

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]

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.
- 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.

c) Déshydratation

- Le but de la déshydratation est d'éliminer l'eau contenue dans l'échantillon.
- 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°) puis dans des bains de xylène ou de toluène. Cette étape prépare l'inclusion, vu que la paraffine est hydrophobe.

d) Inclusion (Enrobage)

- Le but de l'inclusion est de rigidifier l'échantillon, afin de permettre la réalisation de coupes fines et régulières.
- Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine, qui permet une solidification de l'échantillon.
- Immerger la pièce dans la paraffine liquide maintenue dans une étuve à 56°
- Après 4heures 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 la pièce prélevée est incluse.

e) Coupe (Microtomie)

- Les coupes du bloc de paraffine sont réalisées à l'aide d'un microtome permettant d'obtenir des tranches fines 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

- 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.

g) 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.

h) 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.

i) 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 [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 la 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.

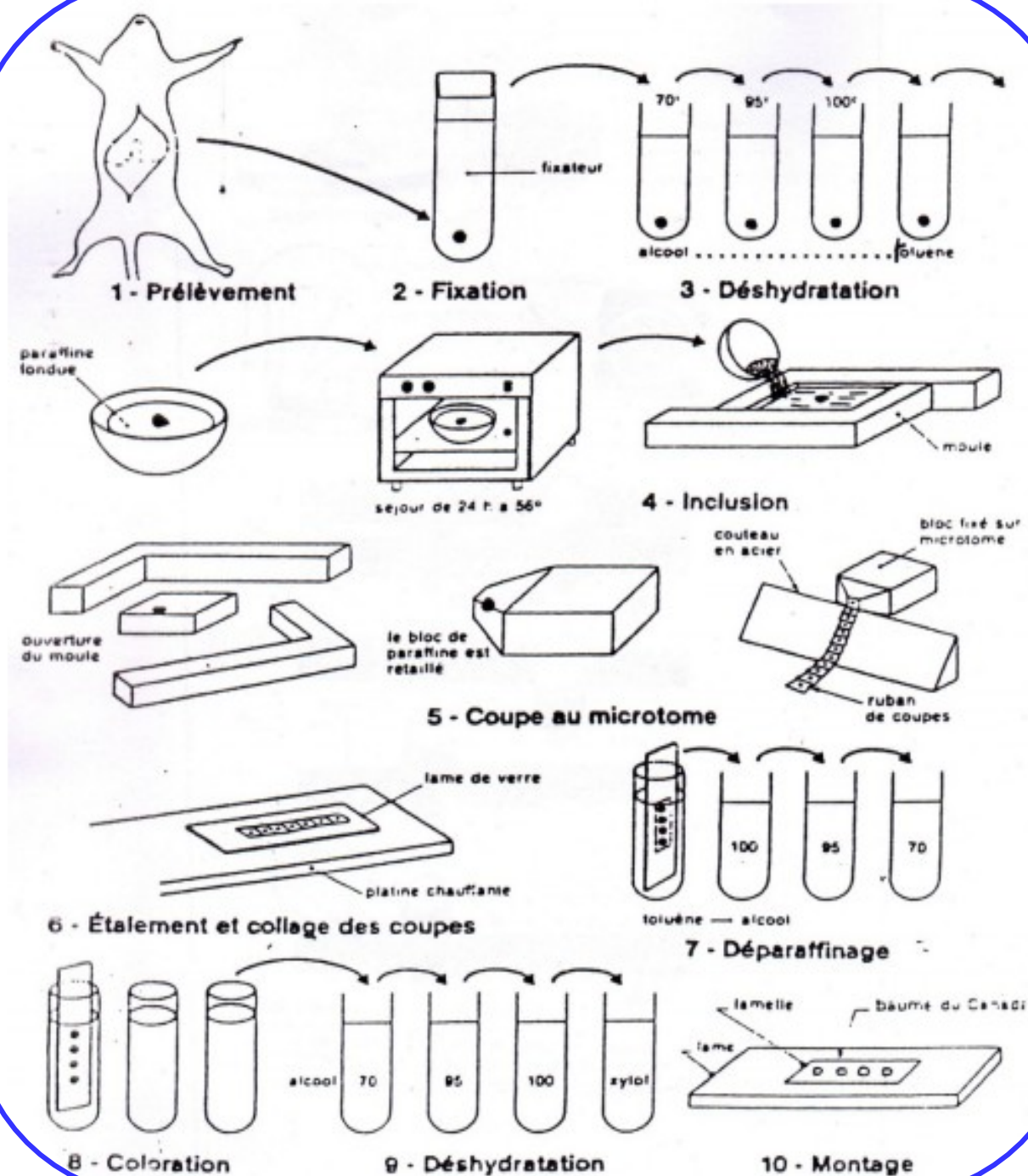


Figure1 : Préparation des coupes pour observation au microscope optique

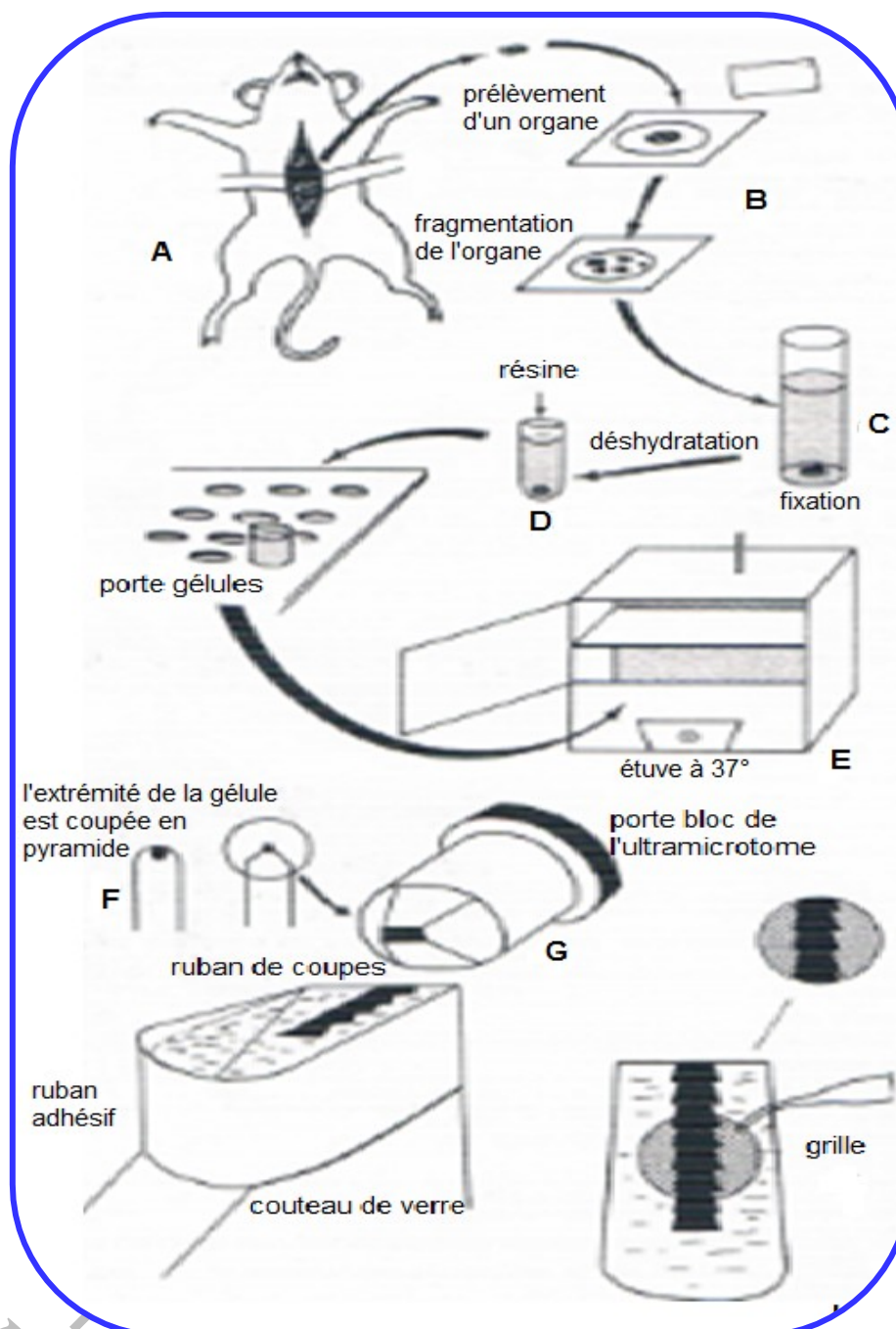


Figure2 : Préparation des coupes pour observation au microscope électronique à transmission