

Méthodes microscopiques (suite)

Microscope électronique: les images des deux types des microscopes électroniques.



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Final image can be displayed on fluorescent screen or photographed.



Electron gun

Specimen holder

Fluorescent screen

Méthodes microscopiques (suite)

2. Les conditions d'observation aux microscopes

2.1. Méthodes d'études par microscopie à lumière

* Les différentes étapes du traitement :

Des coupes de quelques microns d'épaisseur ne peuvent être réalisées que si la dureté de l'échantillon à couper est convenable.

Les cellules ont une consistance visqueuse et sont beaucoup trop molles pour être coupées en tranches minces. Il faut donc les **durcir artificiellement** pour pouvoir les sectionner. Ceci est réalisable si l'on agit sur le constituant le plus abondant des cellules = **l'eau**. :

----> Ou bien on remplace l'eau par un autre liquide pouvant être durci dans certaines conditions = méthode **d'inclusion** ;

----> Ou bien on fait passer l'eau de l'état liquide à l'état solide = technique de **congélation**.

Mais ces méthodes, qui permettent de durcir les cellules altèrent considérablement l'organisation cellulaire. C'est pourquoi il est nécessaire de **consolider au préalable les structures** par un ensemble d'opérations appelées **fixation**.

Lorsque la condition de "fine épaisseur" est remplie, il faut ensuite **contraster artificiellement** l'échantillon = c'est l'étape de **coloration**.

Chronologiquement ces différentes étapes s'enchainent ainsi :

- 1) fixation = consolider
- 2) inclusion = durcir
- 3) microtomie = couper
- 4) coloration = contraster

2.1.1. La fixation

Une fixation est un traitement chimique ou physique effectué sur des cellules vivantes et permettant de pratiquer ultérieurement certaines manipulations avec un minimum de dommages pour les structures cellulaires. En général la fixation entraîne la mort des cellules, ce qui indique que la cellule a subi des perturbations, dont il conviendra de connaître la nature et l'importance pour juger de la valeur de la fixation.

Méthodes microscopiques (suite)

2.1.2. Durcissement de l'échantillon et obtention de coupes.

* Durcissement par inclusion :

Il est obtenu en remplaçant l'eau des cellules par de la **paraffine chaude** qui **durcit en refroidissant**. Le remplacement de l'eau par la paraffine n'est pas directement possible, ces deux liquides n'étant pas miscibles. On doit en premier lieu substituer à l'eau des cellules fixées de l'**éthanol**, puis du **toluène** qui peut se mélanger à la **paraffine liquide** (chaude). Cette paraffine remplit dans les cellules les espaces préalablement occupés par l'eau. En refroidissant, la paraffine se solidifie et donne aux cellules une consistance qui permet de les débiter en coupes minces.

* Durcissement par congélation :

Il peut être effectué en même temps que la fixation par la même technique, ou bien en congelant des cellules déjà fixées par un traitement chimique.

* Obtention de coupes :

Les blocs de paraffine ou les blocs de glace contenant les cellules congelées, sont coupés en tranches à l'aide d'appareils appelés **microtomes**. Lorsqu'on travaille avec des échantillons congelés, le microtome est équipée d'une enceinte maintenue à -20°C. Dans les deux cas, inclusion à la paraffine ou congélation, la lame servant à trancher est un **rasoir d'acier**.

Après inclusion à la paraffine, on peut réaliser des coupes de **2 à 5 µm**, alors qu'après congélation, on peut obtenir au mieux des coupes de 5-10 µm.

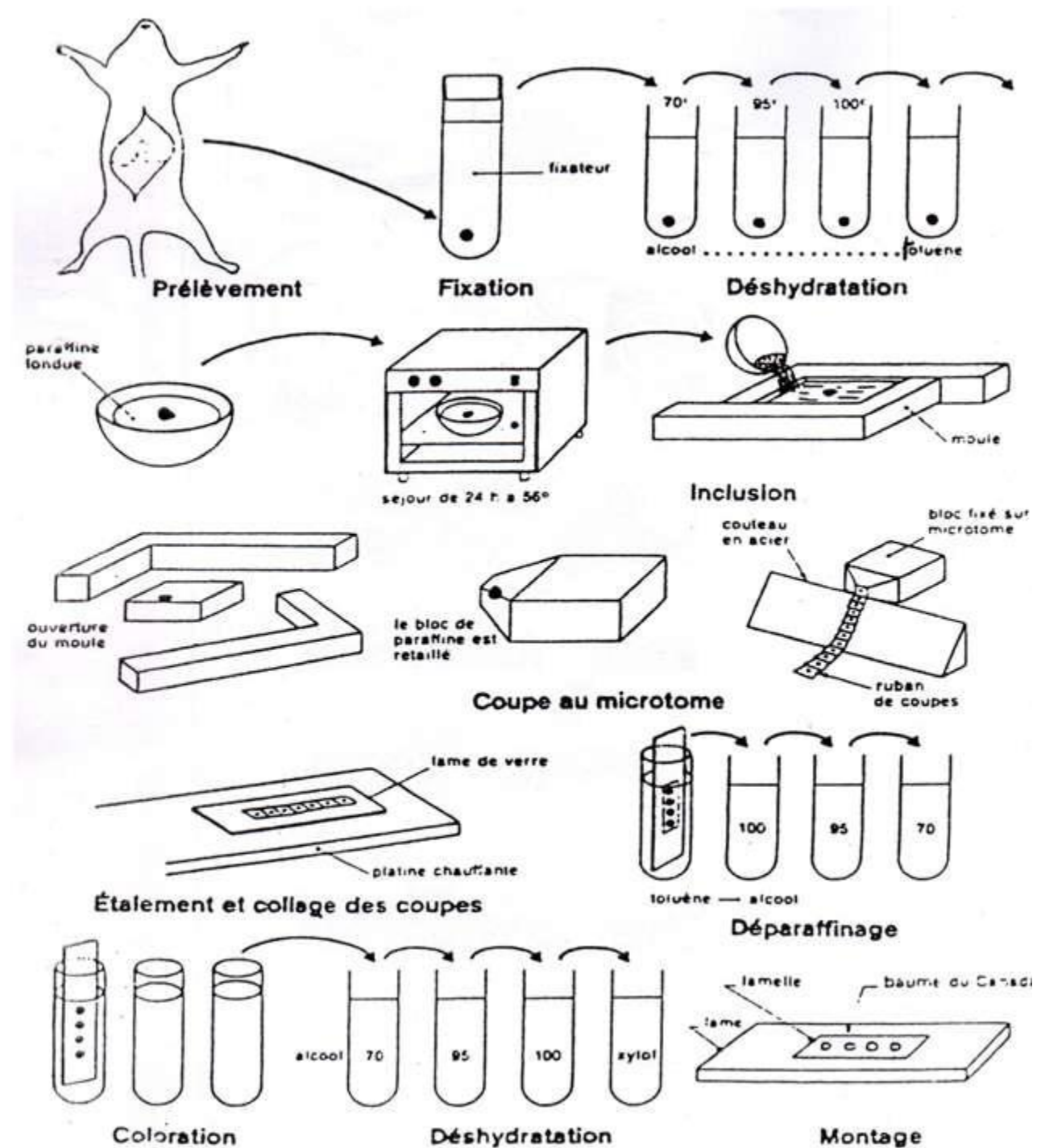
2.1.3. Obtention de contrastes et observation

Une fois les coupes réalisées, on peut procéder à l'obtention de contrastes. Les contrastes peuvent être augmentés en utilisant **le microscope à contraste de phase** ou en pratiquant des **colorations**.

* **Colorant** = molécule qui **a la propriété d'absorber certaines longueurs d'onde** de la lumière et **de conférer une couleur** au composant qui l'a lié.

* La **coloration** peut être :

- **simple** = utilisation d'un colorant unique pour contraster ;
- **combinée** = utilise plusieurs colorants ;
- **progressive** = on arrête la coloration au bout d'un temps précis, mis au point pour que la coloration soit optimale ;
- **régressive** = on surcolore et on enlève ensuite l'excès de colorant au moyen d'un différenciateur = solvant du colorant utilisé.



Les différentes étapes de la technique histologique.