



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

Histologie-Embryologie

Pr. M. Naciri

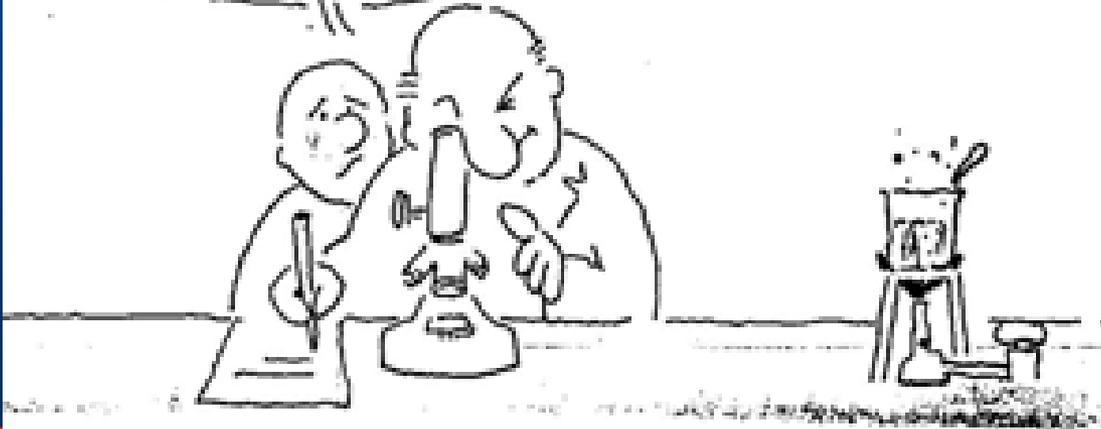
"David, did you see that?"

"See what?"

"THAT!"

"Where?"

"Too late... it's gone"



# Principes généraux

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

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

# Echantillonnage du 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.**

# TECHNIQUE HISTOLOGIQUE EN MICROSCOPIE OPTIQUE



## *Biopsie cutanée*

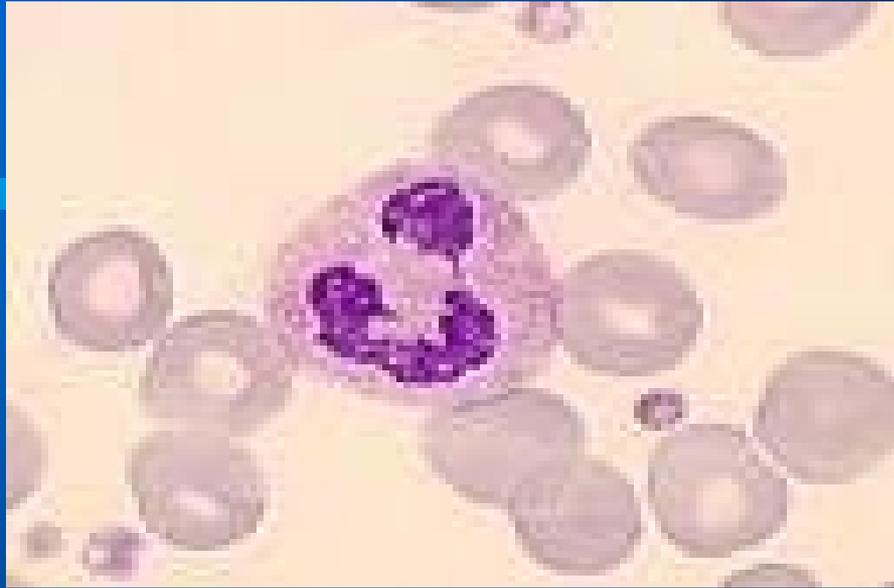
Le matériel histologique peut être prélevé par **biopsie** ou provenir d'une **pièce opératoire** ou d'une **autopsie**

# 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 :
  - le dépistage de cancers
  - d'infections

# FROTTIS



Des **cellules entières fixées** et colorées peuvent être examinées sur des frottis (étalement de cellules sur une lame de verre) pour:

- l'étude des cellules sanguines (= frotti sanguin; *photo*)
- le dépistage des cancers du col de l'utérus (= frottis cervico-vaginal)

# Préparations biologiques

**Les cellules ou tissus peuvent être préparés sous forme:**

- frottis,**
- d'observations vitale**
- empreinte**
- de coupe biologique**

# Observation vitale

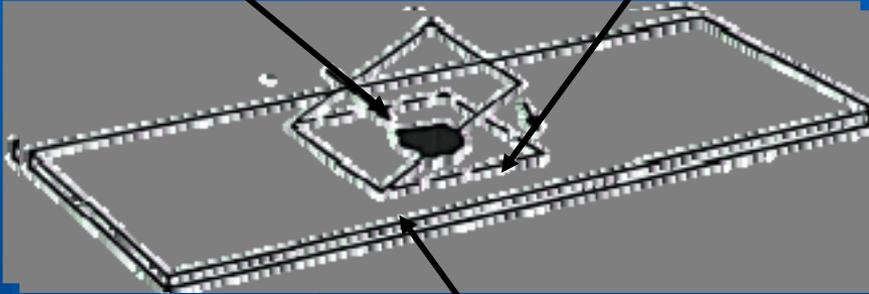
---

**Des cellules vivantes sont montées entre lame et lamelle dans un liquide de composition identique ou proche de celui dans lesquels elles vivent habituellement.**

# 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).

# La microdissection permet d'intervenir sur un seul type cellulaire.

- L'utilisation de systèmes de **microdissection** utilisant un faisceau laser permet de recueillir des cellules dont :

- - les protéines,
- - les ARN
- - l'ADN sont intacts

Susceptibles d'être analysés à l'échelle d'une population cellulaire pure

(par exemple constitution de banque d'ADN complémentaires, étude de l'expression des gènes).

# 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: **Figèr** les tissus dans l'état le plus proche de leur état initial

Moyens: -Citez des fixateurs

-Le liquide de BOUIN



# 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.



# Fixation

Elle doit :

- 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 !

- le formol seul (formaldéhyde dilué) dans l'eau courante, ou tamponné

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

MAIS

- allergisant,
- carcinogène.

- 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.**



# Déshydratation

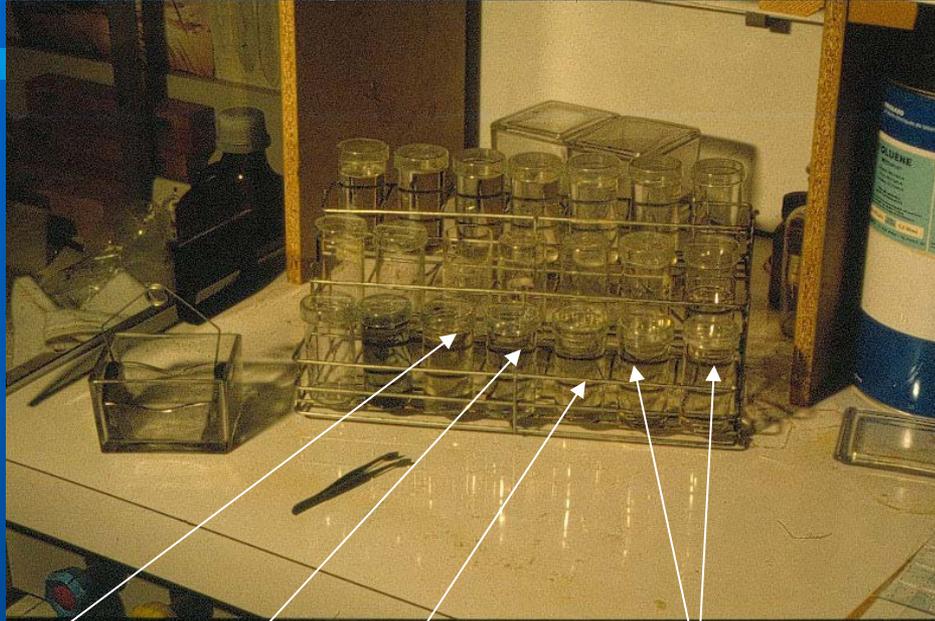
L'eau tissulaire est remplacée par de la paraffine.

On procède donc par étapes en remplaçant :

- l'eau par un alcool,
- l'alcool par un solvant organique (Toluène),
- le solvant par la paraffine

# Déshydratation

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



70°

95°

Alcool

100°

Toluène

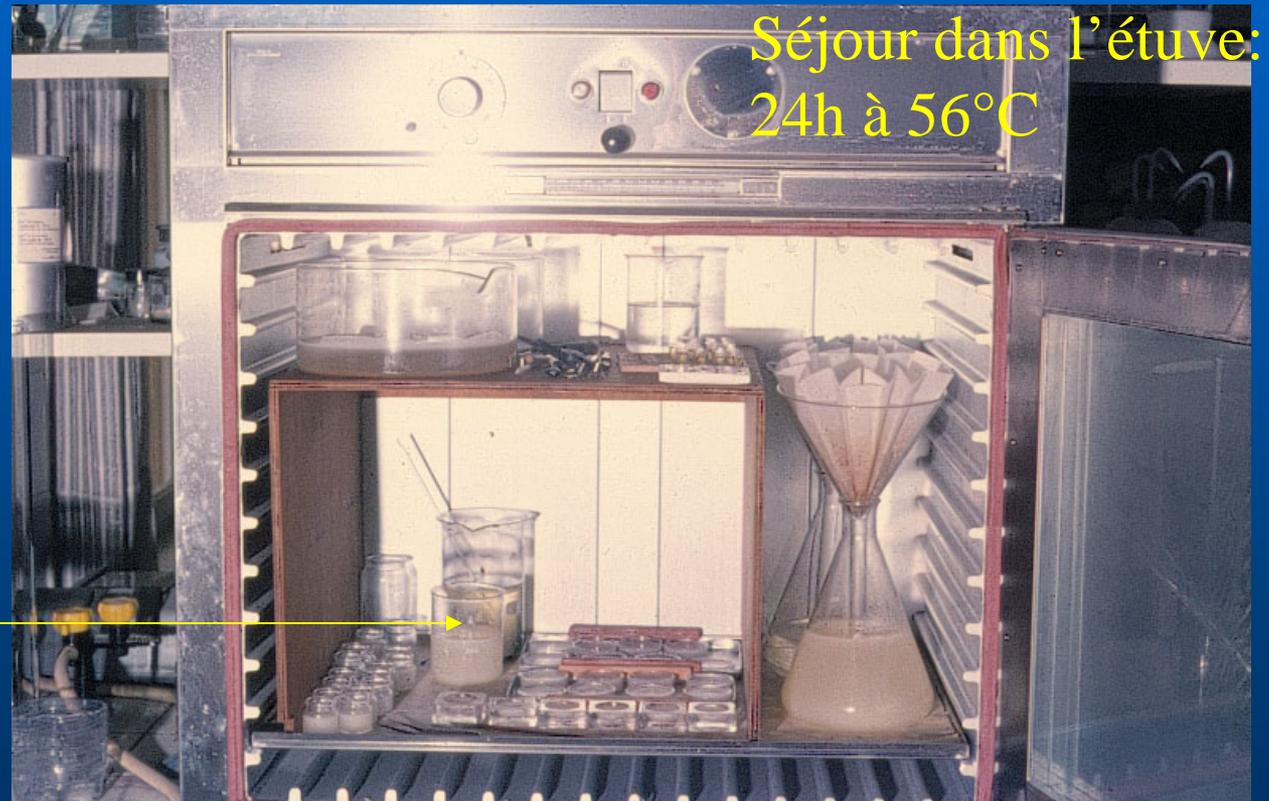
Bains successifs dans des borels

# INCLUSION

- Permettre la réalisation de coupes fines et régulières.
- Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine (hydrophobe), le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation.

# INCLUSION

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



La paraffine est liquide à 56°. En dessous de cette température, elle se solidifie. L'imprégnation par la paraffine dépend de l'échantillon.

# INCLUSION

- L'**inclusion** a pour but la réalisation de **coupes histologiques**.
- Le **milieu d'inclusion** le plus utilisé est la **paraffine**.

Après refroidissement, on obtient d'un **bloc de paraffine**, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.



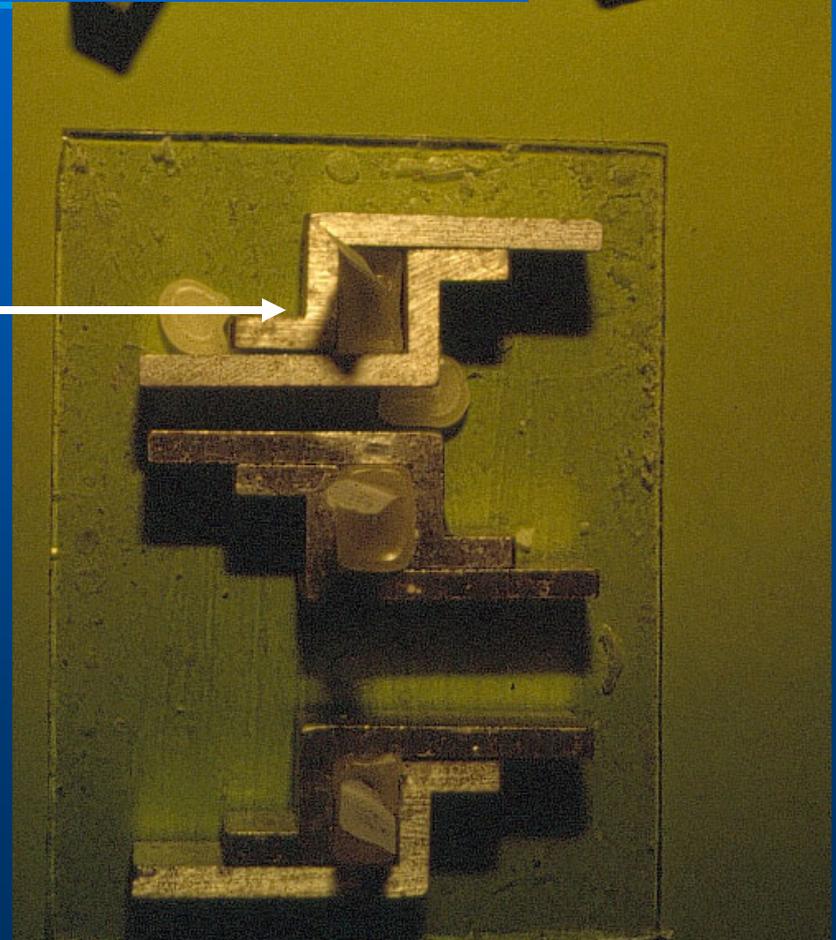
# INCLUSION

- **La Prélèvement subit une immersion :**
  - Dans des bains d'alcool), puis
  - dans des bains de toluène (un solvant de la paraffine),
  - infiltré par la paraffine fondue par chauffage avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue.
- Après refroidissement, on obtient d'un **bloc de paraffine**, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

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

A température ambiante, la paraffine se solidifie

moule



# LES COUPES

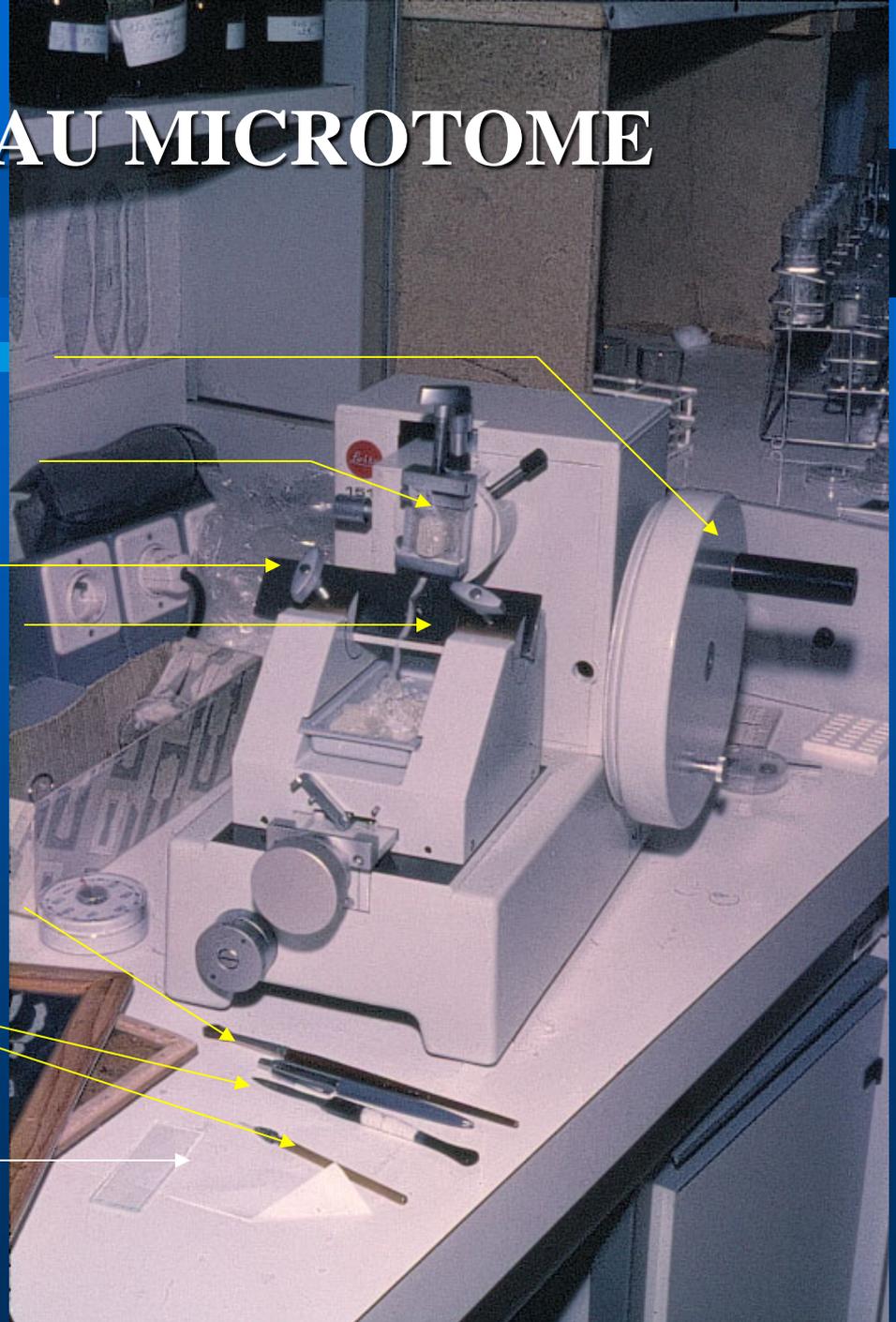
Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées avec un **microtome** permettant d'obtenir des tranches de section (**coupes histologiques**) de **2 à 5 microns d'épaisseur**.

Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.



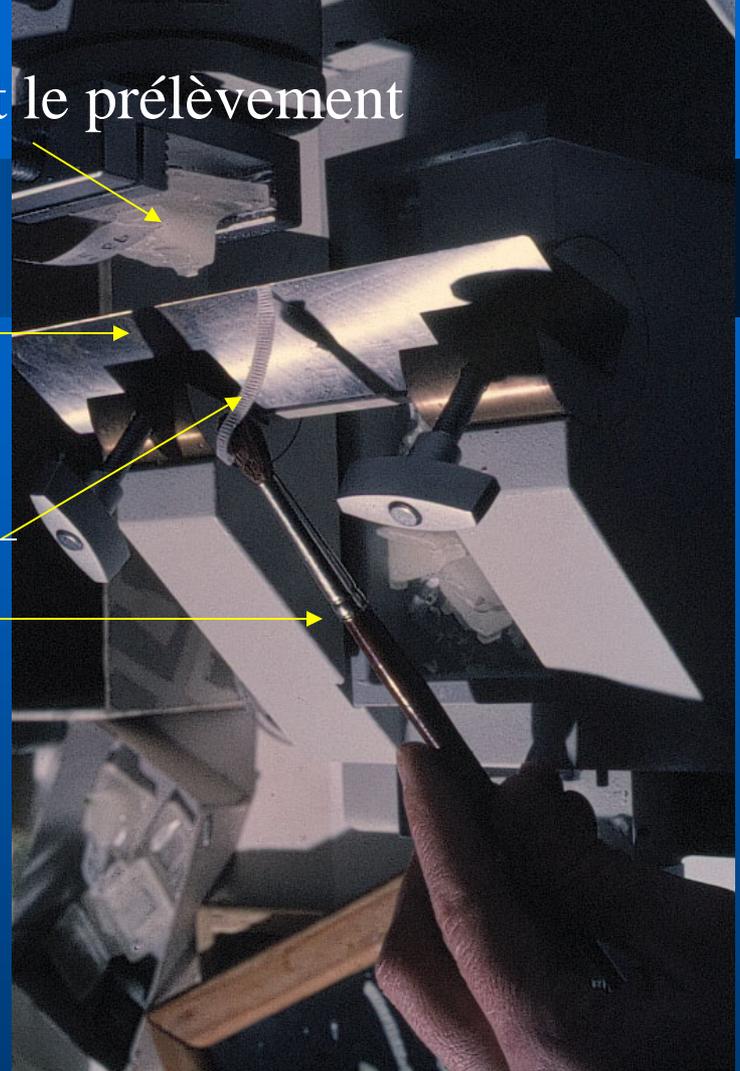
# LES COUPES AU MICROTOME

- 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  $\mu\text{m}$ ) car les préparations sont traversées par les photons.

# 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.

# 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.
- Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée.

# 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.

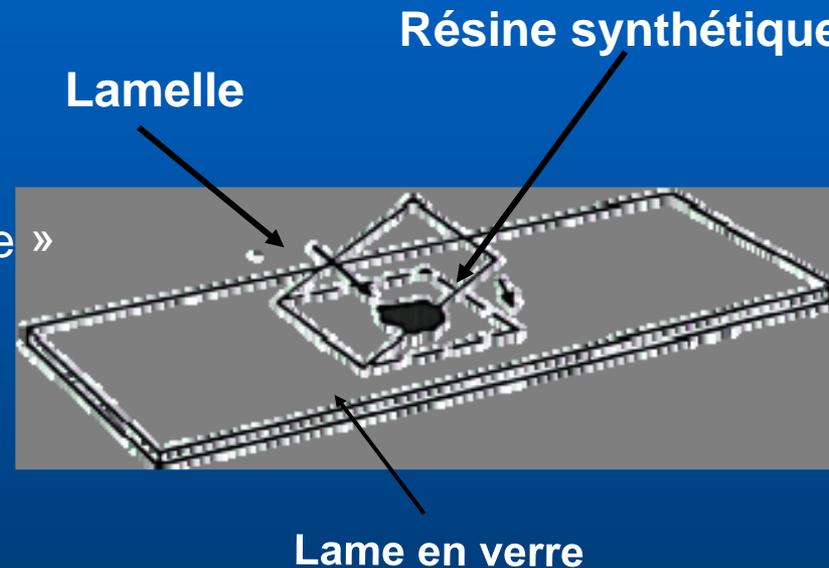
# Les colorations

- De nombreuses colorations spéciales (dites signalétiques) permettent de visualiser différentes structures ou composants des tissus:
  - les fibres de réticuline par des colorations argentiques
  - **les fibres élastiques** par l'orcéine.

# LE MONTAGE

**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).



# Microscopie

- **Généralités :**

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

- **Microscopie photonique :**

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

- **Microscopie à contraste de phase, polarisant, à fluorescence**

- **Microscope électronique**

- à transmission
- à balayage

# Modèle récent de microscope

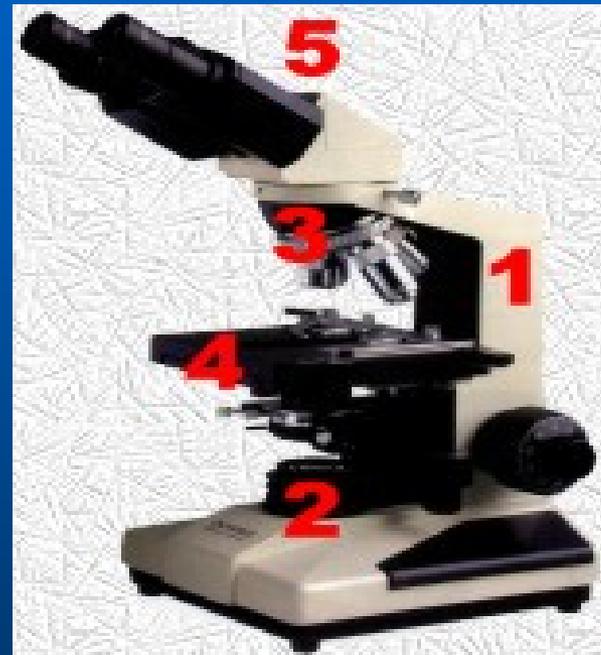
1 - Le statif est le corps de l'appareil qui supporte les divers mécanismes et tubes optiques

2 - L'éclairage est situé à la base de l'appareil. Pour les modèles d'initiation il s'agit d'un miroir réfléchissant la lumière vers le système optique. Les modèles plus évolués sont quant à eux équipés de lampes au tungstène ou halogènes montées sur un dispositif de variation de l'intensité lumineuse.

3 - La tourelle est un disque mécanique qui comporte plusieurs objectifs de différents grossissements.

4 - La platine est le support sur lequel sont posées les lames de préparations. Elle est équipée de pincettes valets dans les modèles de base, ou d'une surplatine à mouvement orthogonal contrôlé par vernier.

5 - La tête d'observation est monoculaire sur les systèmes de base, binoculaire permettant l'observation avec les deux yeux, ou trinoculaire permettant d'installer un dispositif de prises de vues (appareil photo ou caméra numérique).



# Microscope électronique

## Le Microscope électronique à Transmission

La microscopie électronique en transmission<sup>[1]</sup> (MET ou TEM en anglais pour *Transmission Electron Microscopy*) est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre.

C'est la technique de microscopie la plus performante.

Dans son principe, elle ressemble à la microscopie optique en lumière directe.

Le faisceau d'électron est émis par un canon à électron, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse.

Les électrons sont plus ou moins absorbés et l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent.

Le grossissement est beaucoup plus fort qu'en microscopie optique.

# Microscope électronique

## Le Microscope électronique à Balayage

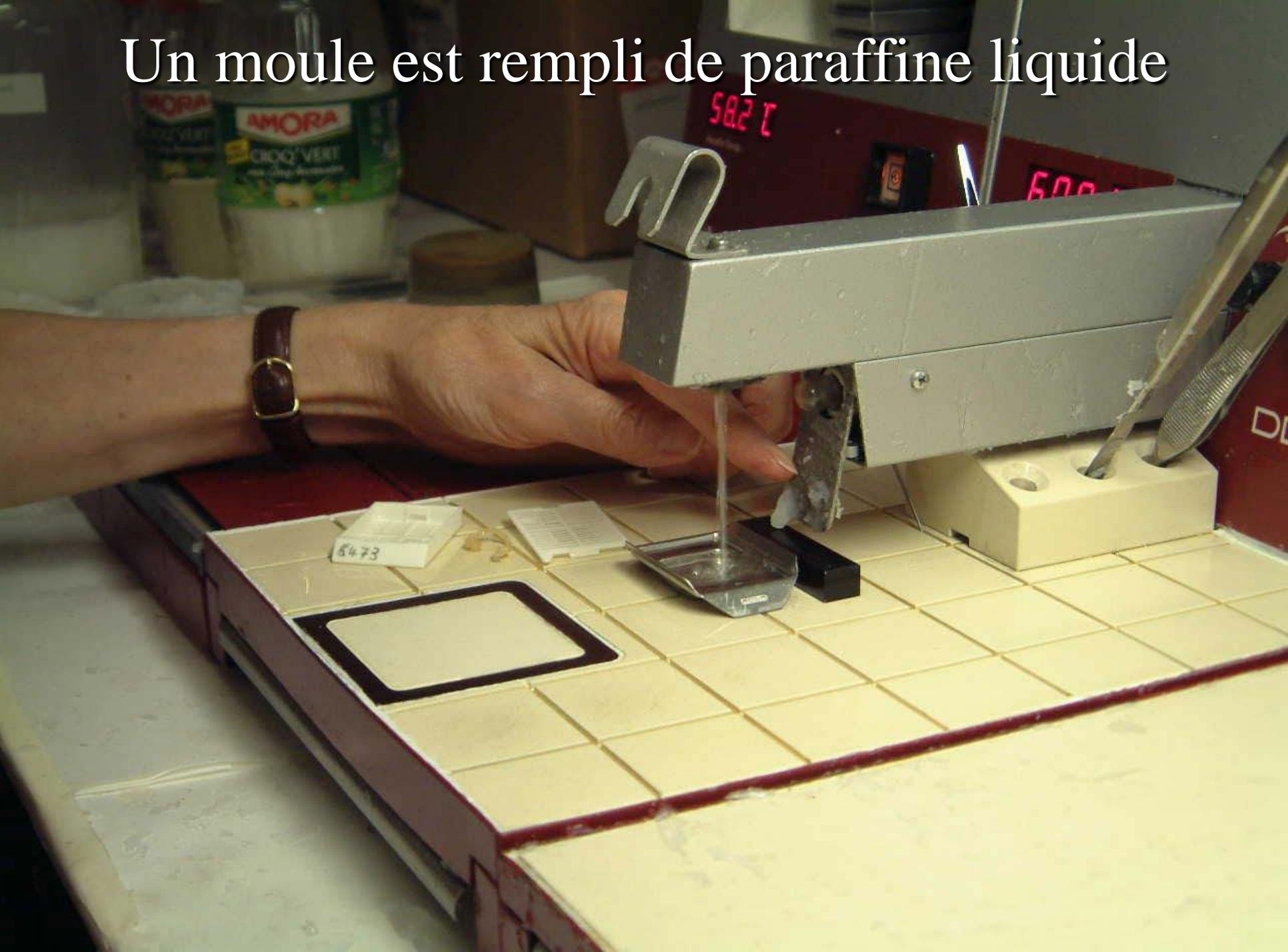
La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy* en anglais) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière,

La résolution est plus faible que le microscope électronique à transmission, cette technique donne des images absolument spectaculaires, en 3D.

Lorsque le faisceau d'électron bombarde la préparation, une partie des électrons la traverse, le reste est ré-émis.

Ce sont eux qui serviront à construire l'image. Le résultat est une représentation de la surface de l'objet observée.

Un moule est rempli de paraffine liquide



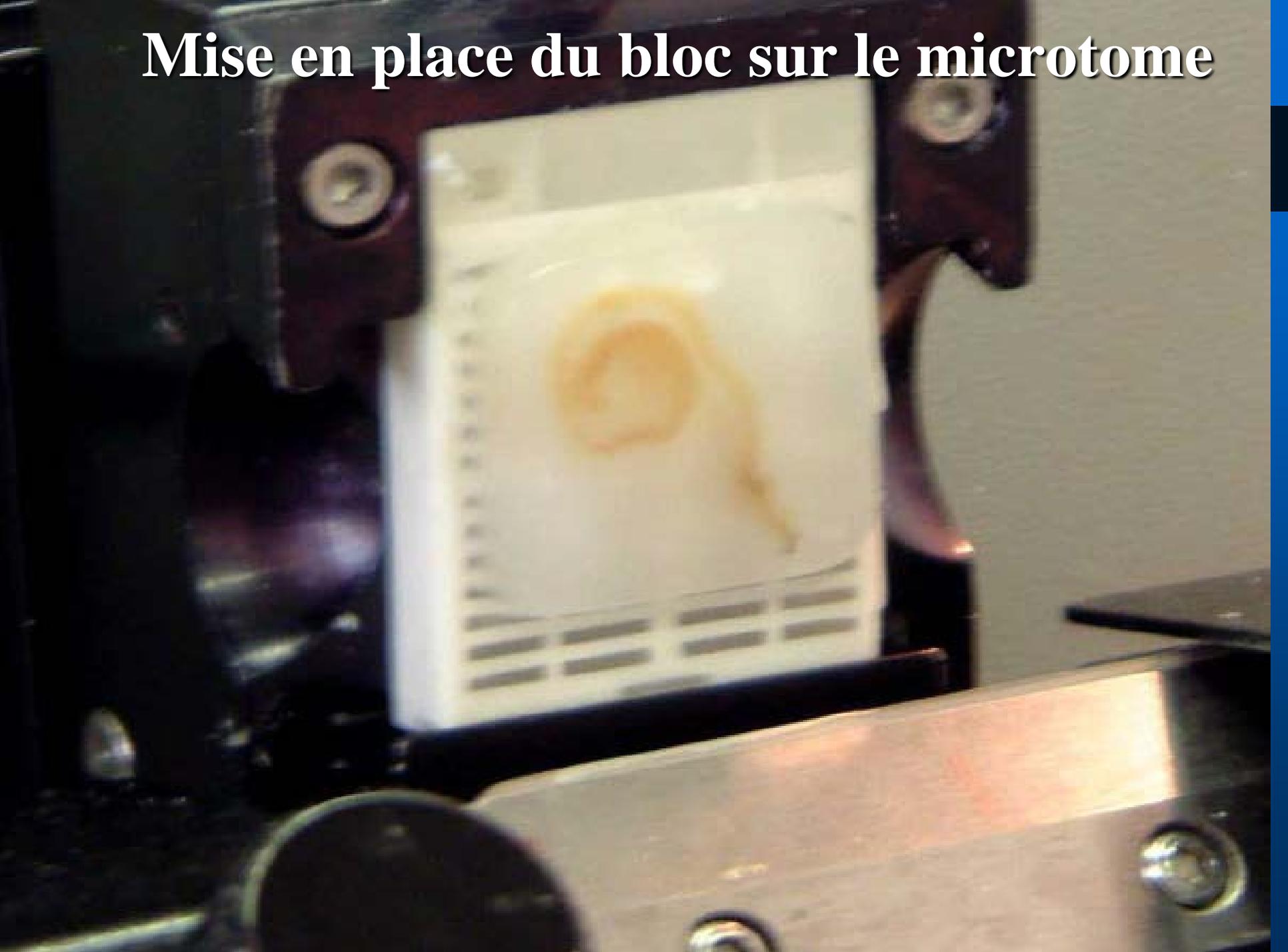
**Le prélèvement est mis en place et le bloc  
mis à refroidir**



**Démoulage, après refroidissement**



# Mise en place du bloc sur le microtome



# Les coupes histologiques

- 2 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur,
- quelques centimètres de largeur et longueur,
- nombreuses colorations possibles,
- montées entre lame et lamelle,
- grandissement de 10 à 1000 fois (environ).

# Confection des coupes : le ruban



# Etalement sur lame



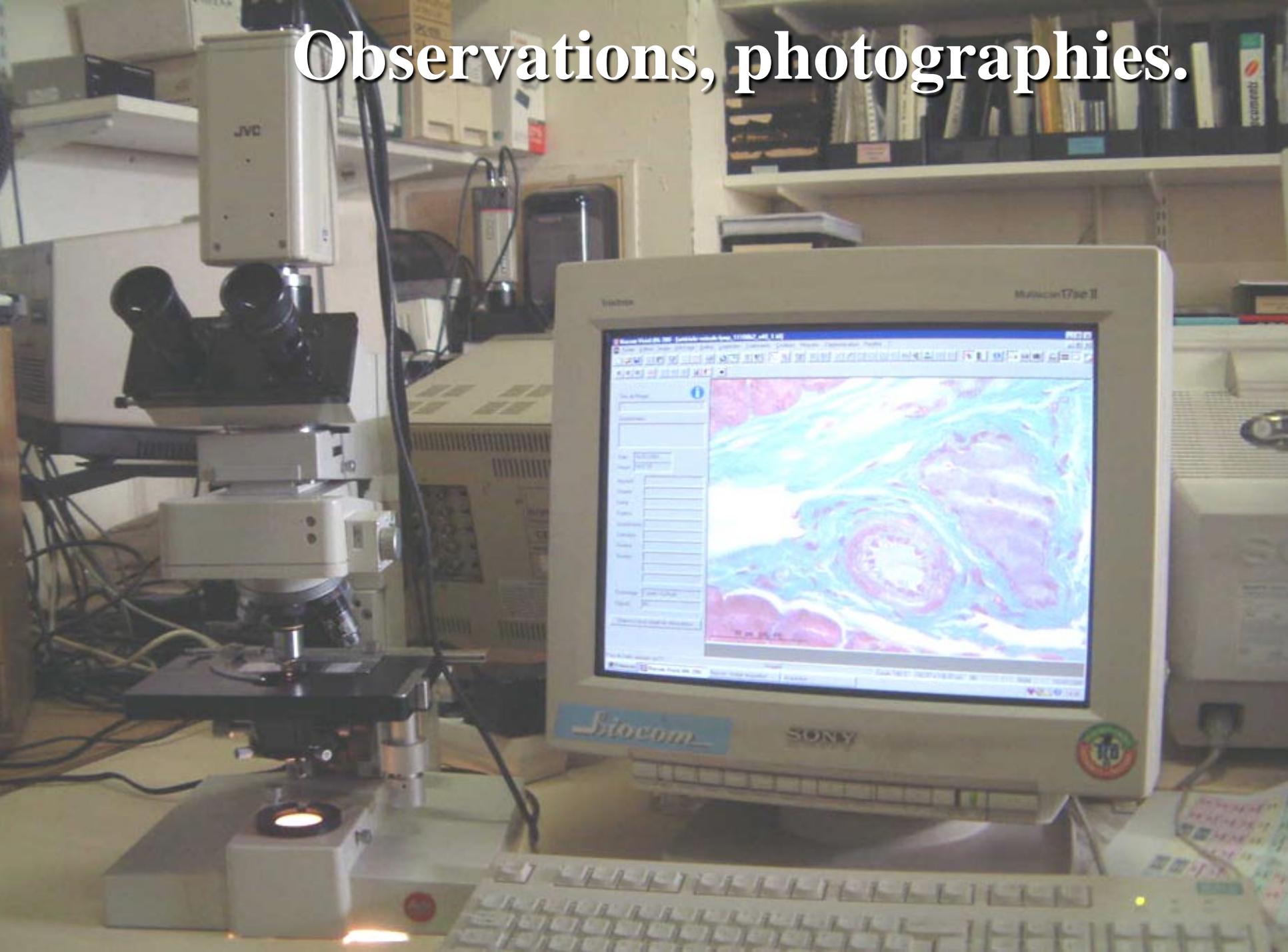
# Séchage avant coloration



**Les colorations sont infinies.**  
**Ne vous fiez pas à la couleur**  
**pour « reconnaître » une structure !**



# Observations, photographs.



# Résultat surprise

*Poumon de chien*



# Microscopie électronique

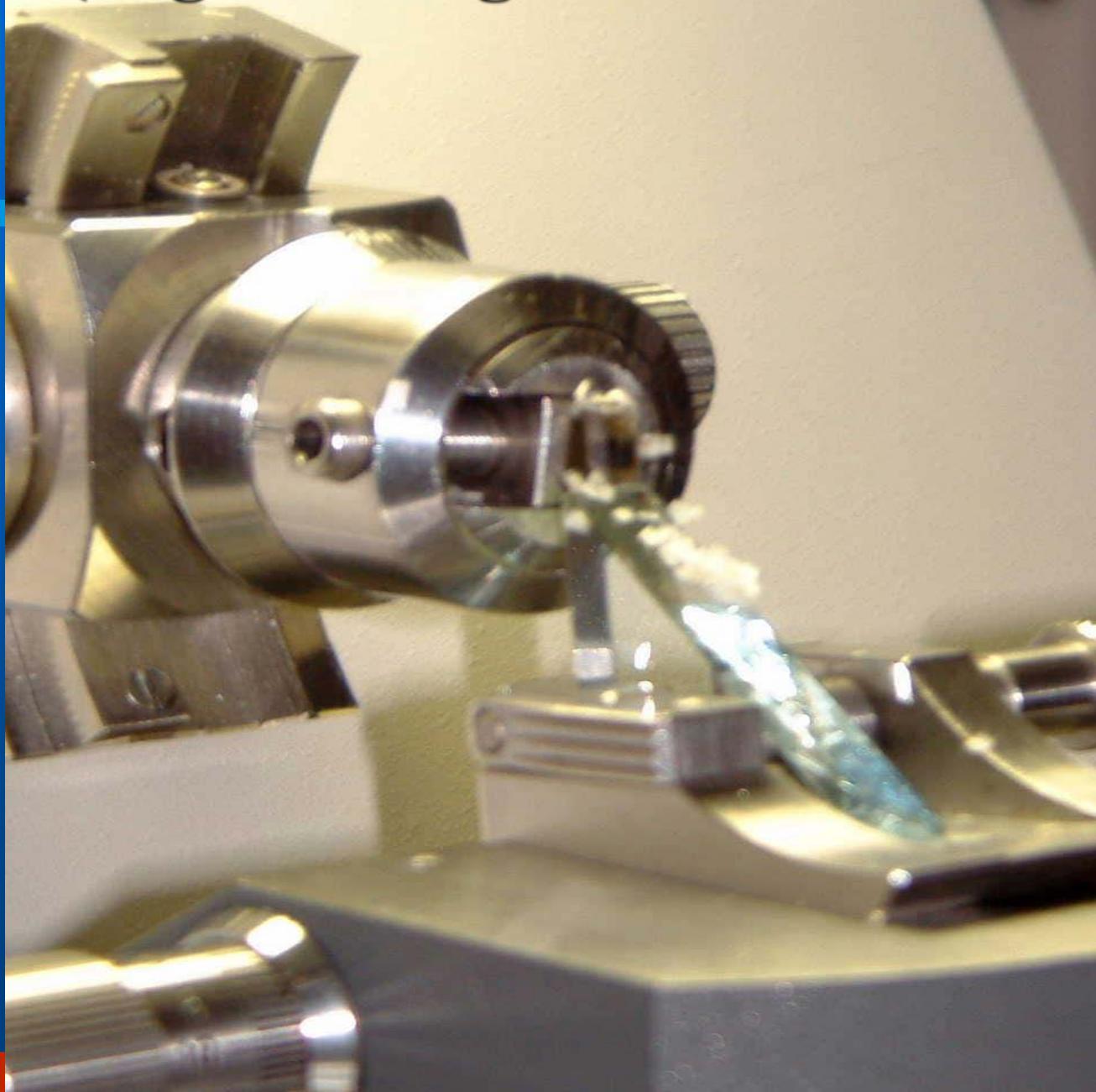
- Quelques millimètres de largeur et longueur,
- 60 à 100 nanomètres d'épaisseur,
- coupe déposée sur une grille métallique,
- rares colorations possibles,
- grandissement de 1000 à 100.000 fois.

# Les blocs

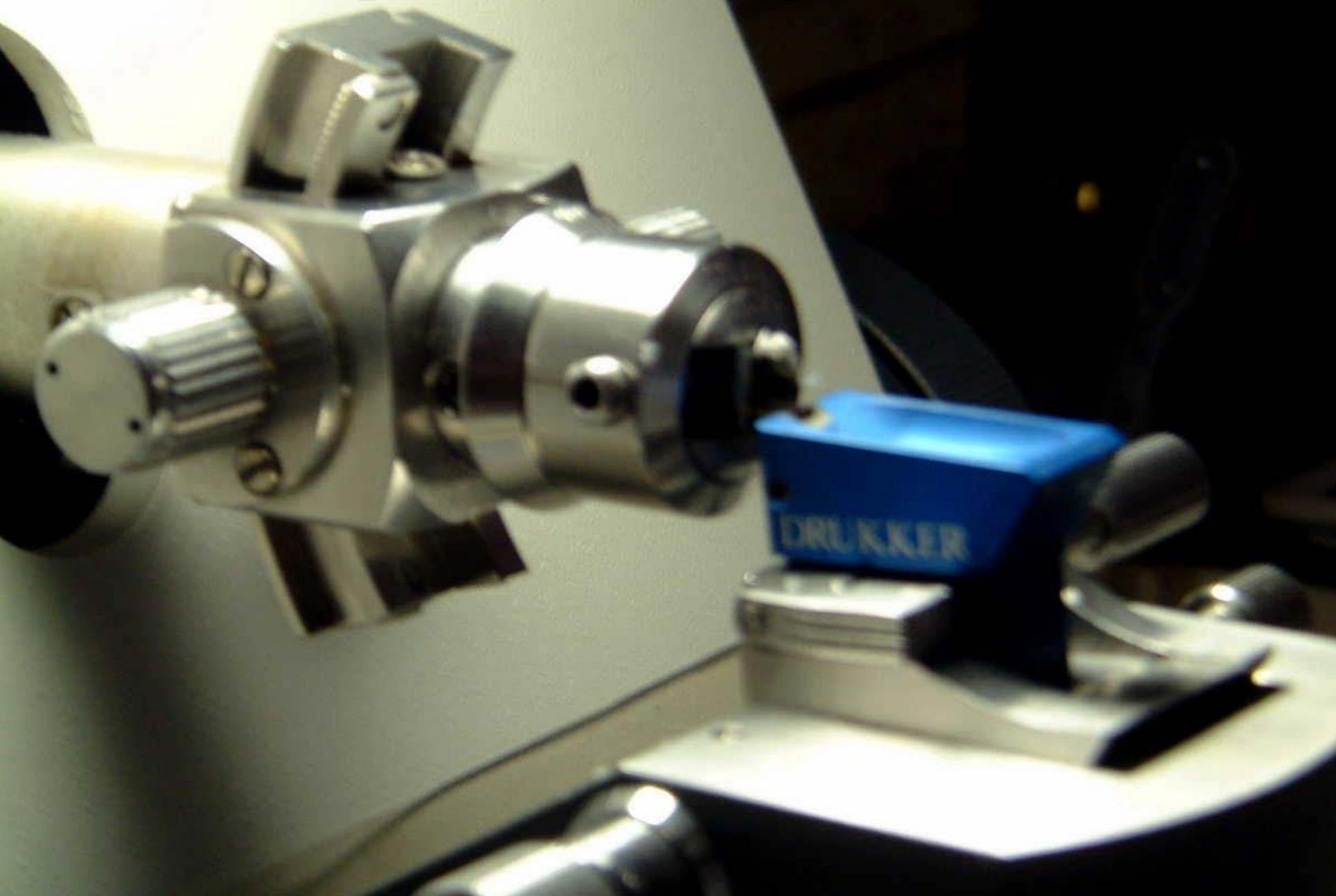


- environ 2 mm<sup>3</sup> de tissu,
- fixation immédiate glutaraldéhyde / tétroxyde d'osmium,
- inclusion en résine,
- imprégnation par métaux lourds (plomb).

# Coupe (dégrossissage au couteau de verre)



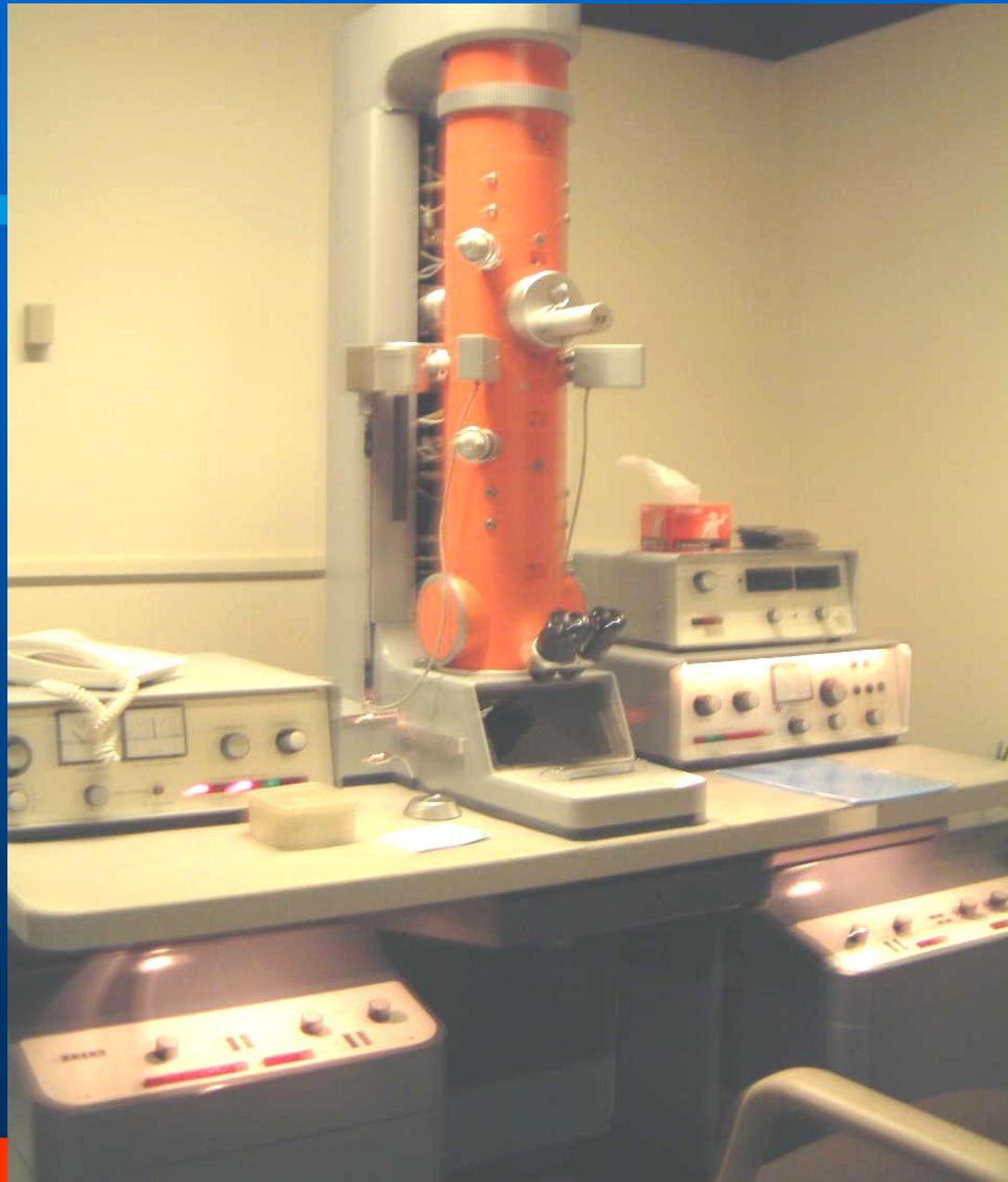
# Coupe ultra-fine (couteau diamant)



# Les coupes sur grille métallique



# Le microscope électronique



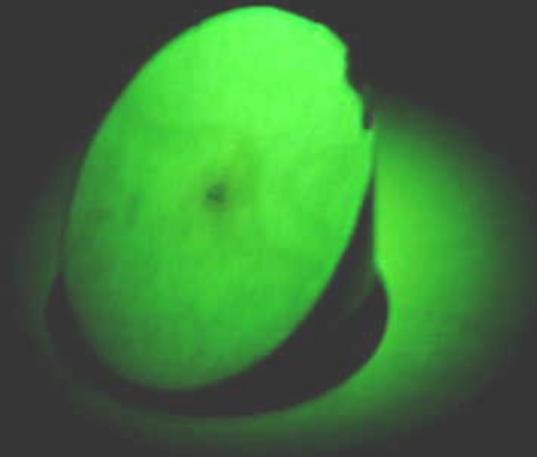
# Mise en place de la grille



# Observation



# Mise au point, observation





EPITHÉLIUM CYLINDRIQUE

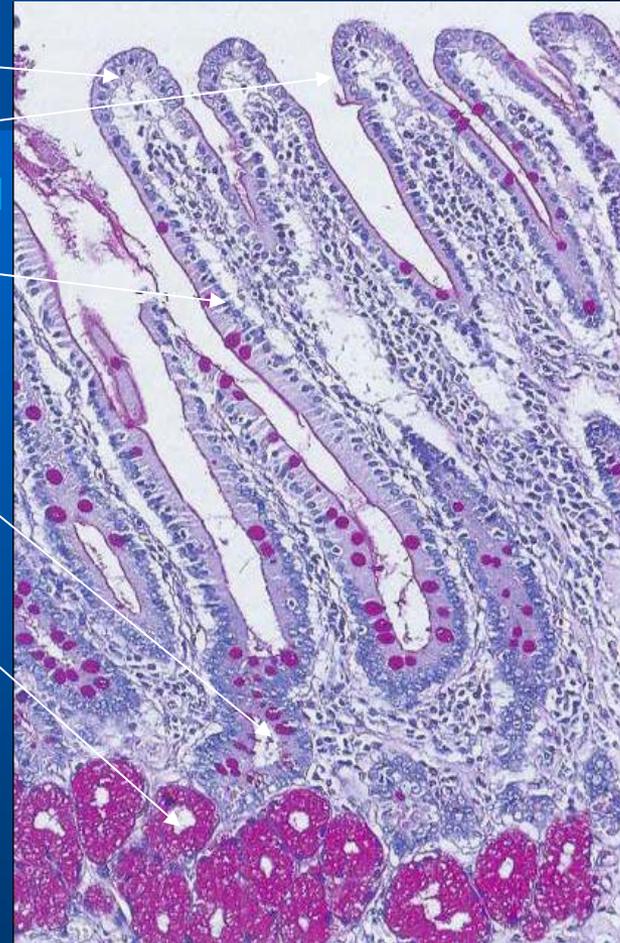
VILLOSITÉ

CELLULES CALICIFORMES

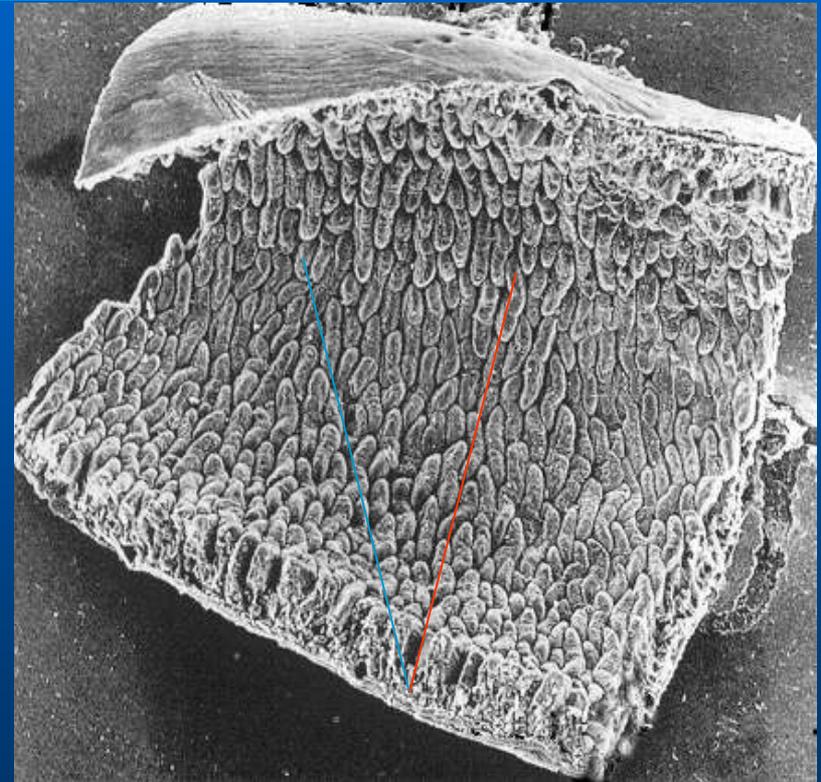
CRYPTE GLANDULAIRE

GLANDES DE BRUNNER

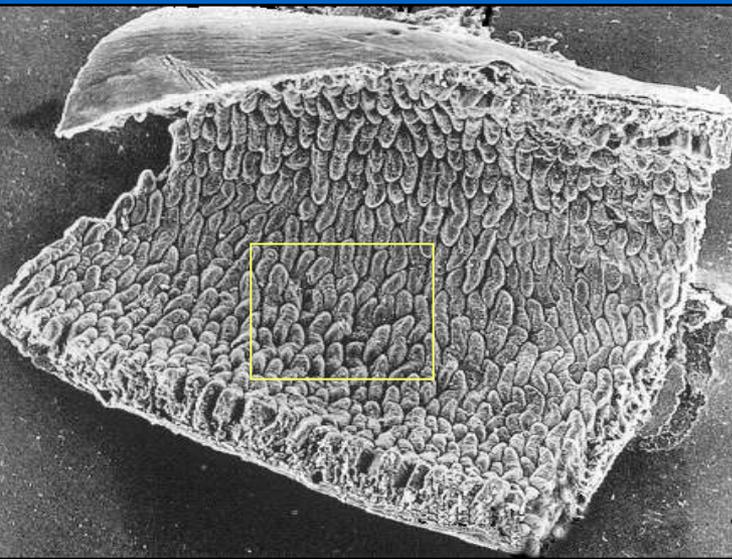
Les glandes de Brunner possèdent une lumière entourée par des cellules à cytoplasme riche en mucus refoulant le noyau à la base. La sécrétion des glandes de Brunner, participe avec l'excrétion pancréatique, riche en ions bicarbonates, à neutraliser l'acidité du chyme gastrique par leur alcalinité



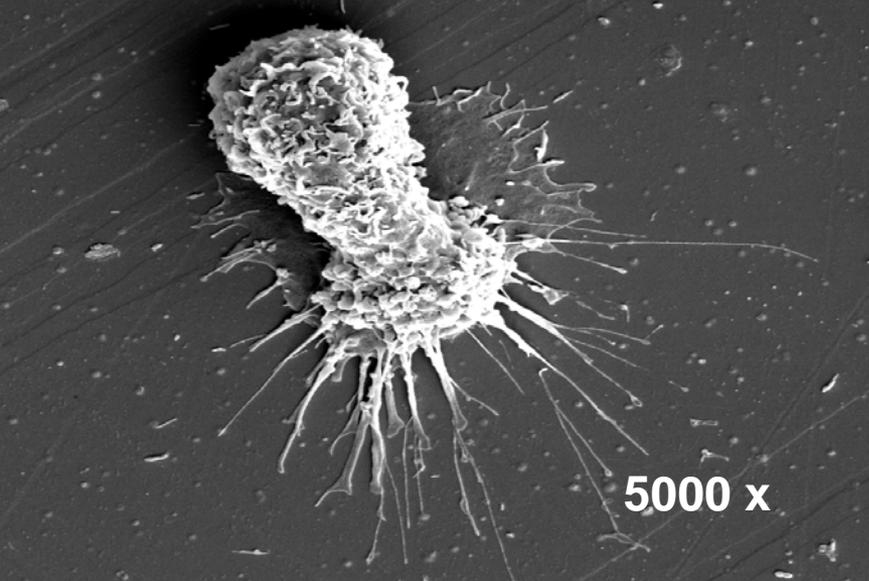
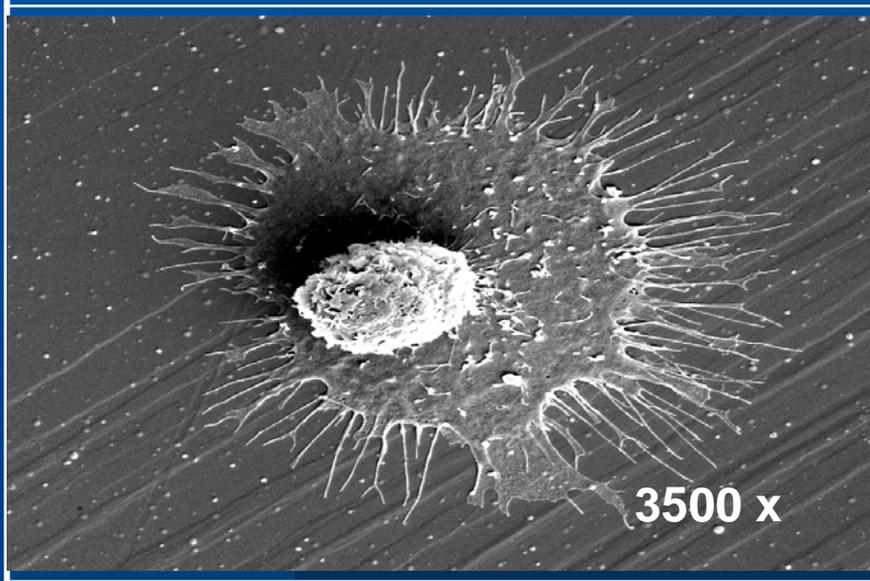
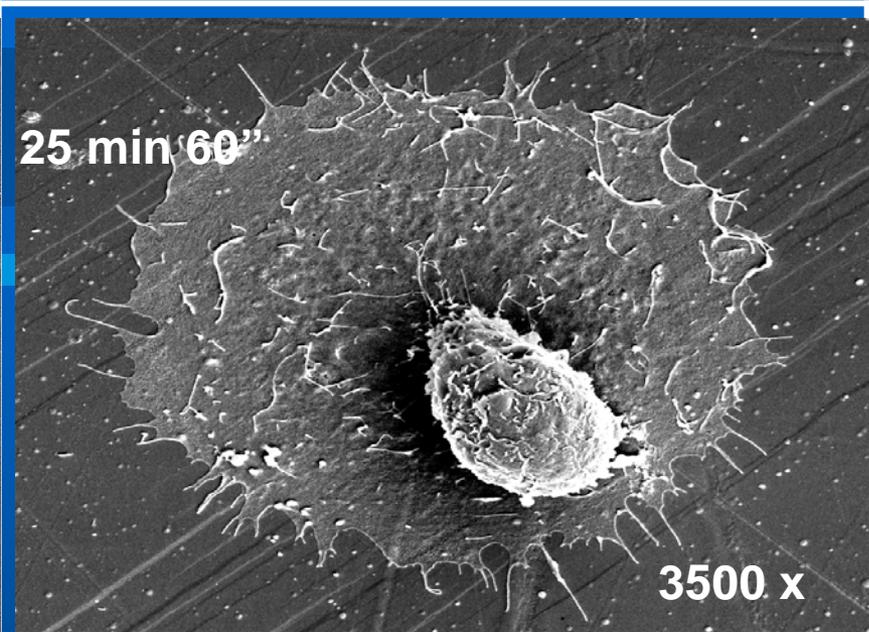
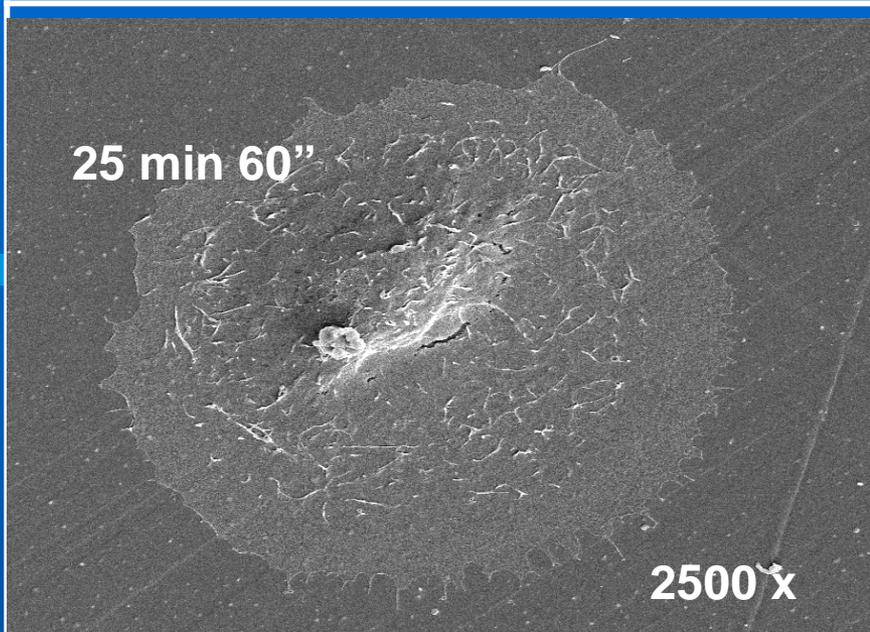
# Aspect de la muqueuse intestinale en microscopie électronique à balayage



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. Ces dernières, dans certaines maladies qui touchent l'intestin grêle (malabsorption), disparaissent totalement. La muqueuse perd son relief et devient plate (atrophie).

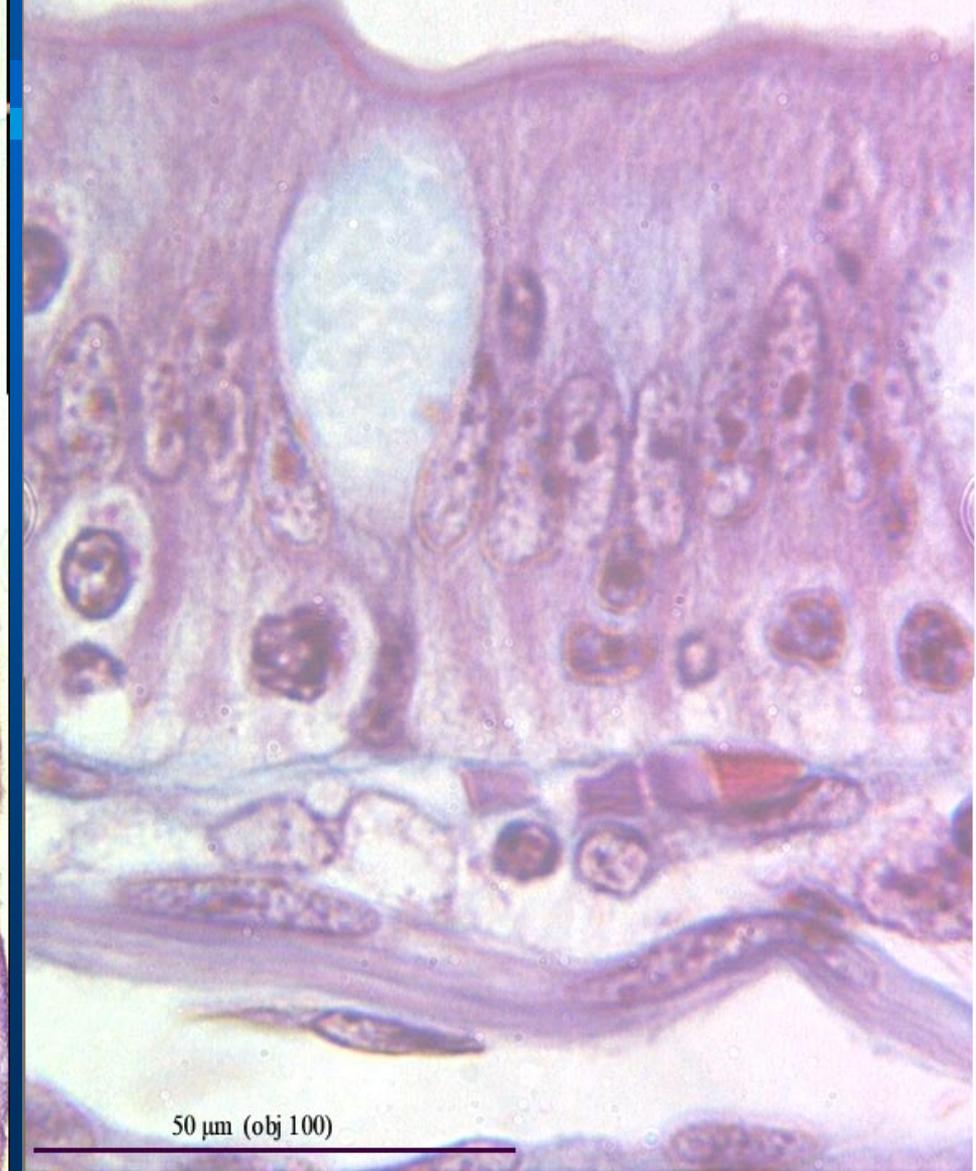


En microscopie optique, les plus forts grossissements sont :

X 400

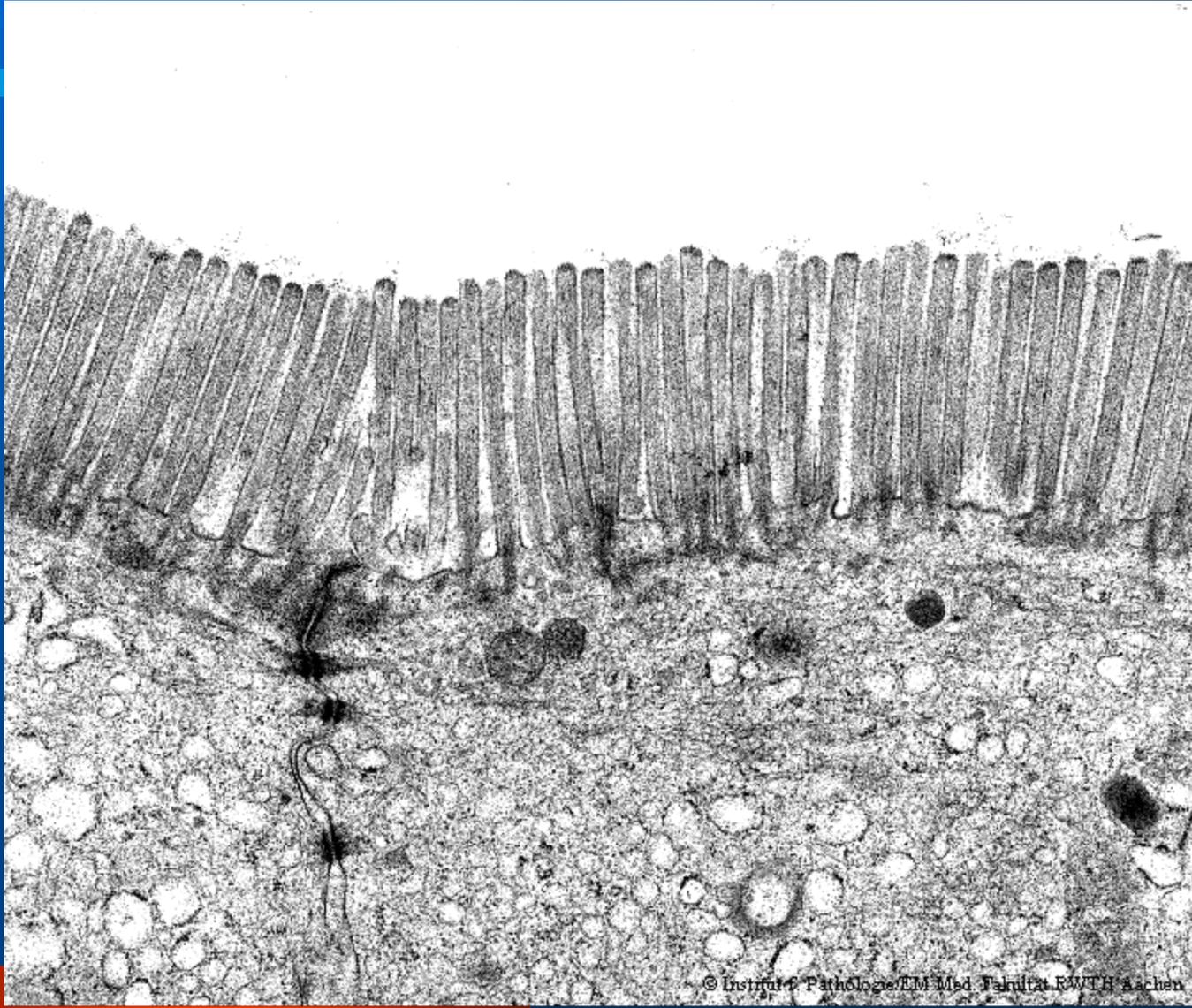


X 1 000



**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

# Intérêt de l'histologie

**Histologie: Définition**



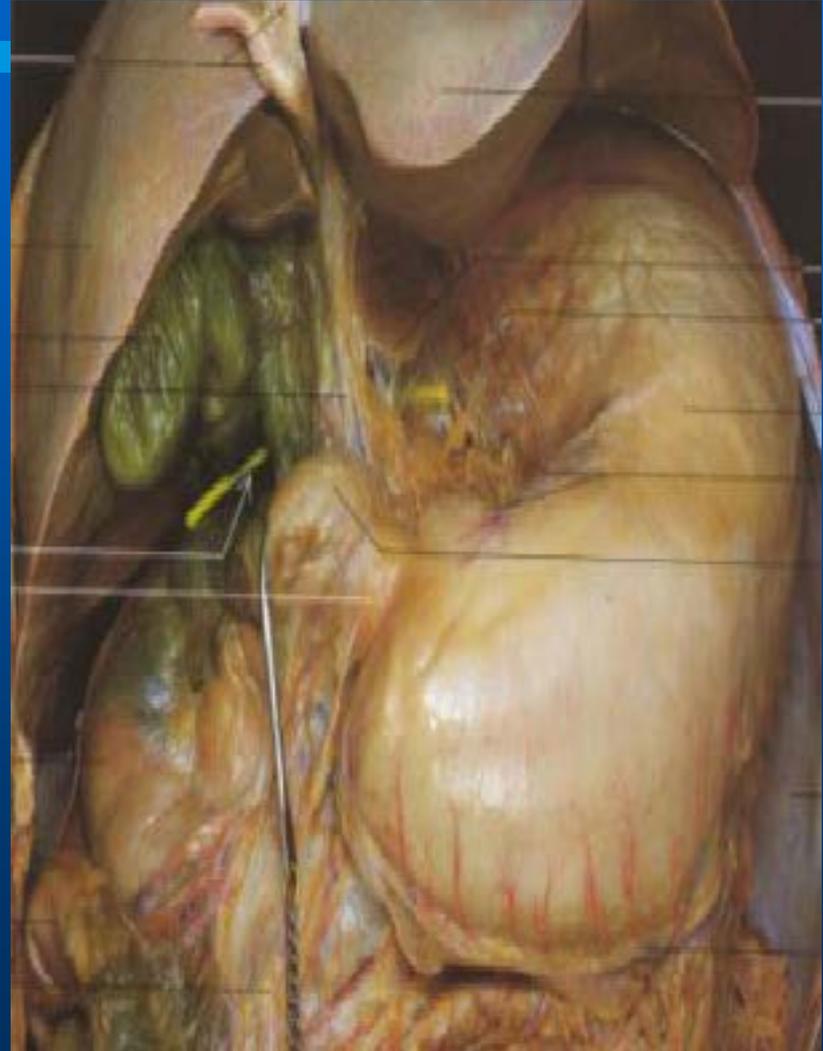
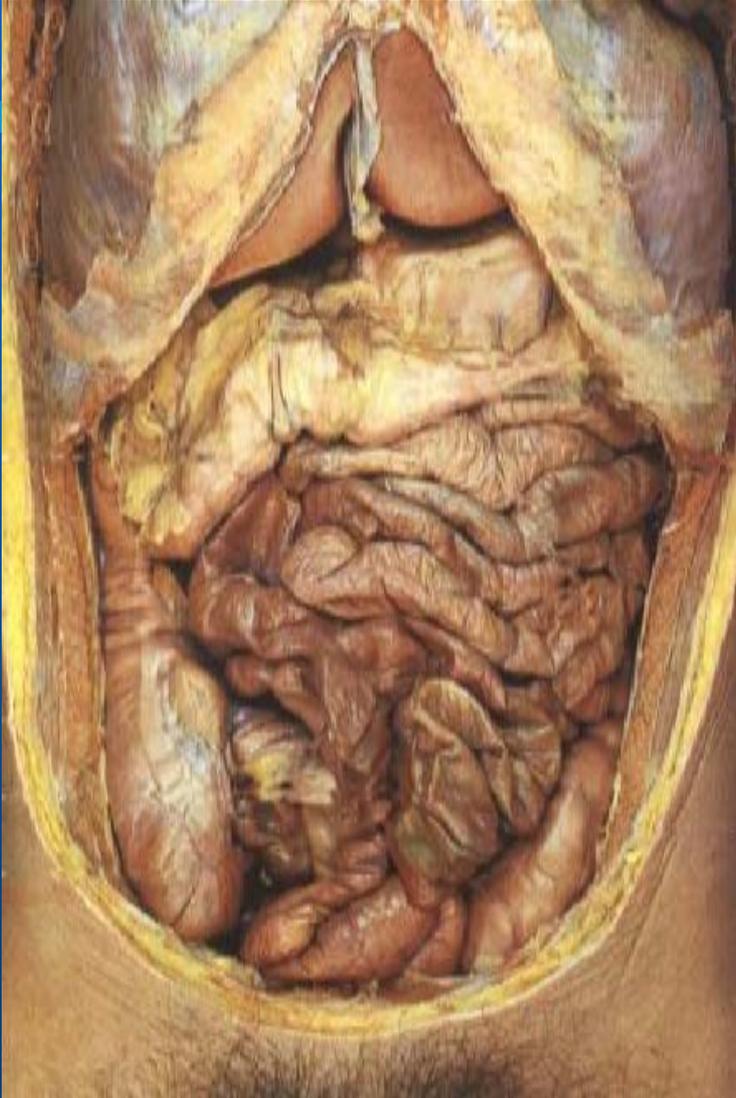
**Anatomie**

Structures et organes du corps humain

**Physiologie**

Fonctionnement des organes

# Anatomie



# Dissection

## Observation à différents niveaux

- Macroscopie (Anatomie)
- Microscopie optique
- Microscopie électronique
- Biologie moléculaire

Compréhension des structures



Compréhension du fonctionnement



# Considérer la fonction pour comprendre la structure

- Structures anatomiques
- Structures histologiques
  - Architecturales
  - Cellulaires

# Fonction d'un organe:

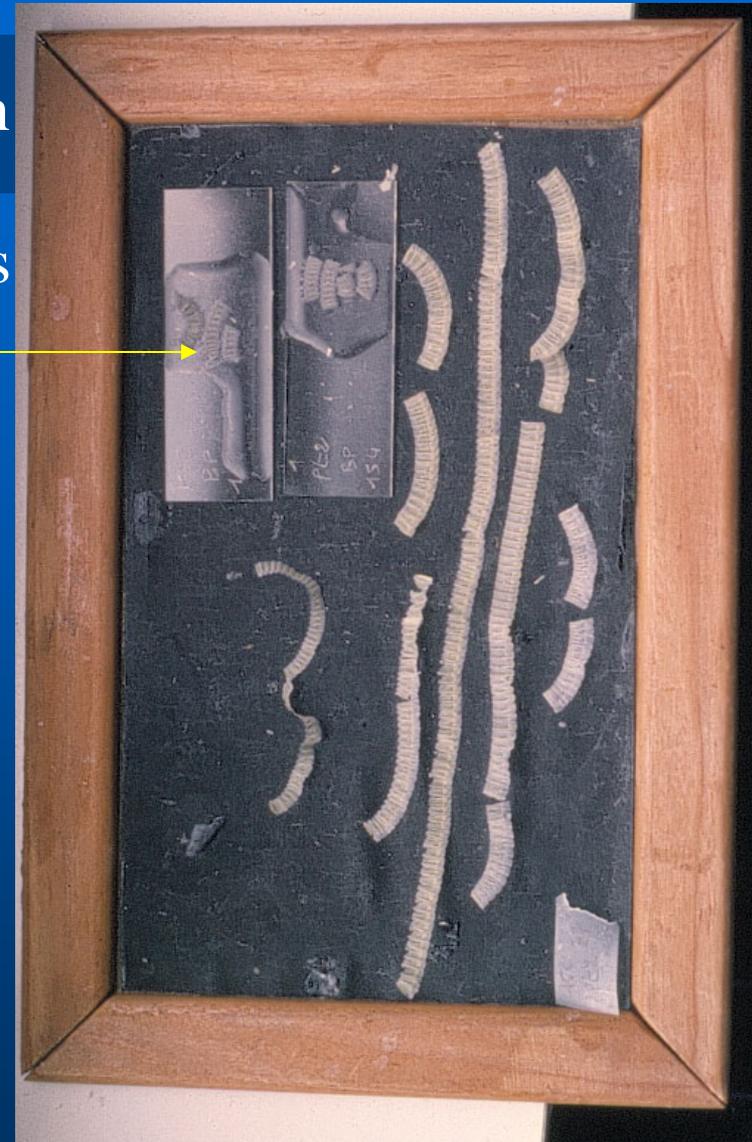
- Assurée par un assemblage de cellules spécialisées
- Arrangement spatial caractéristique: architecture
- Cellules épithéliales
  - Cellules mésenchymateuses:
    - . Communes
    - . Spécialisés
- Cellules nerveuses

**Cellules adoptent des caractères  
morphologiques microscopiques et  
moléculaires relatif à la fonction à assurer**



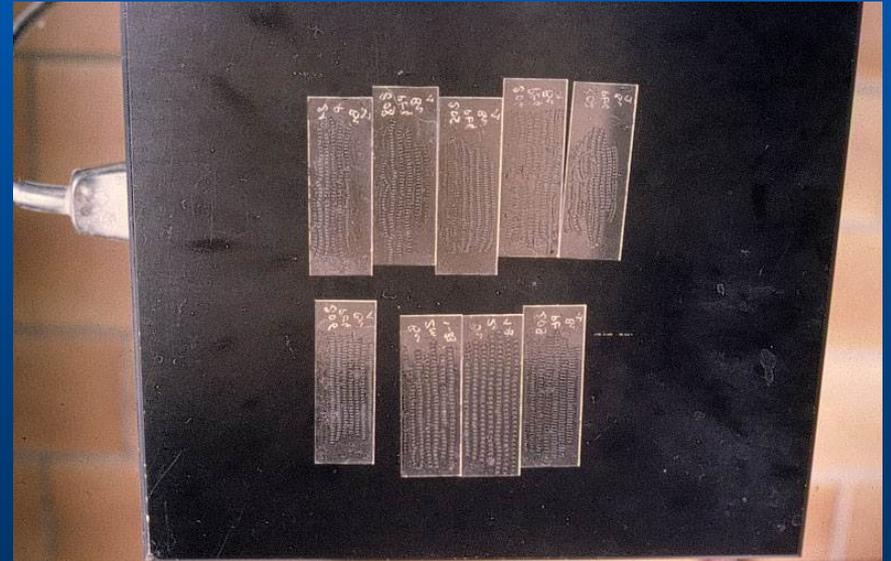
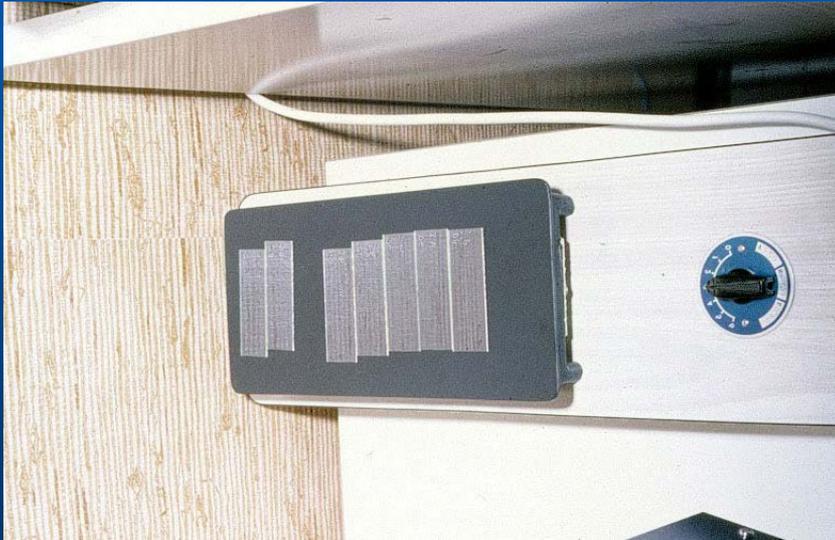
**Différenciation cellulaire**

A l'aide du scalpel on coupe le ruban qu'on récupère à l'aide du pinceau.  
Des portions du ruban sont disposées sur un support en verre: la lame



## 6-Étalement et collage des coupes sur la lame

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



## 7-Déparaffinage

Étape assurant la réhydratation de la coupe afin de la colorer

toluène , alcool 100°, 95°, 70°, eau



## 8-Coloration



Cuve à coloration

Support de lames

## 9-Déshydratation



Eau, alcool à 70°;95°;100°, Toluène

10-montage

Entre lame et lamelle dans le baume du canada