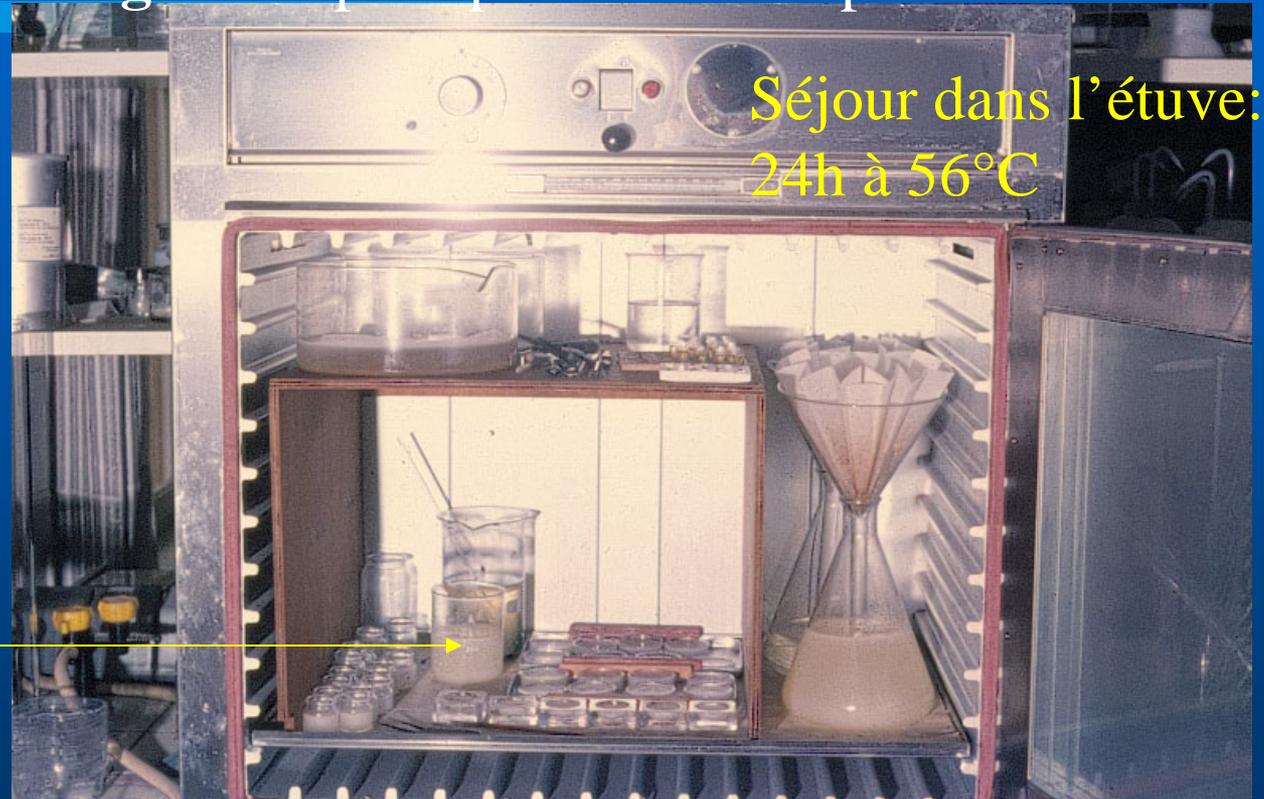
100°

Toluène

Bains successifs dans des borels

4/ INCLUSION

Le prélèvement est imprégné de paraffine fondue afin de le **rigidifier** pour pouvoir le couper ensuite



Paraffine fondue

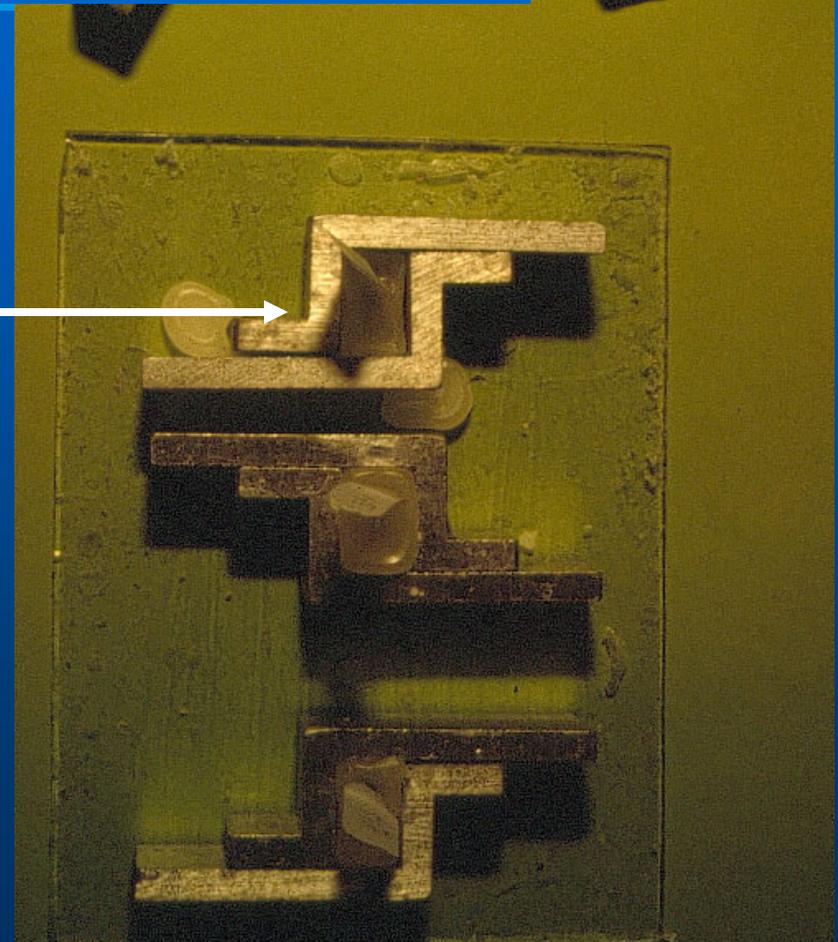
La paraffine est liquide à 56° .

En dessous de cette température, elle se solidifie.

On coule la paraffine fondue contenant le
prélèvement dans un moule constitué
de 2 barres.

A température ambiante, la paraffine se solidifie

moule



Amincissement

- On distingue plusieurs types de coupe selon la méthode de conservation et d'amincissement suivie :

Conservation	Inclusion	Épaisseur de la coupe
Congélation (à -20 °C)	Aucun	5 à 100 μm (MO)
Polymérisation des protéines	Paraffine	5 μm (MO)
Polymérisation des protéines et des lipides	Résine	1 à 0,05 μm (ME)

5/ Les coupes histologiques (MO)

- 2 à 5 μm d'épaisseur,
- quelques centimètres de largeur et longueur,
- nombreuses colorations possibles,
- montées entre lame et lamelle,
- grandissement de 10 à 1000 fois (environ).

5/LES COUPES

Les coupes du bloc de paraffine réalisées avec un **microtome** permettant d'obtenir des tranches de section (**coupes histologiques**) de 2 à 5 μm d'épaisseur.

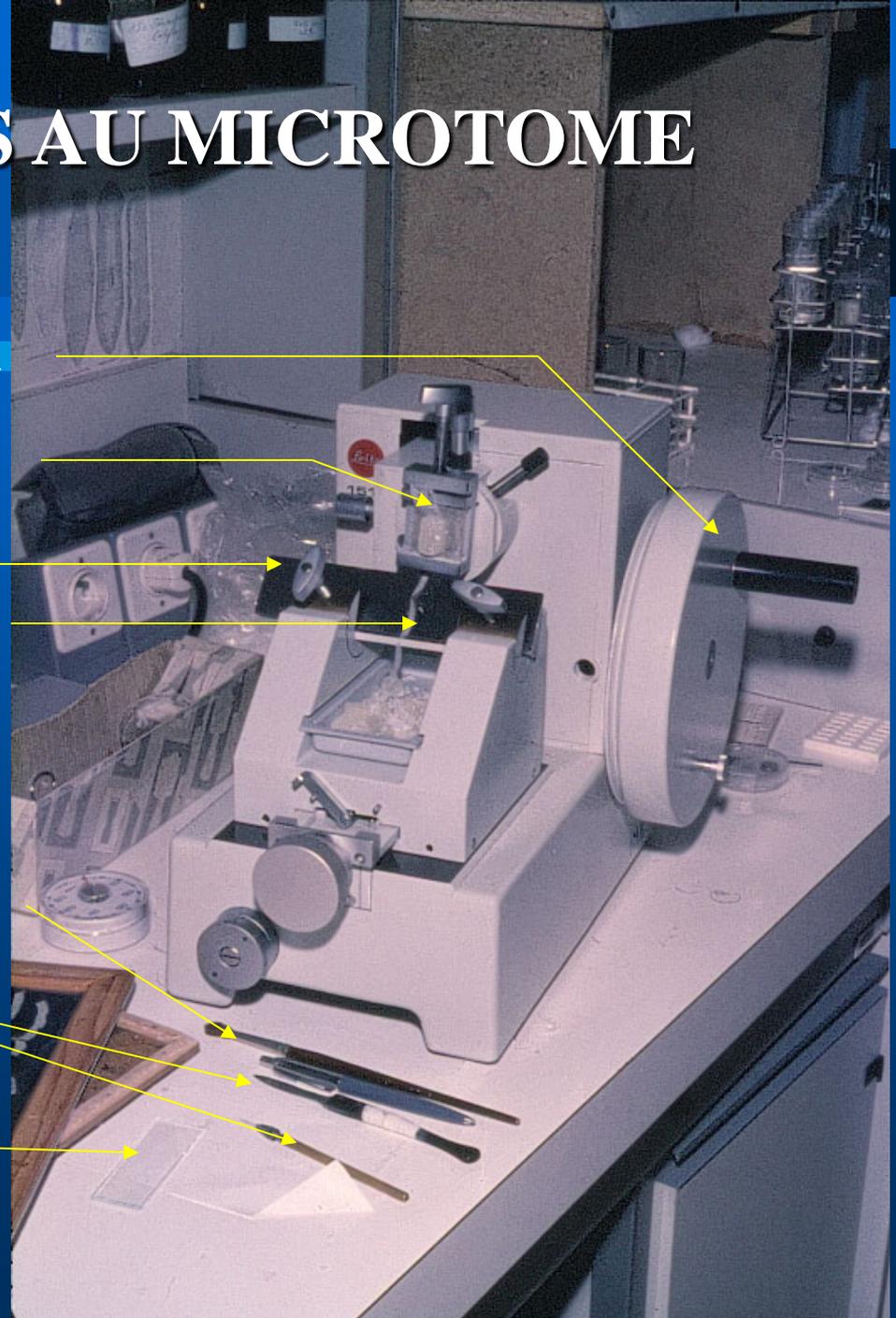
Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.



Microtome

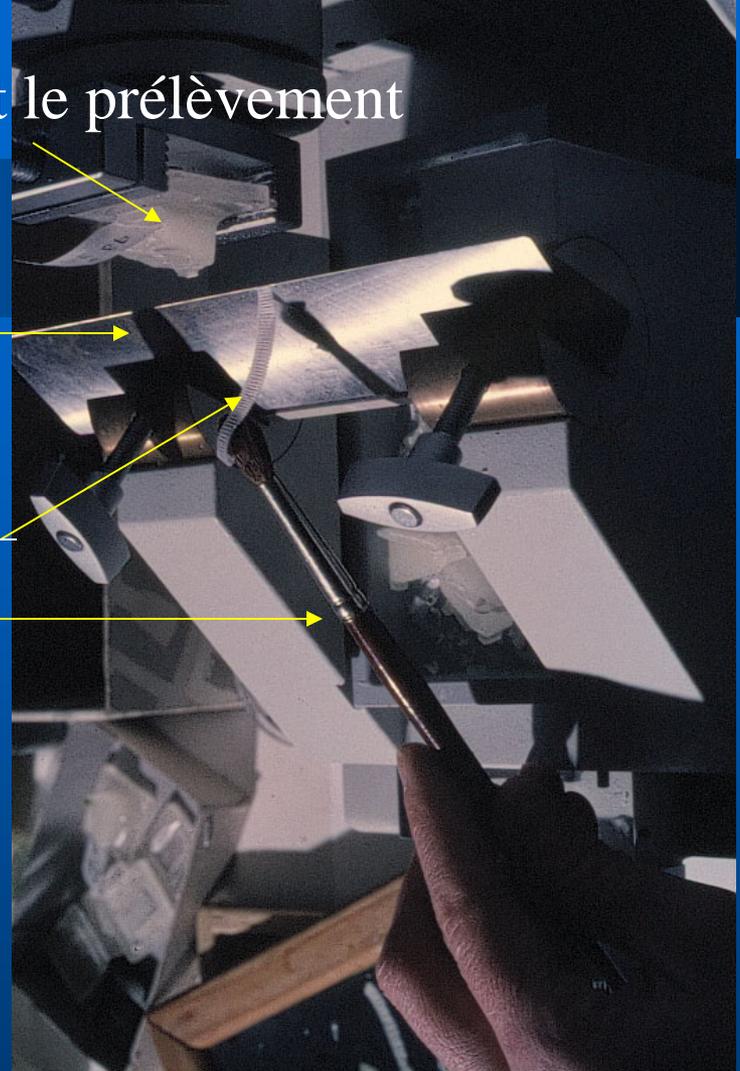
5/ LES COUPES AU MICROTOME

- Manivelle
- Support du bloc de paraffine
- Couteau en acier
- ruban
- pinceau
- scalpel
- Pointe sèche
- lame



Bloc de paraffine contenant le prélèvement

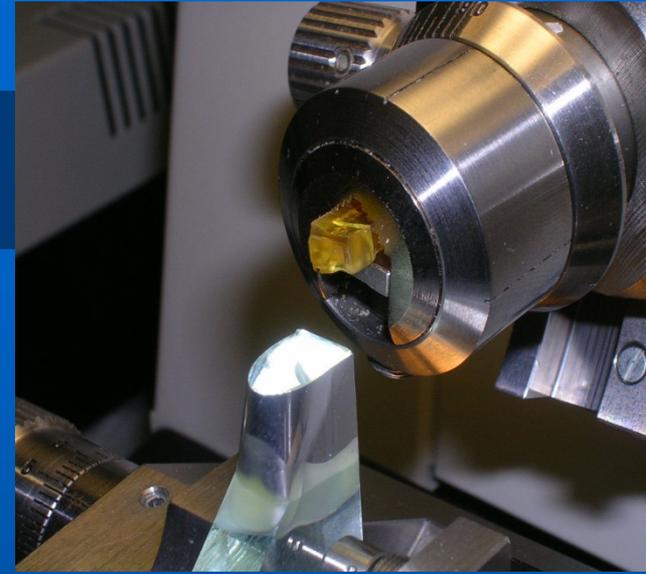
À chaque avancée du couteau,
une coupe est réalisée.
L'ensemble des coupes forment
un ruban
récupéré sur un pinceau.



Réalisation de **coupes fines** (2 à 5 μm) car les préparations sont traversées par les photons.

ULTRAMICROTOME

Un **ultramicrotome** est un appareil de très grande précision qui permet des coupes de **60 à 100 nm** servant en **microscopie électronique**.



TECHNIQUE HISTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE



- La plupart des tissus sont transparents
- Les colorations réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour pouvoir reconnaître les différents éléments du tissu.

Déparaffinage

Étape assurant la réhydratation de la coupe afin de la colorer

toluène , alcool 100°, 95°, 70°, eau



6/ Les colorations

- Réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.
- Les colorants sont en solution aqueuse.
- Les coupes doivent d'abord subir une réhydratation.
- Après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant (100°, 95°, 70°) puis dans l'eau distillée.

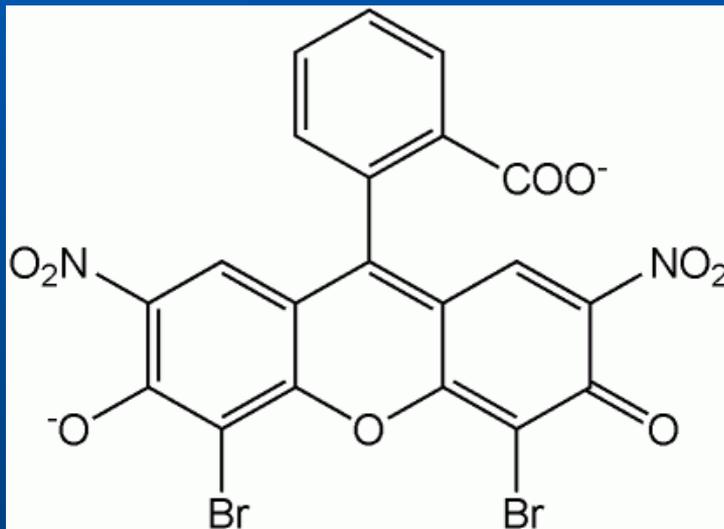
Coloration

- Afin de distinguer les différents tissus, on peut avoir recours à différents colorants :
 - Colorants acides
 - Colorants basiques
- Les substances acides de la cellule sont colorées par un colorant basique, les substances basiques de la cellule par un colorant acide.

Exemple : l'Hématéine-Éosine

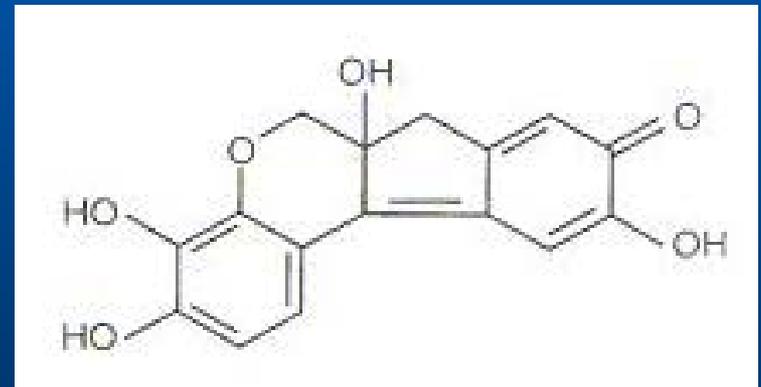
Permet une coloration **violet** du noyau et **rose** du cytoplasme

L'éosine est un colorant acide



Colore en rouge plus ou moins intense le cytoplasme

L'hématéine est un colorant basique



Colore les acides nucléiques en bleu noir

6/ Les colorations

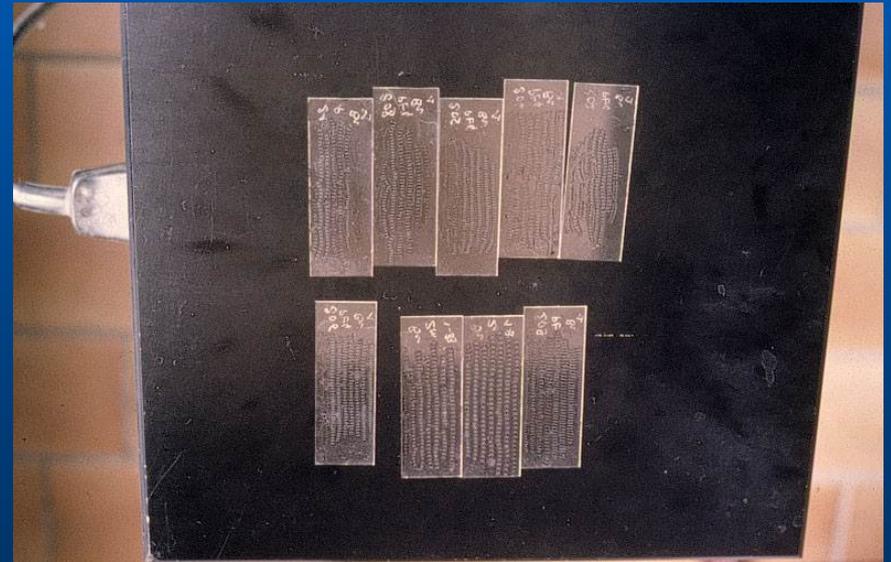
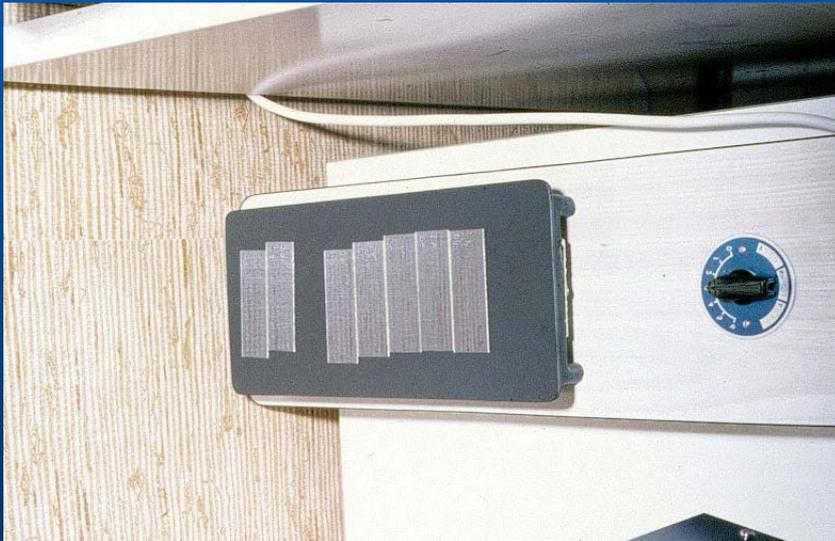
Assure la fixation permanente du colorant sur des groupements acides ou basiques des constituants cellulaires (à un pH donné)

Les colorations

- Les colorations de routine utilisent un (hématéine) ou deux colorants différents : l'Hématéine-Eosine (H.E.) associe:
 - - l'hématéine qui colore les noyaux en violet.
 - - l'éosine les cytoplasmes en rose.

Étalement et collage des coupes sur la lame

Les lames gravées et garnies de ruban de paraffine sont disposées sur une platine chauffante



Coloration



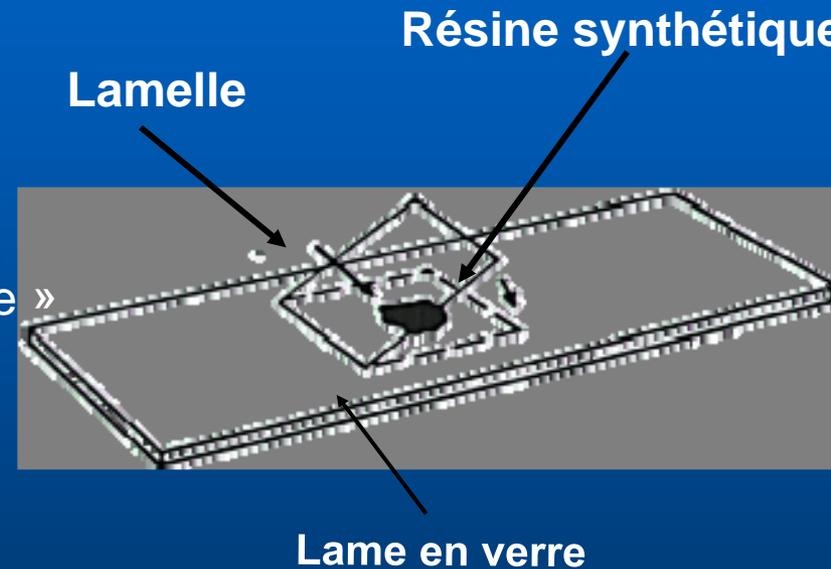
Cuve à coloration

Support de lames

7/ LE MONTAGE ET OBSERVATION

Le montage. les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre.

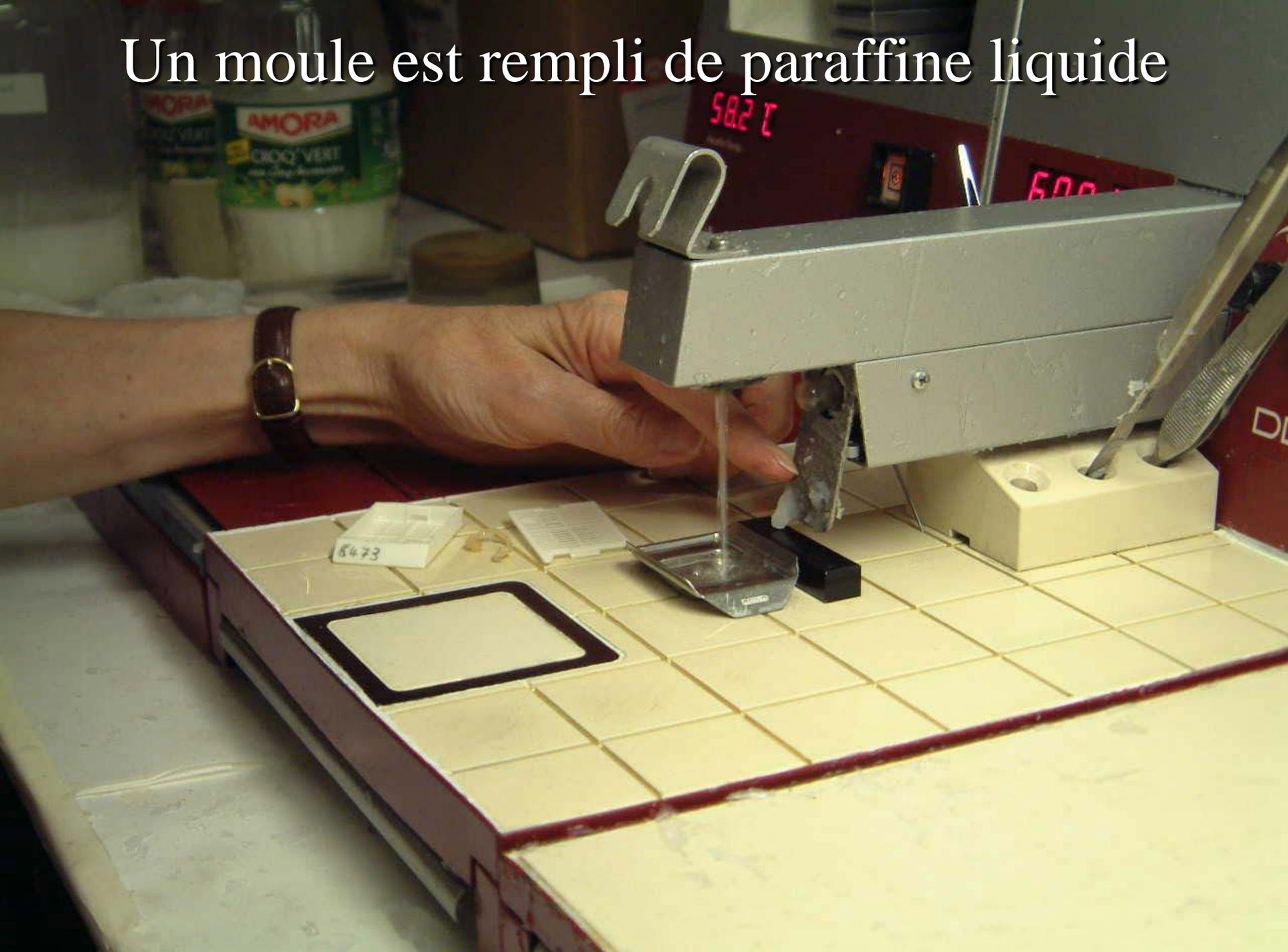
On dispose alors d'une « préparation microscopique » (appelée « lame ») prête à être observée au microscope optique (MO).



Confection du bloc : Enrobage



Un moule est rempli de paraffine liquide



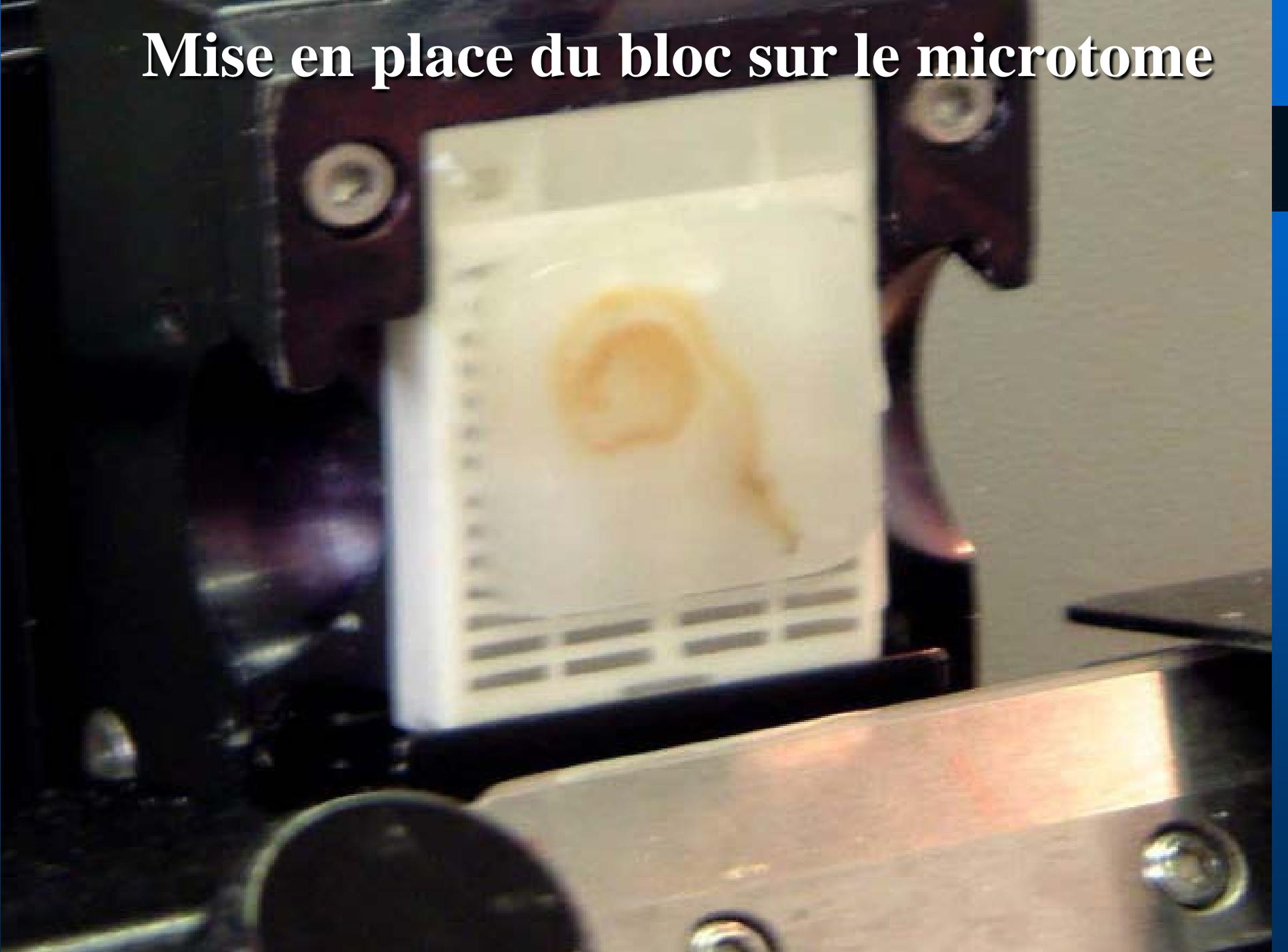
**Le prélèvement est mis en place et le bloc
mis à refroidir**



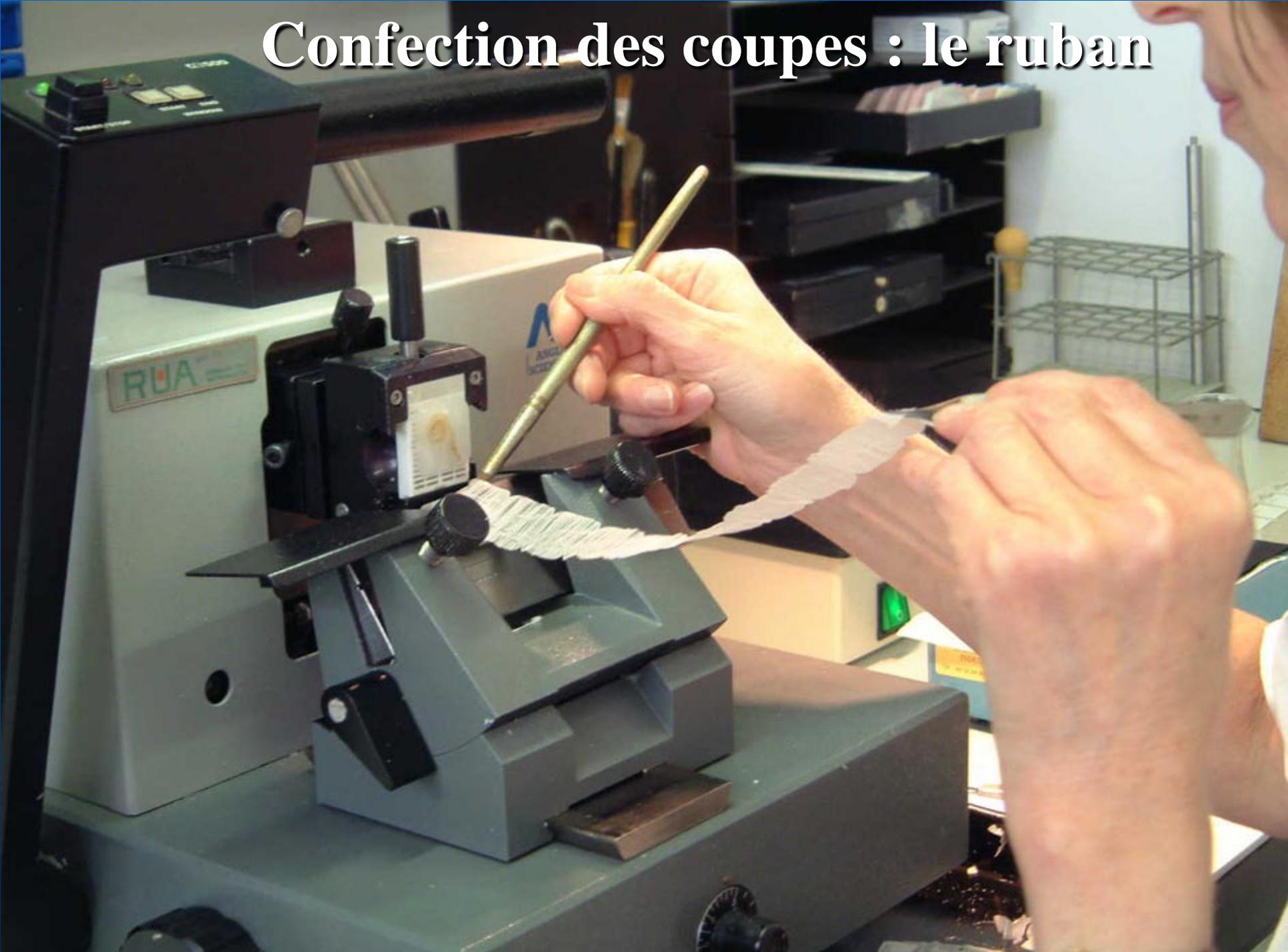
Démoulage, après refroidissement



Mise en place du bloc sur le microtome



Confection des coupes : le ruban



Etallement sur lame



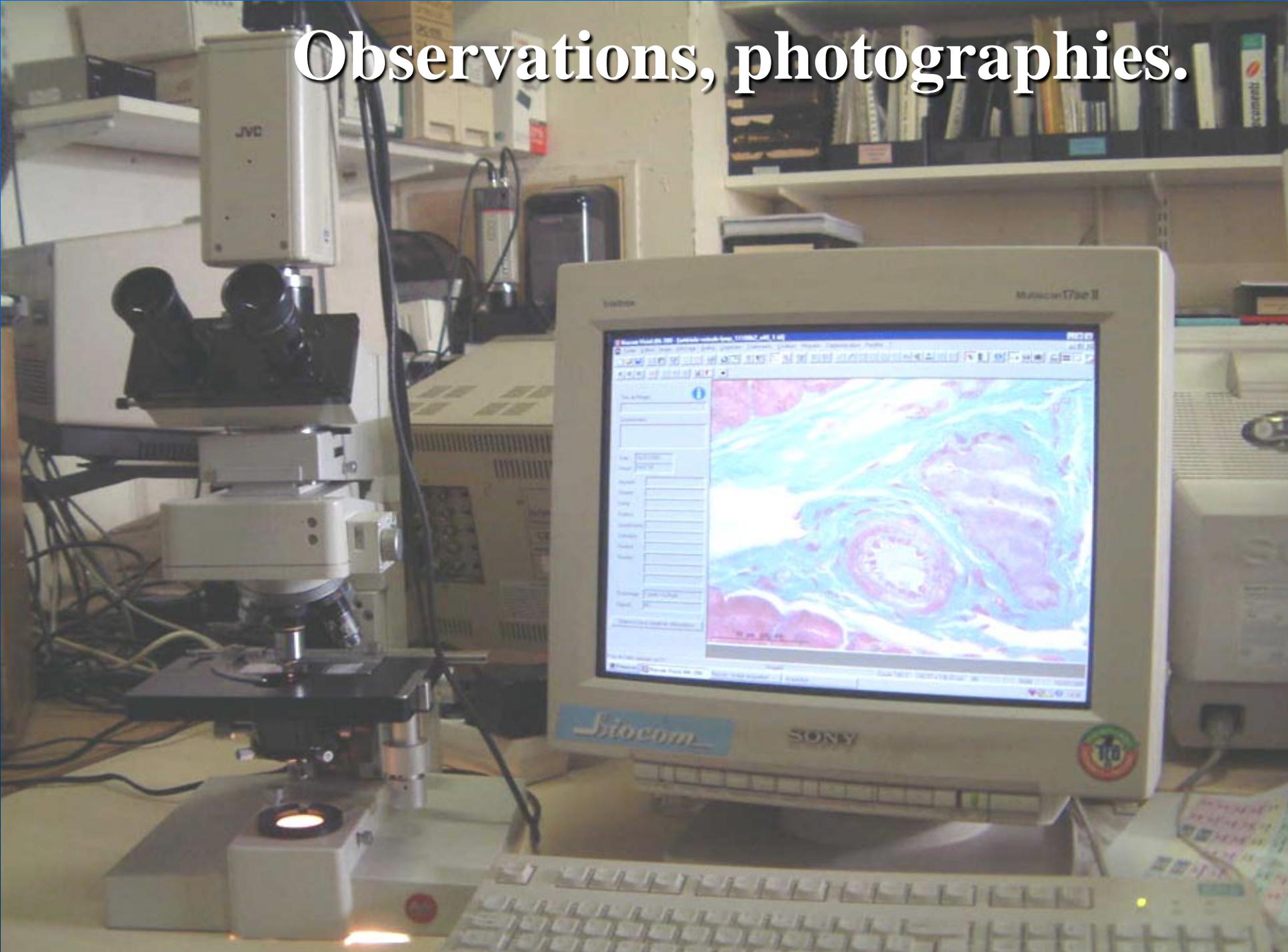
Séchage avant coloration



Les colorations



Observations, photographs.



Résultat surprise

Poumon de chien



Microscopie

- source lumineuses (lumière visible, ultra violette, rayons X ou faisceaux d'électrons)
- pouvoir séparateur (œil : 0,1 mm ; lumière visible : 0,2 μ m ; lumière ultra violette : 0,1 μ m ; électrons : 1 nm)

1/ Microscopie photonique :

- 3 systèmes de lentilles (condenseur , objectif, oculaire)
- grandissement maximum x 1500

2/ Microscopie à contraste de phase, polarisant, à fluorescence

3/ Microscope électronique

- Transmission
- Balayage

Microscopie électronique (ME)

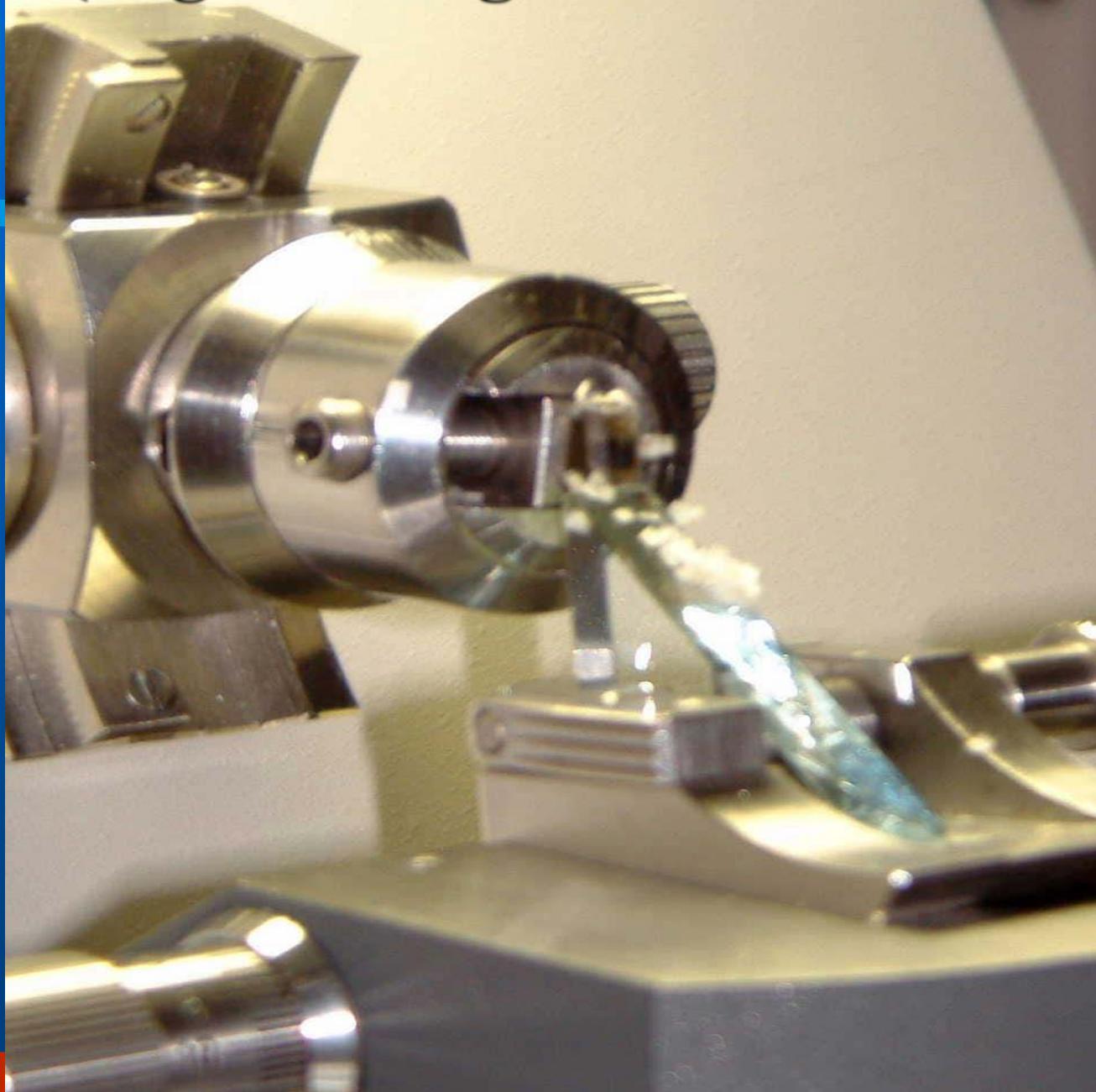
- 60 à 100 nm d'épaisseur,
- Quelques millimètres de largeur et longueur,
- coupe déposée sur une grille métallique,
- rares colorations possibles,
- grandissement de 1000 à 100.000 fois.

Les blocs pour ME

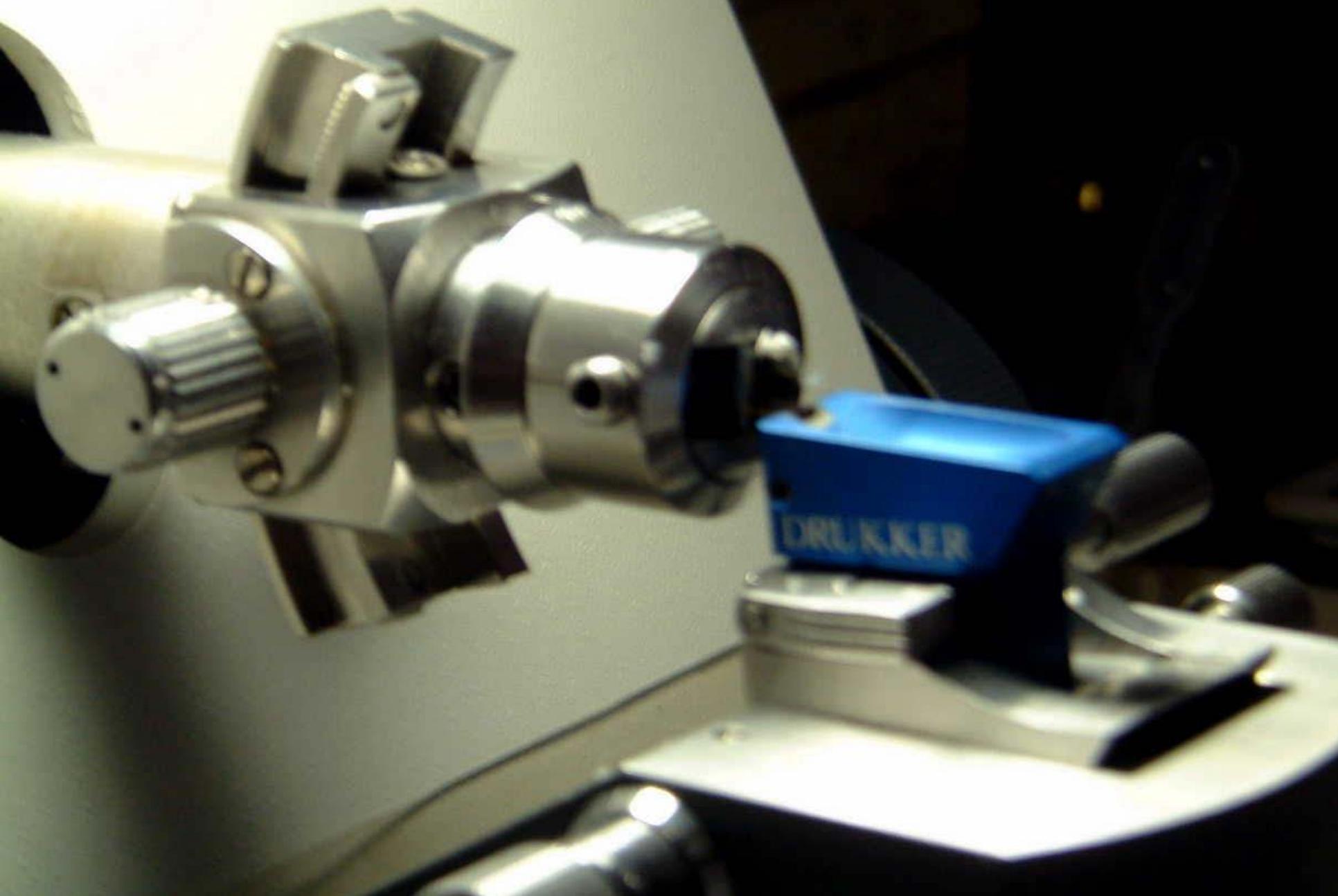


- environ 2 mm³ de tissu,
- fixation immédiate glutaraldéhyde / tétroxyde d'osmium,
- inclusion en résine,
- imprégnation par métaux lourds (Or ou Plomb).

Coupe (dégrossissage au couteau de verre)



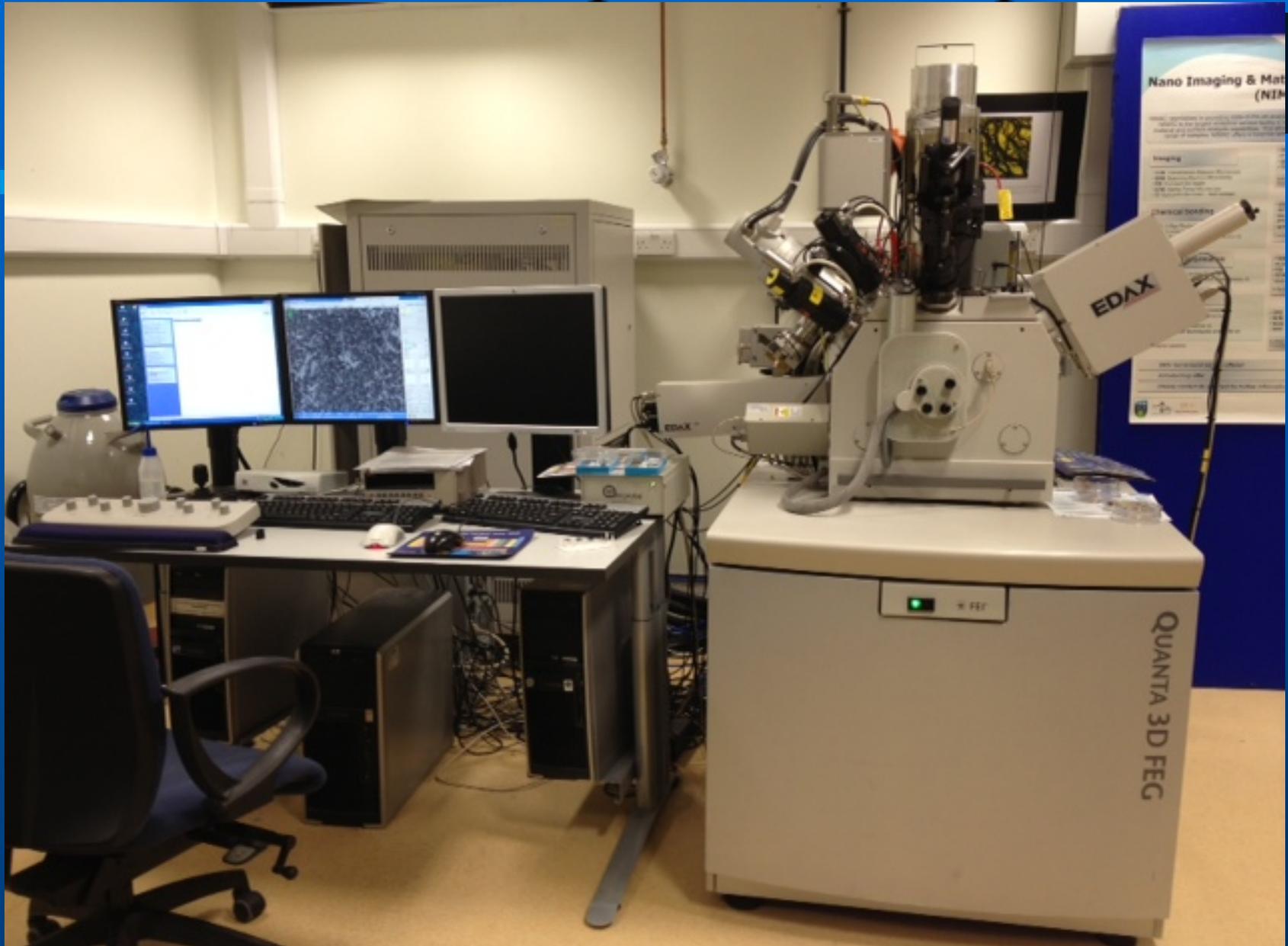
Coupe ultra-fine (couteau diamant)



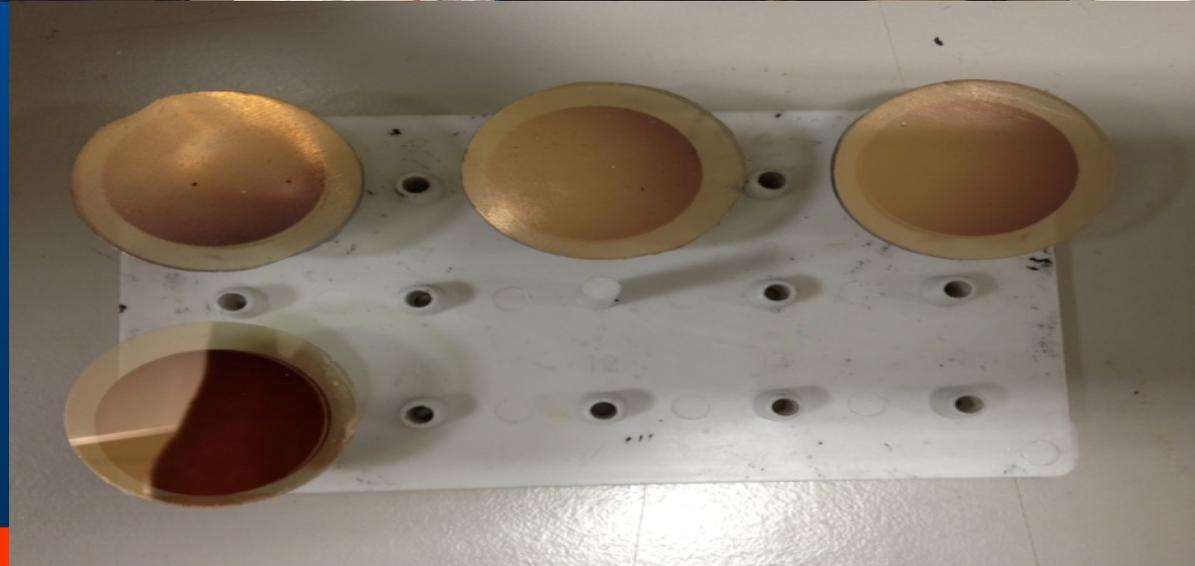
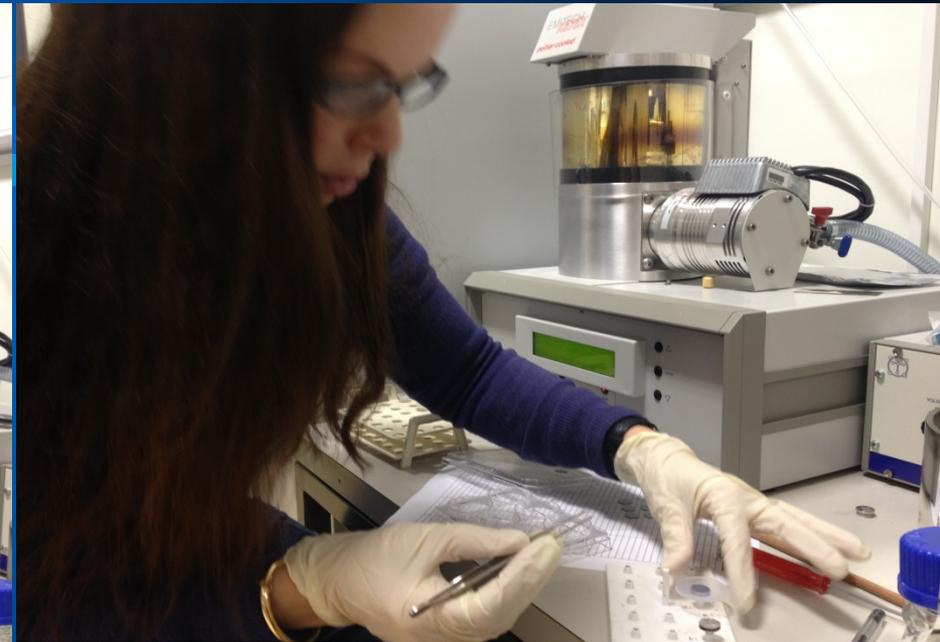
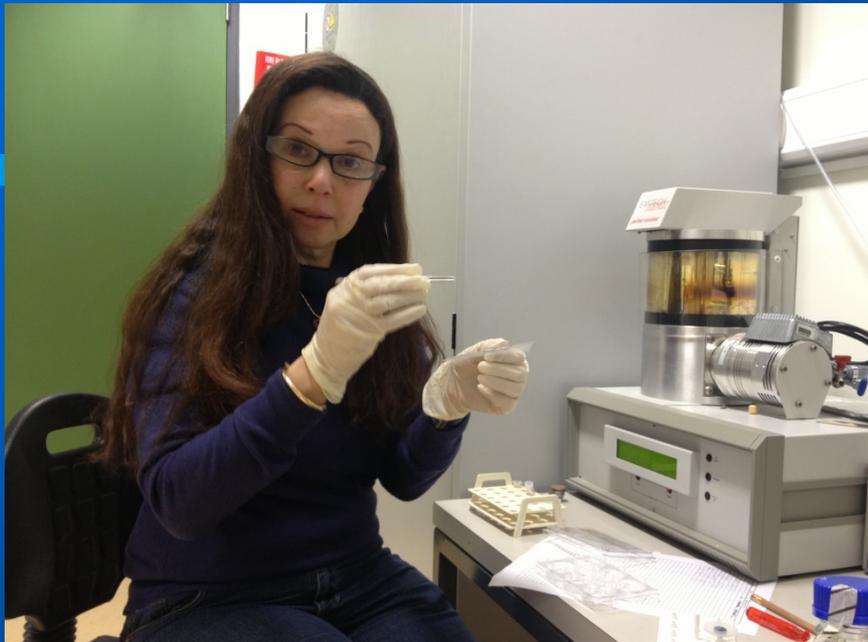
Les coupes sur grille métallique



Le microscope électronique



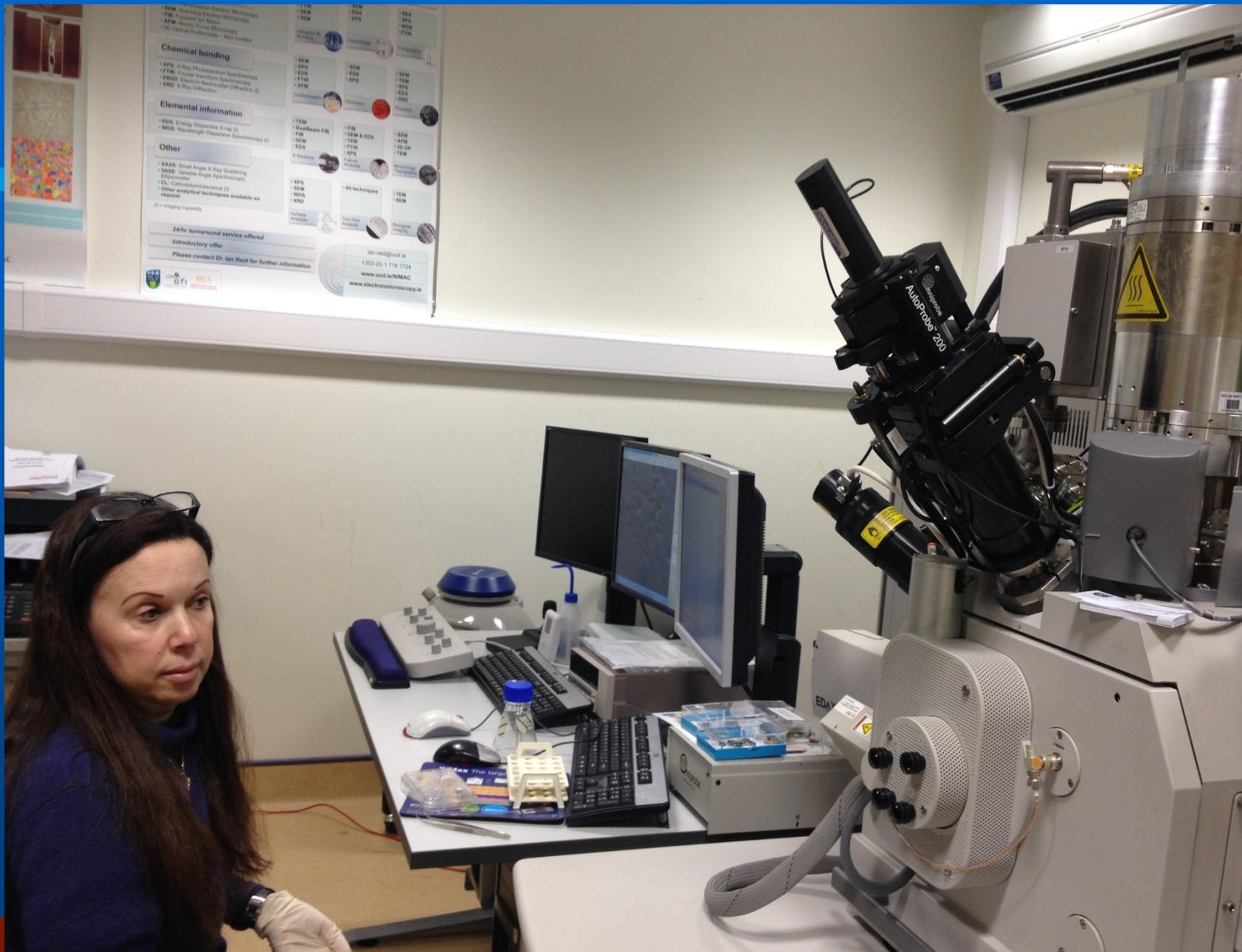
Mise en place de la grille (or)



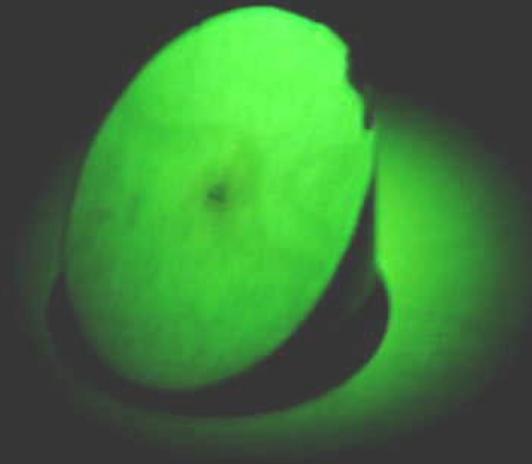
Mise en place de la grille



Observation

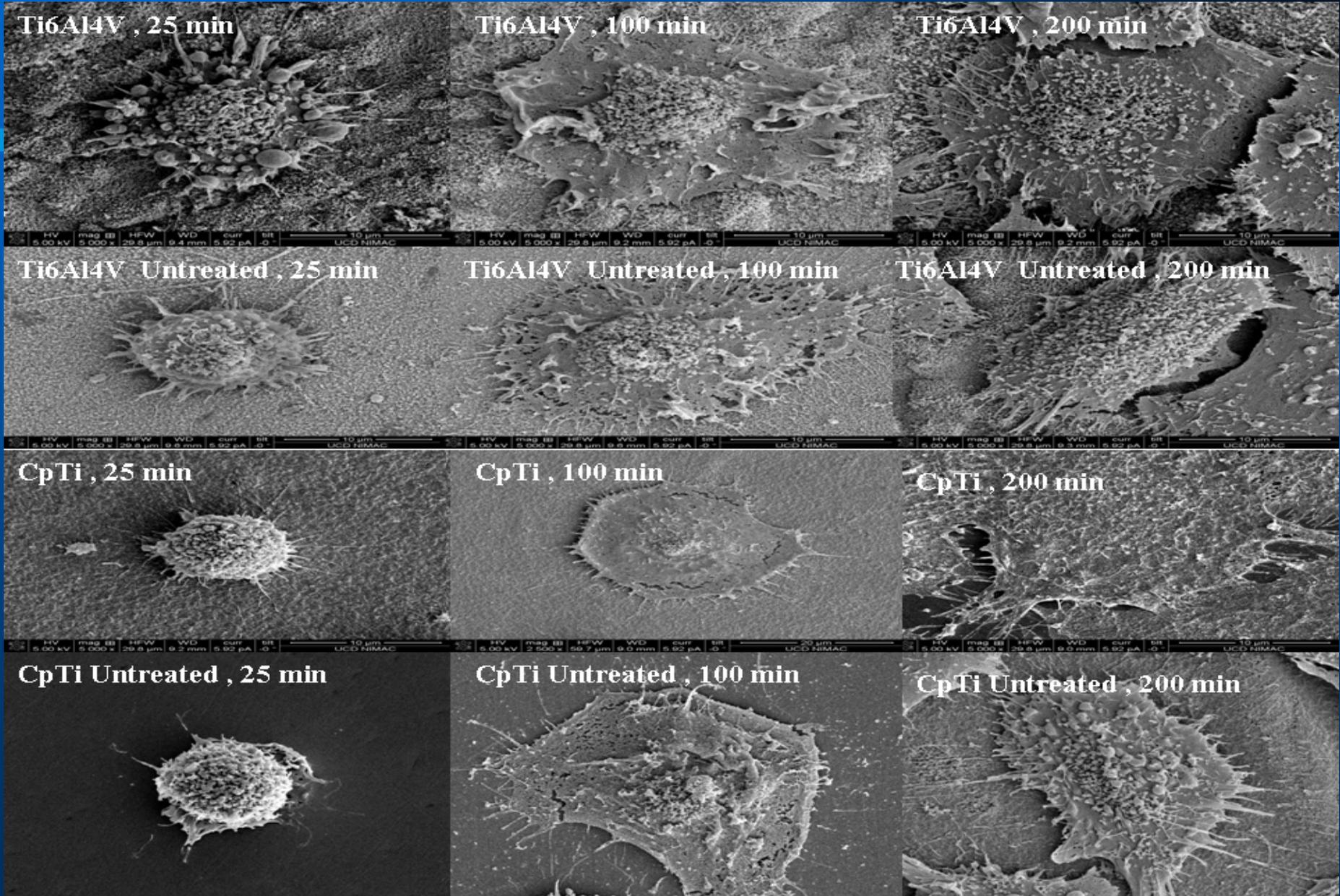


Mise au point, observation





Images des cellules osteoblastes avec ME



Images avec MO

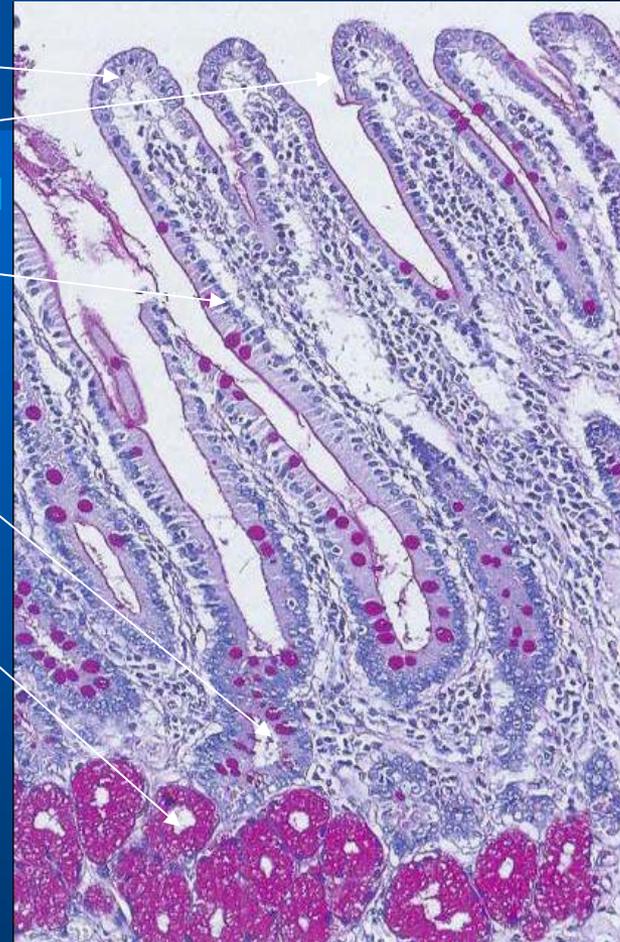
EPITHÉLIUM CYLINDRIQUE

VILLOSITÉ

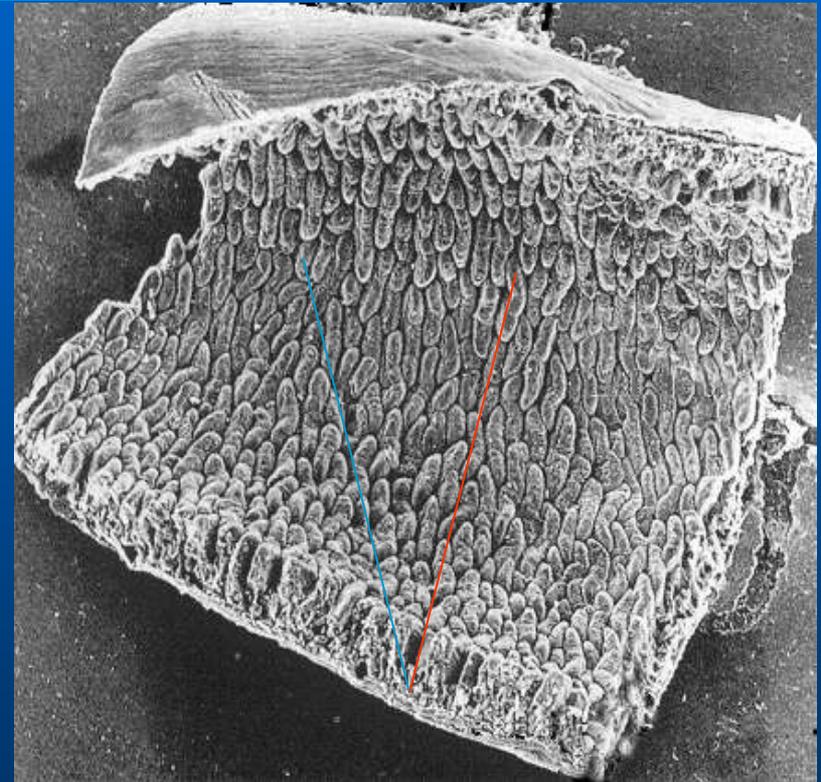
CELLULES CALICIFORMES

CRYPTE GLANDULAIRE

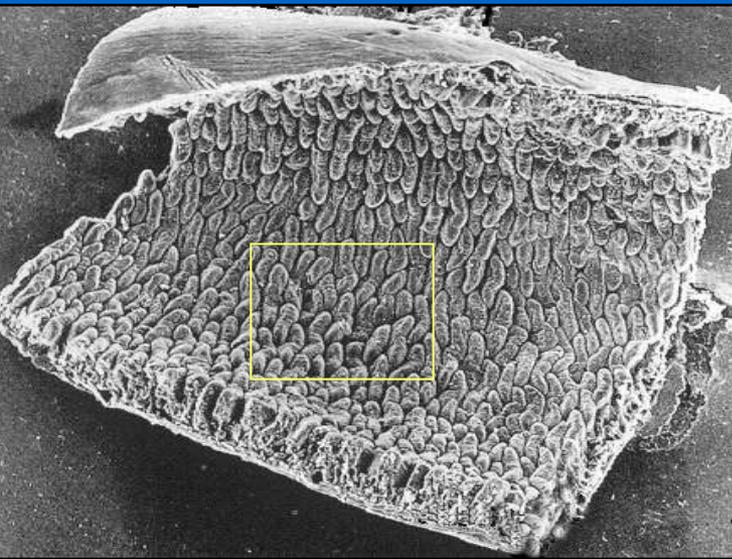
GLANDES DE BRUNNER



Aspect de la muqueuse intestinale en microscopie électronique à balayage



Multiples structures digitiformes se projetant dans la lumière, correspondant aux **villosités** intestinales

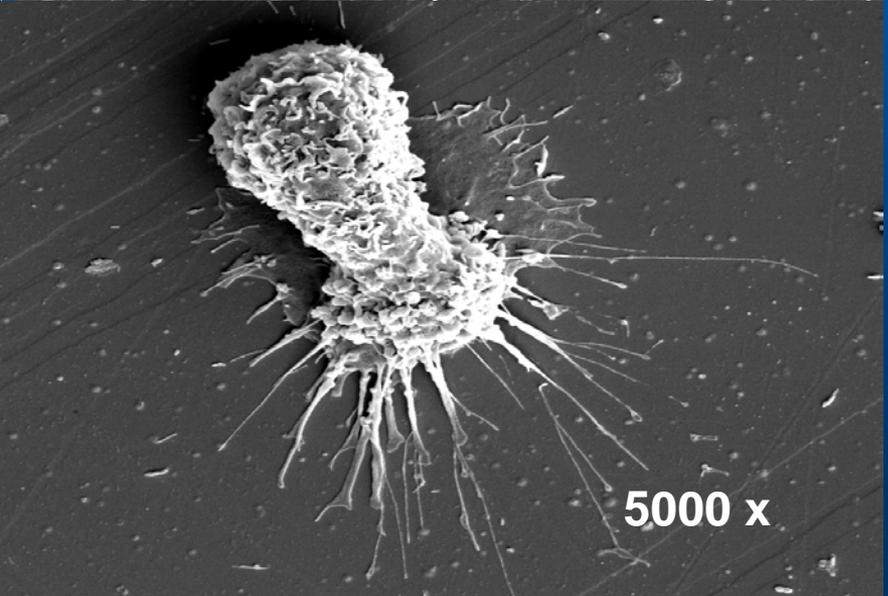
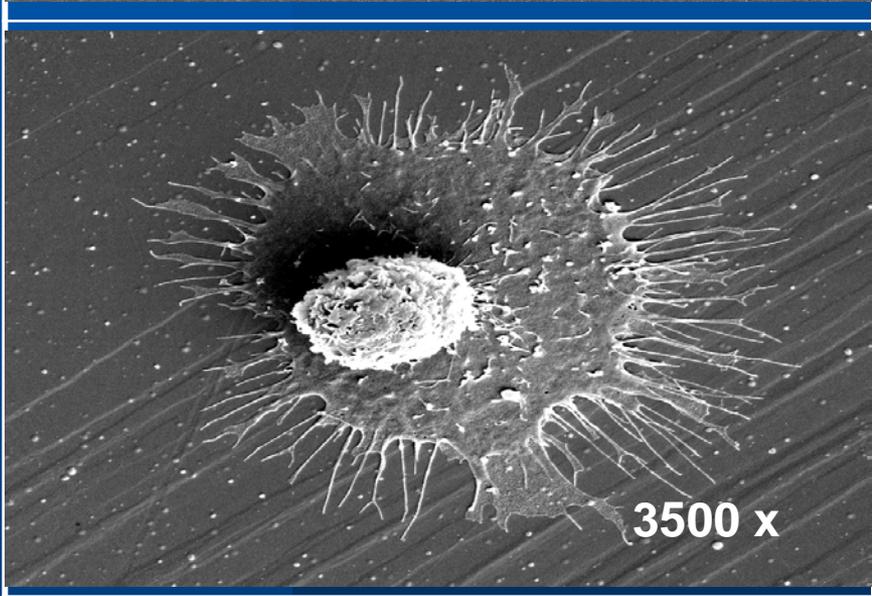
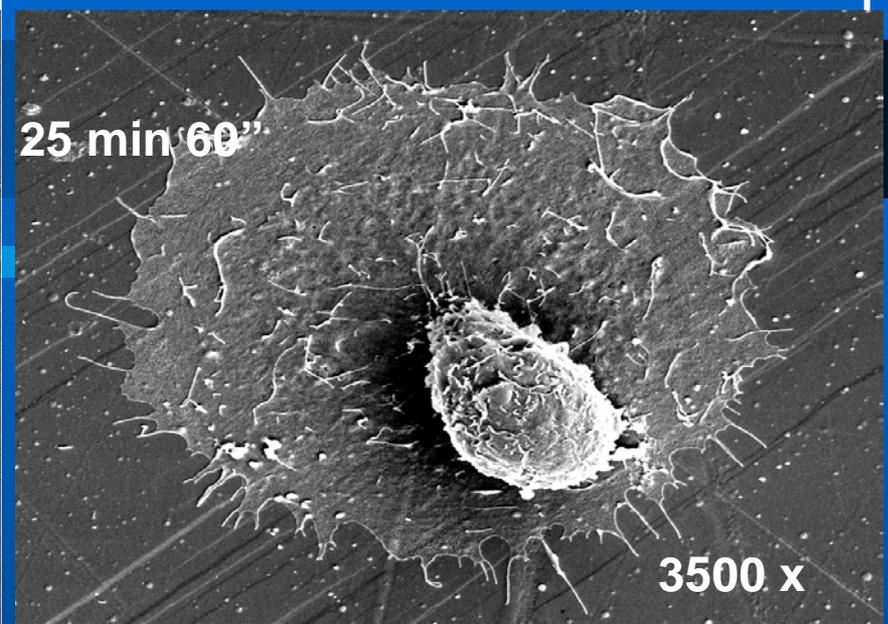
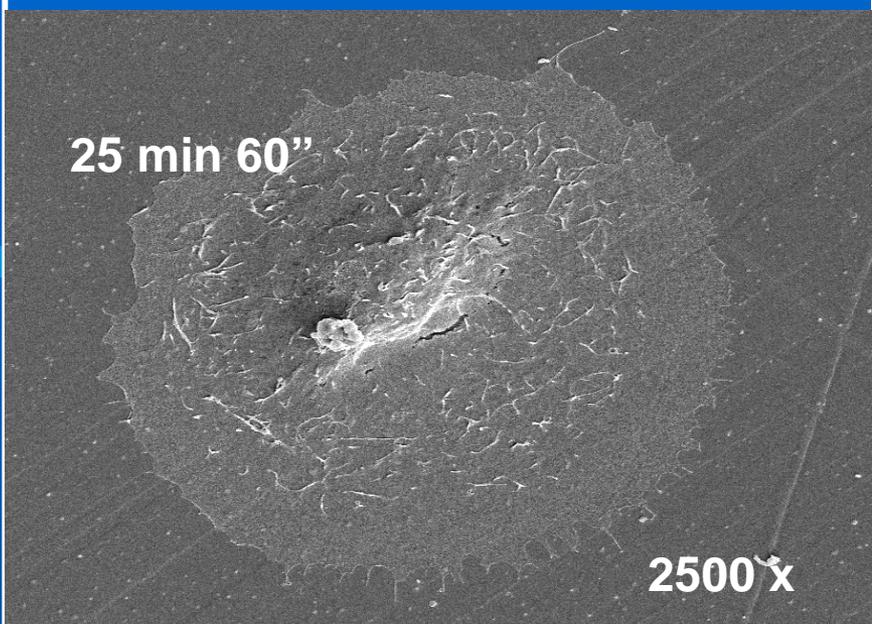


L'observation à un plus fort grossissement en microscopie électronique à balayage permet d'apprécier l'aspect des villosités.

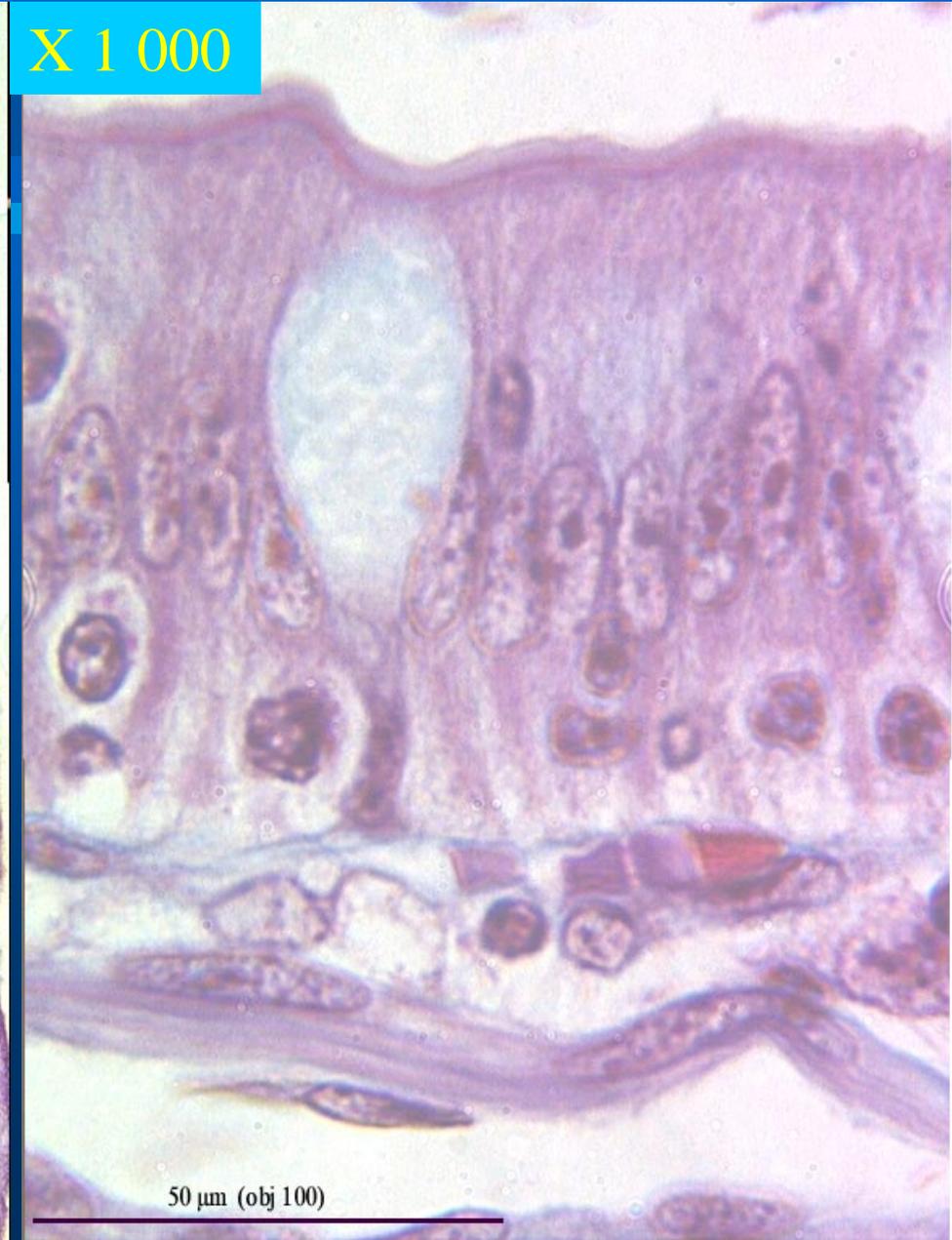
Dans certaines maladies qui touchent l'intestin grêle (malabsorption), les villosités disparaissent totalement.

La muqueuse perd son relief et devient plate (atrophie).

Attachement des cellules de l'os (osteoblaste) sur un implant

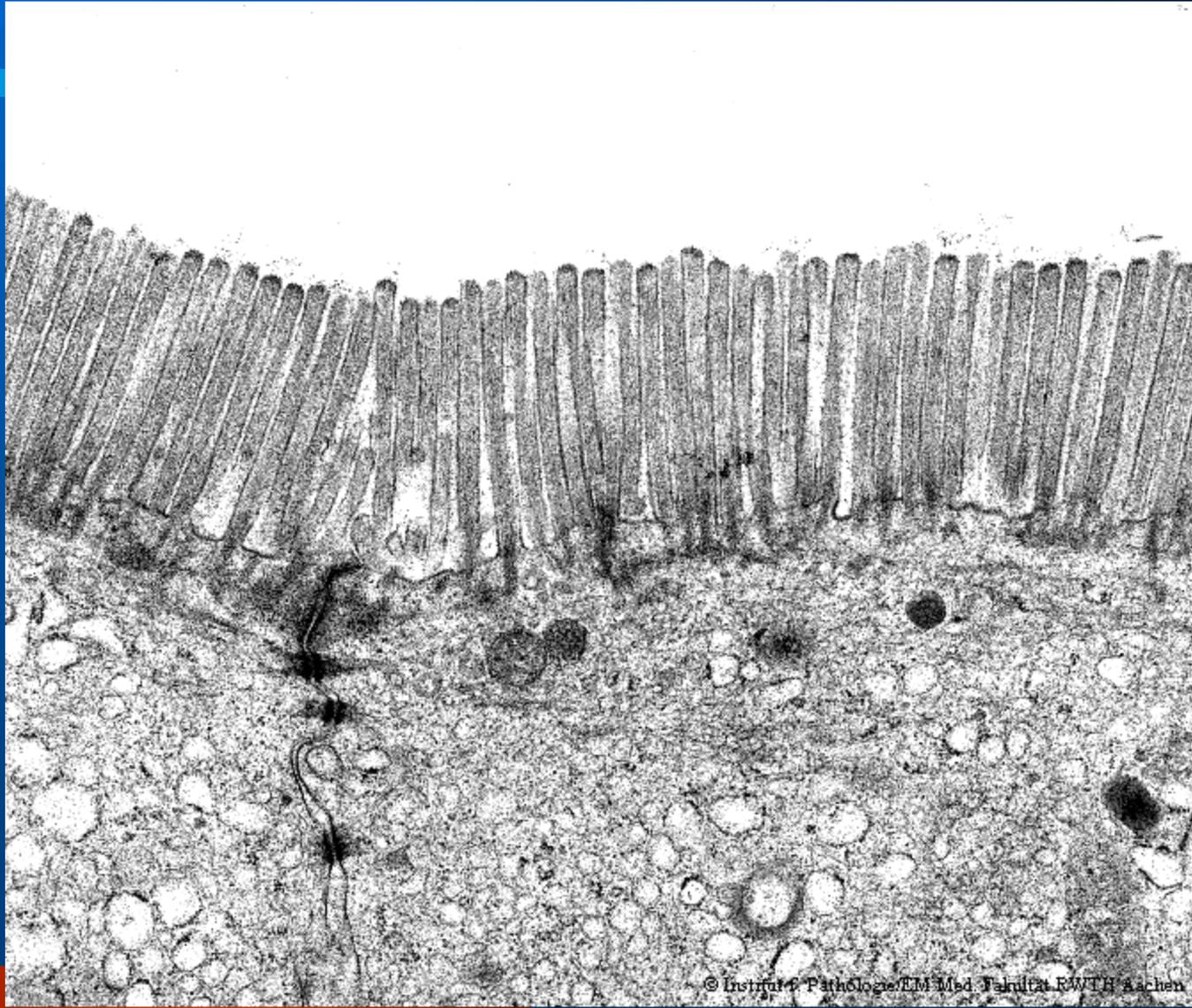


En microscopie optique, les plus forts grossissements sont :



**En microscopie électronique, le plus fort grossissement est
x 100 000.**

Les plus couramment utilisés sont entre x 3 500 et x 50 000



X 40 000