

TD N°3 : 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 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 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 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)

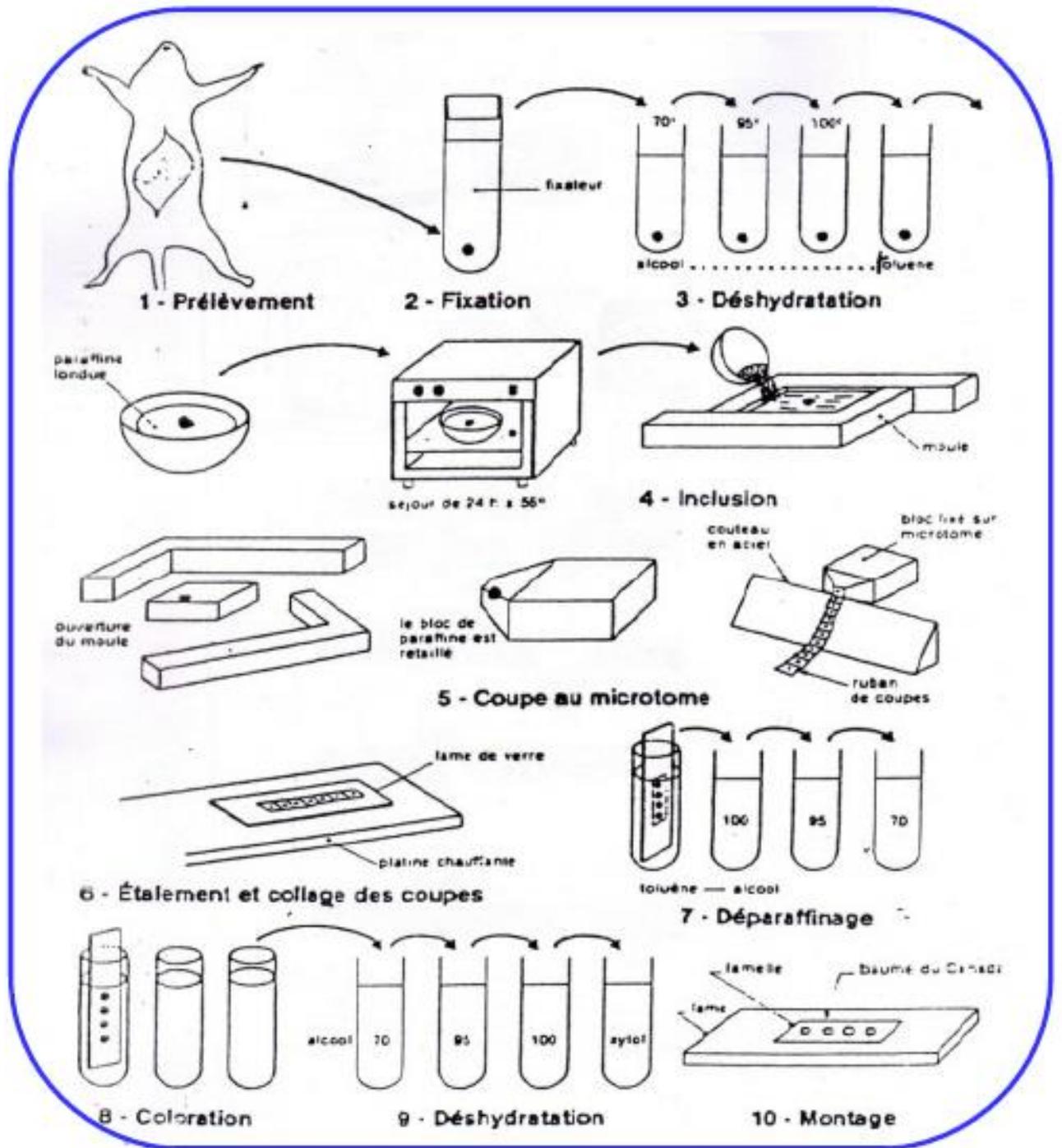
Les blocs de résine renfermant l'échantillon sont coupés à l'aide d'un ultra microtome muni d'un couteau de verre ou de diamant qui permet d'obtenir des coupes ultrafines d'environ 80 nm d'épaisseur.

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.



Figurel : Préparation des coupes pour observation au microscope optique

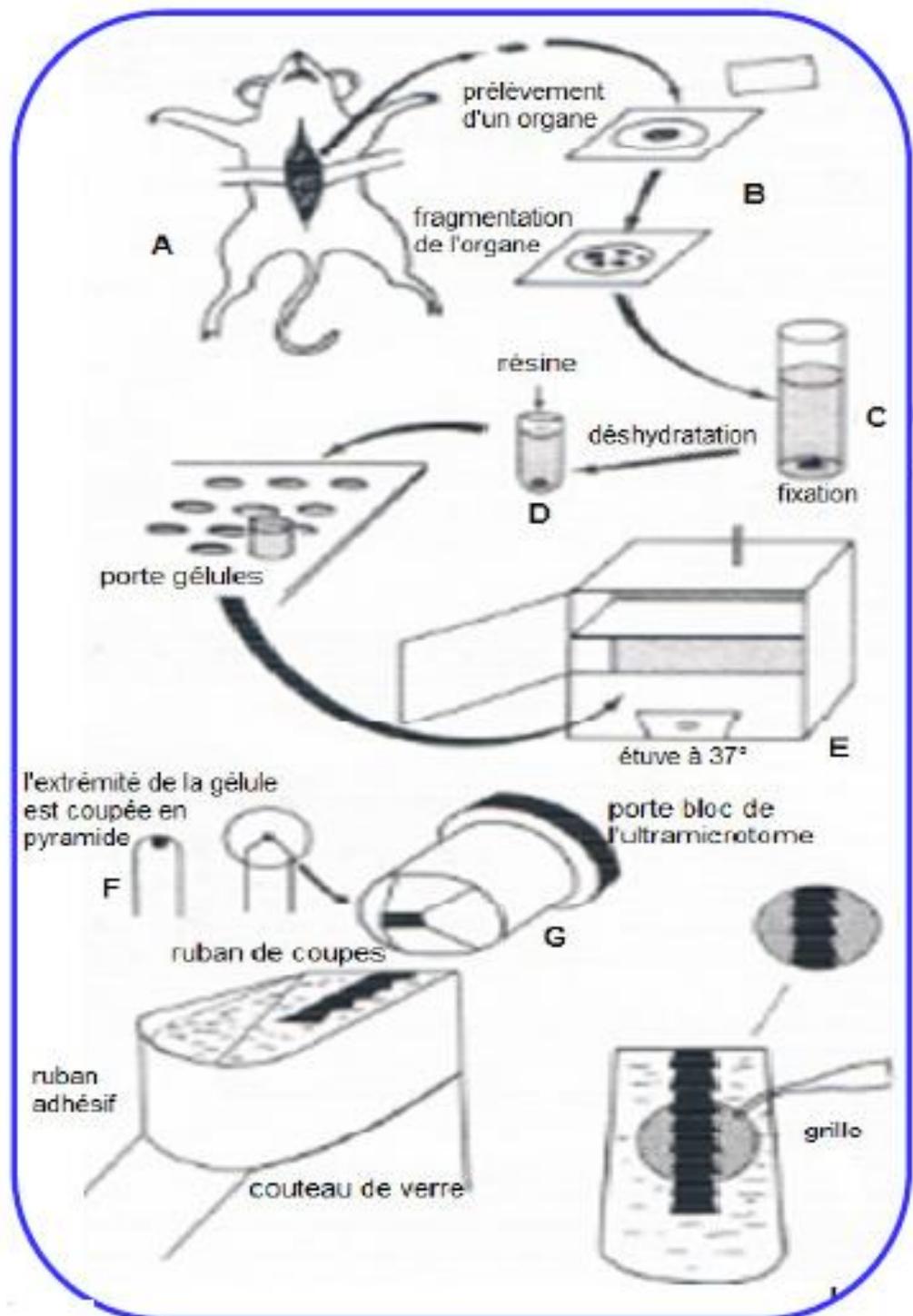


Figure 2 : Préparation des coupes pour observation au microscope électronique à transmission