

La microscopie électronique

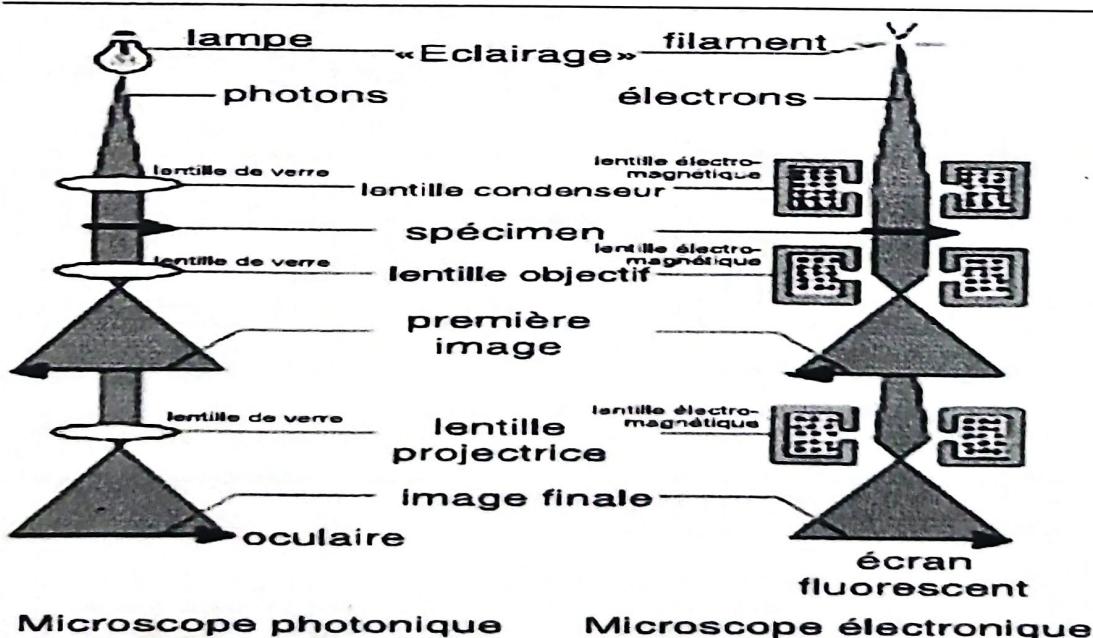
1. Notion de pouvoir de séparation ou pouvoir de résolution :

Le PS ou PR est défini comme étant la distance minimale séparant 2 points individualisables.

- chez l'homme le PR est de 0.1 mm à une distance de 25 cm.
- Le PR d'un microscope optique est limité par la longueur d'onde de la lumière visible ; il est de 0,2 μm.
- Pour le ME, le PR est de l'ordre de l'A° (L'ångström).

- Les microscopes électroniques ont un plus grand pouvoir de résolution que les microscopes optiques qui utilisent des rayonnements électromagnétiques.

- Ils peuvent obtenir des grossissements beaucoup plus élevés allant jusqu'à 5 millions de fois, alors que les meilleurs microscopes optiques sont limités à un grossissement de 2000 fois.
- Ces deux types de microscopes ont une résolution limite, imposée par la longueur d'onde du rayonnement qu'ils utilisent.
- La résolution et le grossissement plus grands du microscope électronique sont dus au fait que la longueur d'onde d'un électron est beaucoup plus petite que celle d'un photon de lumière visible.



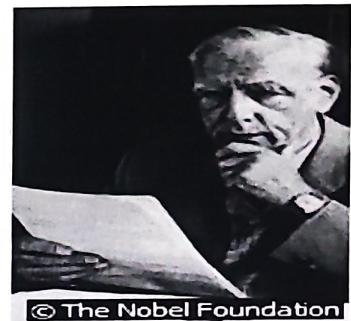
Schémas comparés des trajets des rayons lumineux et des électrons dans un microscope photonique et dans un microscope électronique.

- Il existe 2 types de ME : 1. le MEB : Microscope électronique à Balayage.
- 2. le MET : Microscope électronique à Transmission.

2. Historique :

Le premier microscope électronique a été inventé en 1932 par les 2 chercheurs physiciens allemands, Ernst Ruska et Max Knoll.

Ernst Ruska a reçus le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention.



3. Composition :

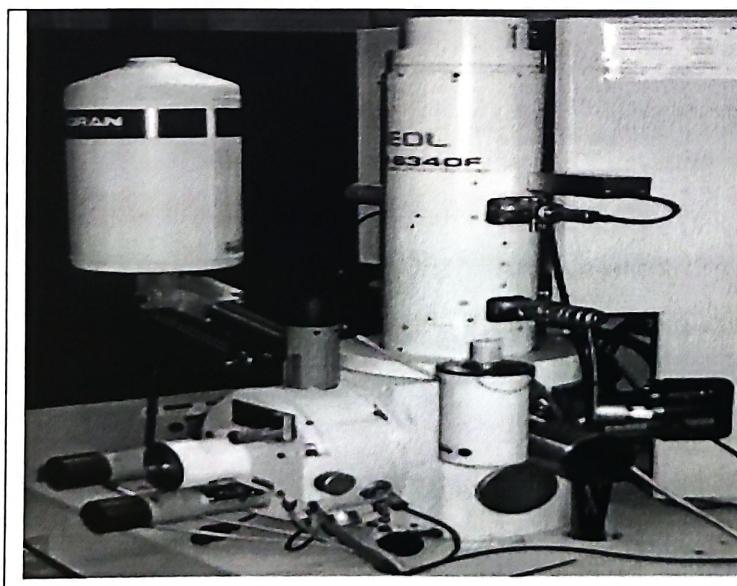
Il est composé de 3 grandes parties

- Une partie électronique.
- Une partie de commande.
- Une partie analytique (facultative).

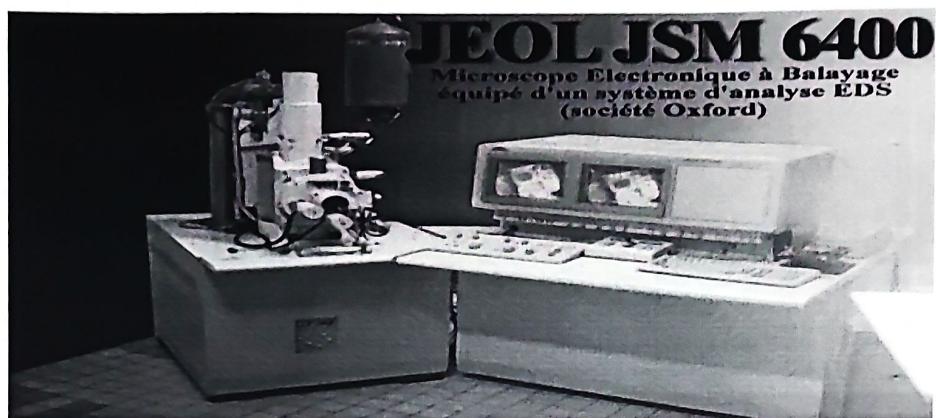
La partie électronique :- Un canon à électron.

- Un tube électronique ou la colonne.
- Un détecteur des électrons.
- Un amplificateur ou scintillateur.

- Un écran de visualisation et un système de prise de vues photographiques

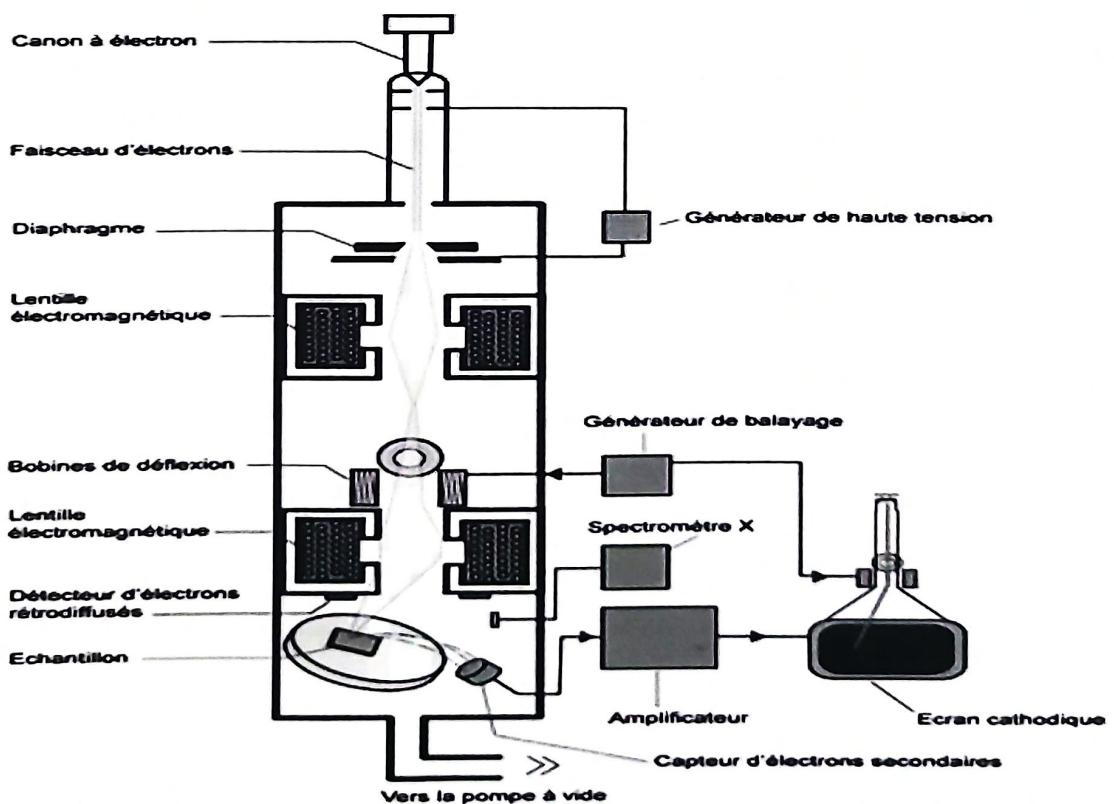


4. La microscopie électronique à balayage



4.1. Principe de fonctionnement de l'appareil :

- La microscopie électronique à balayage (MEB) ou *Scanning Electron Microscopy (SEM)* 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 MEB consiste en un faisceau d'électrons balayant la surface de l'échantillon à analyser qui, en réponse, réemet certaines particules. Ces particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface.



Le microscope électronique à balayage

Principe :

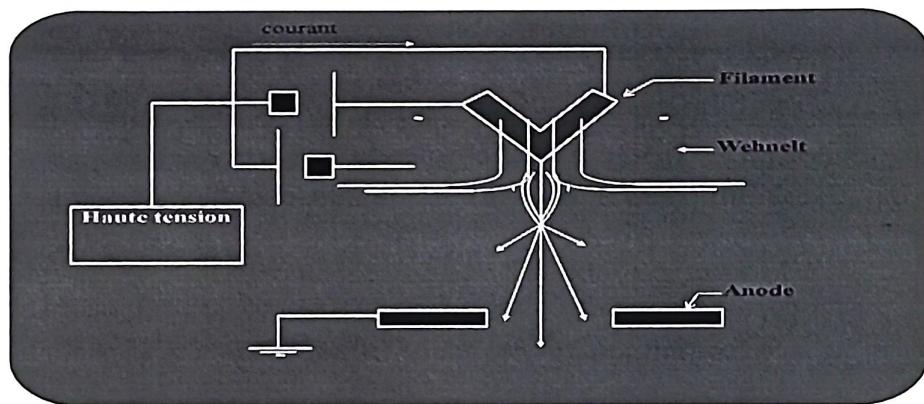
1. La création d'un vide très poussé à l'intérieur de la colonne de l'ordre de 10^{-5} Torr.

Ce vide est réalisé à 2 niveaux :

- Un vide primaire de 10^{-2} Torr (30 mn)
- Un vide secondaire de 10^{-5} Torr (45 mn à 1 heure)

2. Appliquer une haute tension de 5 K volt au niveau du canon.

3. Sous l'influence de cette haute tension, le filament en tungstène génère des électrons qui forment un faisceau d' e^- primaire.

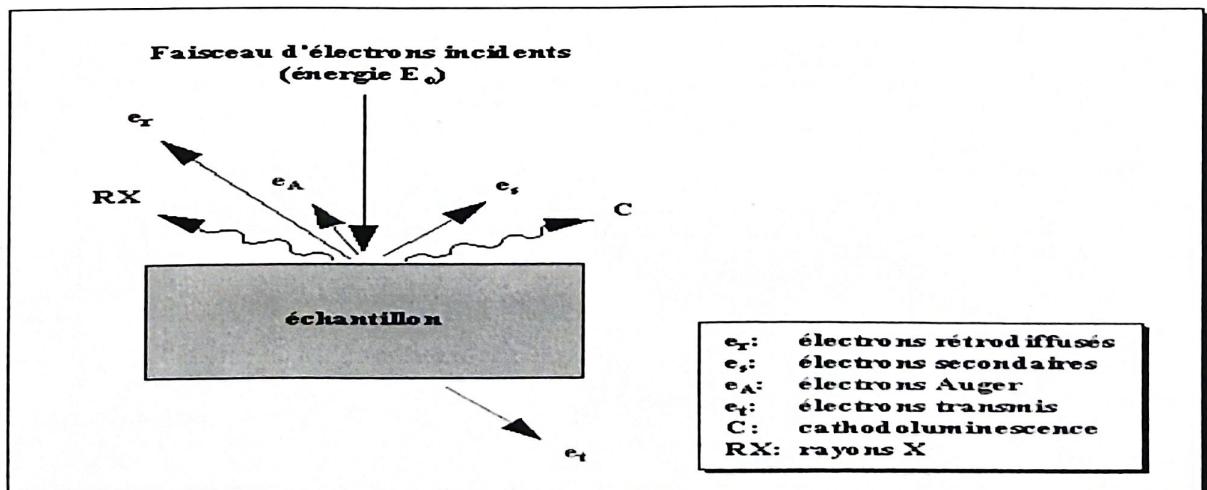


4. le faisceau primaire ou la sonde électronique primaire passe à travers les lentilles magnétiques pour arriver aux bobines de déflexions.

5. Les bobines vont déplacer la sonde électronique sur la surface de l'échantillon ; point par point et ligne par ligne.

Suite à ce bombardement électronique, l'échantillon va réagir par l'émission de plusieurs signaux (schéma).

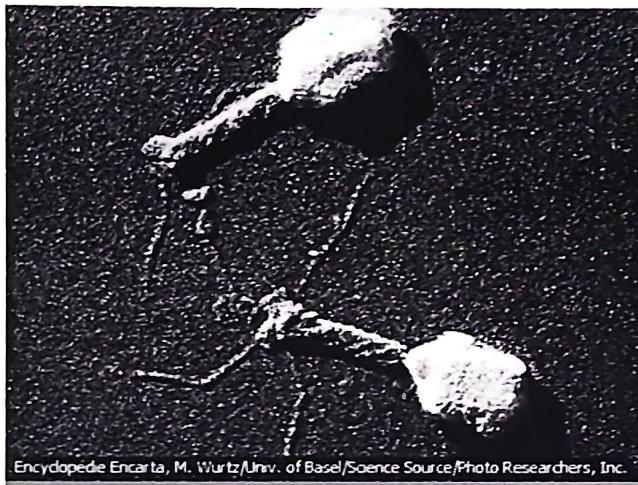
4.2. Interactions du faisceau électronique avec l'échantillon :



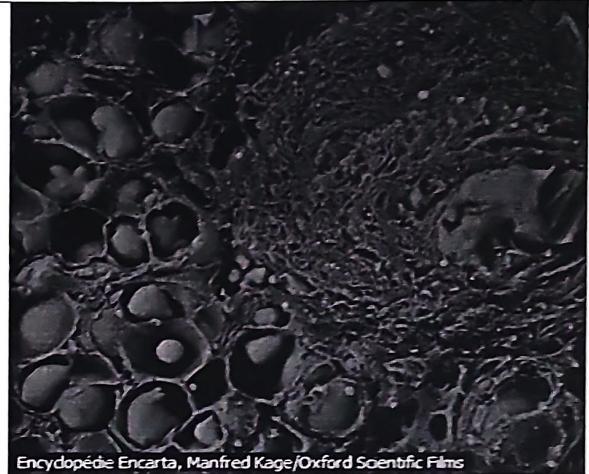
Interactions du faisceau électronique avec l'échantillon

- 6. le détecteur du MEB capte les e- secondaires qui vont être transformés en photons par l'amplificateur.
- 7. l'image formée est observée sur l'écran et on peut la photographier.

4.3. Exemples d'images captées par microscopie électronique :



Bactériophages T4 vus au microscope électronique



Cancer au microscope : Ce cliché de microscopie électronique à balayage d'un ovaire montre, à gauche, des cellules normales et, à droite, une tumeur maligne.



Streptocoques au MEB : Les bactéries du genre *Streptococcus* comptent parmi les agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales les plus fréquentes.

Dr. RIH .A
Maître de Conférences
UDL - SBA

4.4. Les domaines d'utilisation de la MEB :

Aujourd'hui, la microscopie électronique à balayage est utilisée dans des domaines allant de la biologie à la science des matériaux, et un grand nombre de constructeurs proposent des appareils de série équipés de détecteurs d'électrons secondaires et dont la résolution se situe entre 0,4 nanomètres et 20 nanomètres.

5. La microscopie électronique en transmission

La microscopie électronique en transmission (ou MET, en anglais TEM 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 (voire 0,04 nm).

5.1. Principe de fonctionnement du Microscope Electronique à Transmission :



Principe de fonctionnement du Microscope Electronique à Transmission

- La microscopie électronique en transmission consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons, et à utiliser un système de lentilles magnétiques pour projeter l'image électronique de l'échantillon sur un écran phosphorescent qui la transforme en image optique.

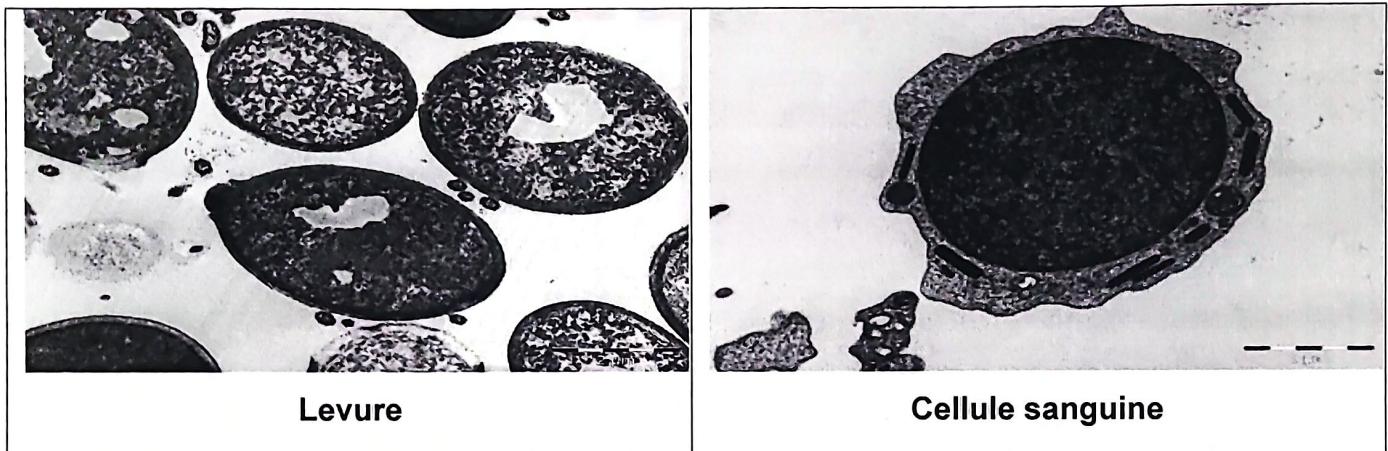
Principe :

- On émet des électrons en chauffant un filament de Tungstène.
- Ces électrons sont ensuite accélérés à l'aide d'une tension comprise entre 200 et 1000 kV (1000 kV pour les plus onéreux).
- Une fois le vide fait dans la cellule, on fait passer le faisceau d'électrons au travers d'un échantillon d'environ 3 mm de diamètre et d'épaisseur inférieure à 20 nano-mètres.
- Puis ce faisceau est focalisé à l'aide de lentilles magnétiques vers l'écran ou la plaque photographique.

5.2. Les domaines d'utilisation de la MET :

Les applications de la microscopie électronique en transmission couvrent un très vaste domaine, de l'observation d'échantillons biologiques, comme le noyau des cellules à l'analyse d'échantillons industriels dans la métallurgie ou l'industrie des semi-conducteurs.

5. 3. Exemples d'images captées par MET :



En résumé :

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM) permet d'observer la surface d'échantillons biologiques de grande taille à l'échelle nanométrique.

- ❖ A la différence de la MET, le faisceau d'électrons ne traverse pas l'échantillon mais balaye sa surface.
- ❖ Les rayonnements réfléchis produisent un signal transcrit en image visualisable sur un écran.
- ❖ L'image obtenue est en noir et blanc et présente des contrastes permettant une vue de la surface en relief, avec un grand degré de détails (visualisation de bactéries à la surface de la peau ou caractérisation de l'état de surface des cheveux par exemple).

La microscopie électronique à transmission (MET ou TEM) permet d'observer à grande résolution (1 à 2 Å) des échantillons biologiques très minces et contenant des petits constituants tels que les organites cellulaires, etc.

- ❖ Un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons traverse l'échantillon à grande vitesse.
- ❖ L'interaction entre les électrons et l'échantillon produit un rayonnement transcrit en image visualisable sur un écran.

Dr. RIH .A
Maître de Conférences
UDL - SBA

- ❖ L'image optique obtenue est en noir et blanc et présente différents contrastes dépendants de la quantité d'électrons ayant traversé l'échantillon.

Le contraste est une propriété intrinsèque d'une image qui quantifie la différence de luminosité entre les parties claires et sombres d'une image.

6. Préparation de l'échantillon :

Les matériaux appelés à être regardés sous un microscope électronique peuvent nécessiter un traitement afin de produire un échantillon approprié.

6.1. Pour le MEB :

- 1 .Il faut que l'échantillon soit solide, s'il s'agit d'une poudre ; il faut la compacter.
2. Il faut qu'il soit déshydraté.
3. Il faut qu'il soit conducteur, si l'échantillon n'est pas conducteur, il faut le recouvrir par une fine couche conductrice de carbone ou d'or.

Parmi les techniques utiliser pour préparer l'échantillon en vue de son analyse par MEB : la technique de cryodécapage.

6.2. Pour le MET :

Pour être traversés par les électrons, les échantillons doivent être préparés en coupes (ultamicrotome) ne dépassant pas le dixième de micron (la technique de fixation et de coupe des échantillons).

A/ Techniques de préparation des coupes :

Les étapes de ce protocole différent dans la mesure où l'observation se fait sous microscopie photonique ou électronique.

Cette technique nécessite plusieurs démarches ou plusieurs étapes qui sont :

1. Prélèvement
2. Fixation
3. Déshydratation
4. Paraffinage
5. Enrobage (Moulage).
6. Coupe au microtome (Microtomisation)
7. Étalement & collage de coupe
8. Séchage & Déparaffinage
9. Hydratation
10. Coloration
11. Déshydratation
12. Montage
13. L'observation au M. photonique (ou MET).

Dr. RIH .A
Maître de Conférences
UDL - SBA

B/Techniques d'observation des formes et des surfaces cellulaires

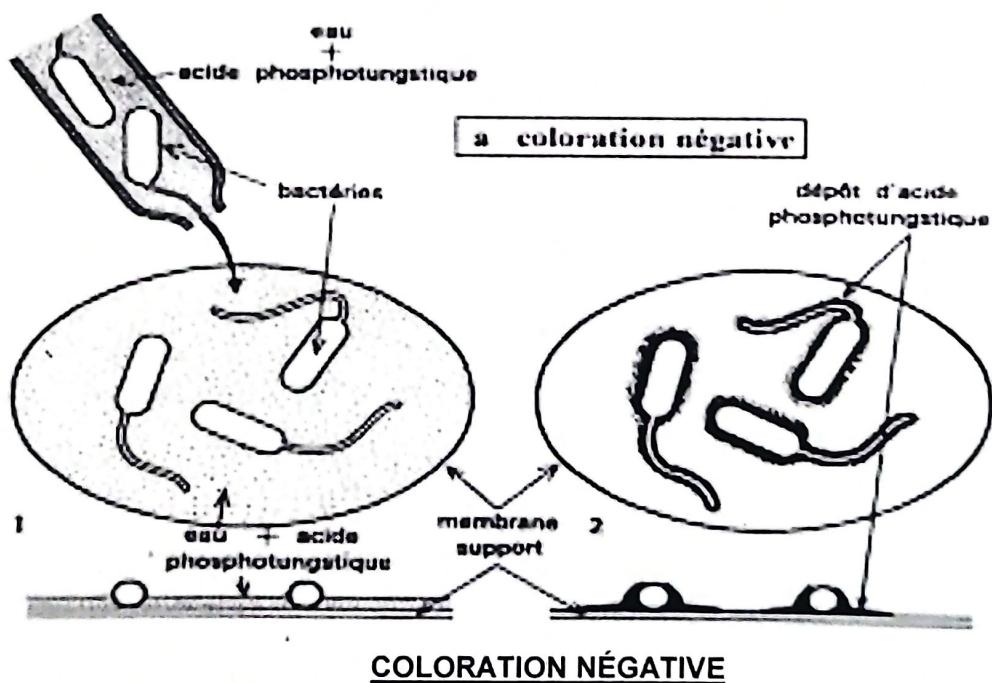
Il existe des échantillons et objets de très petites dimensions, de forme relativement simple (molécules, Virus ou éléments cellulaires isolés : organites ou fragments d'organites) possédant de très fins détails qui ne nécessite pas de coupe en particulier dans le cas de structures fibreuses (protofilaments protéiques, flagelles, queue de certains Virus...).

L'observation de ces derniers au microscope électronique à transmission pose un problème de manque de contraste, auquel nous pouvons pallier en utilisant l'une de ces deux techniques :

1. COLORATION NÉGATIVE

Principe : Consiste à déposer l'objet à étudier sur un support, puis à plonger l'ensemble dans une solution de sel de métal lourd, qui est drainée et les traces de solution qui reste se concentre sur les angles ou sur les bords des objets.

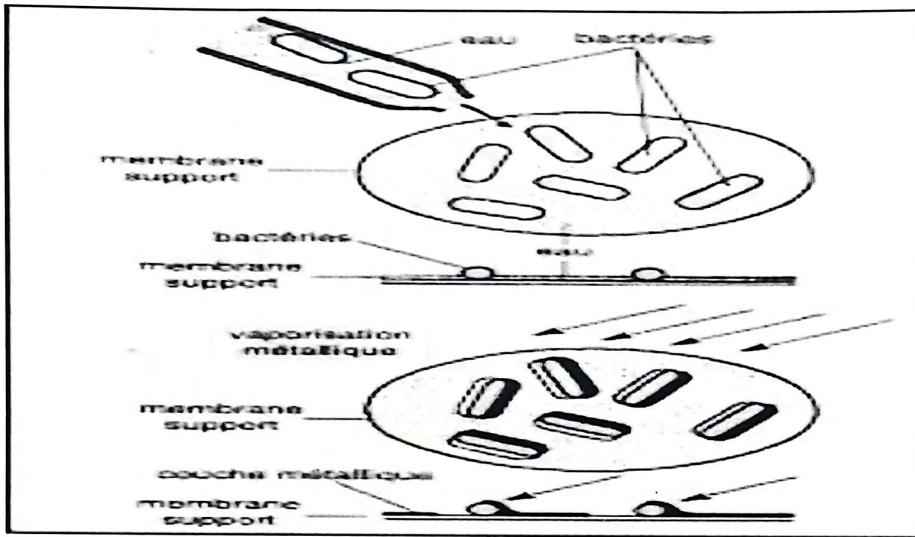
Après évaporation du solvant contenant le «colorant» et accumulation de ce dernier autour des particules ou des cellules déposées sur une membrane-support, on obtient un effet de halo permettant de voir ces particules en négatif, en microscopie électronique.



Dr. RIH A
Maître de Conférences
UDL - SBA

2- OMBRAGE MÉTALLIQUE

Principe : Consiste à déposer l'objet à étudier sur un support, puis à exposer l'ensemble à des vapeurs métalliques (obtenue en vaporisant sous vide une électrode métallique) et ceci sous incidence pour avoir une ombre formée.



OMBRAGE MÉTALLIQUE

- l'astuce qui rend cette méthode intéressante est de placer la source de métaux lourds sur le côté de l'échantillon, avec un léger angle.
Ainsi, le relief de l'échantillon génère des ombres, puisque le métal se dépose principalement sur les surfaces qui font face à la source de métaux lourds, et que les creux en sont protégés .
- Lors de l'observation, les surfaces faisant face à la source des métaux apparaîtront donc plus sombres, et les creux apparaîtront plus clairs: le résultat est un saisissant rendu de la forme (tridimensionnelle) de la molécule, du virus, ou de la bactérie observé. En plus de permettre une meilleure préservation de l'échantillon que le marquage négatif.

Dr. RIH A
Maitre de Conférences
UDL - SBA

Initiation à l'usage du microscope optique

1. Introduction

La capacité visuelle de l'être humain est limitée à 0,2mm, ce qui nécessite l'utilisation d'un microscope pour l'observation des constituants et des organismes biologiques dont les dimensions sont très faibles de l'ordre de Micron (μm).

L'appareil qui permet de grossir l'image et aussi de voir les moindres détails dans la préparation est le MICROSCOPE.

Comme l'indique son étymologie (micro- du grec [*mikros* : petit] et -scope [*skopein* : observer]) évoque la mesure du millimètre, la vision et l'observation par l'œil ; le microscope est un instrument permettant l'observation visuelle de petits objets ou détails d'objets proches de l'observateur, usuellement indiscernables à l'œil nu. Ainsi, à l'instar de la loupe, une des propriétés principales de cet appareil est donc son grossissement, c'est à dire son aptitude à fournir une image agrandie angulairement de l'objet étudié. Cependant, ce paramètre ne suffit pas à lui seul à caractériser les performances du dispositif. Il faut en effet que cette propriété s'applique à tous les détails de l'objet, y compris les plus fins. La seconde propriété clef du microscope est donc son pouvoir de résolution ou pouvoir de séparation. Ce dernier point a de très importantes conséquences pratiques puisqu'il implique de travailler avec des optiques de grande ouverture numérique limitées par la diffraction.

Bien que la microscopie optique soit une science ancienne ayant pris son essor au XVI^{ème} siècle, elle n'en demeure pas moins une technologie de pointe, très utilisée dans de nombreux secteurs de la recherche et de l'industrie, et faisant toujours l'objet de nombreuses améliorations techniques comme, par exemple dans ces dernières années, l'extension du fonctionnement vers l'ultraviolet ou la mise à la disposition des utilisateurs de systèmes conviviaux de microphotographie numérique.

2. Applications

Les microscopes ont des applications en biologie pour observer les cellules et les tissus, en pétrographie (étude des roches), en métallurgie et en métallographie.

3. L'invention du microscope optique

L'invention du microscope est généralement attribuée aux opticiens hollandais Jansen père et fils. Ils auraient construits en 1590, le premier microscope composé de deux lentilles convexes (l'une servant d'objectif grossissant, l'autre d'oculaire).

À la même époque, en 1609, Galilée a construit un *occhiolino*, microscope composé d'une lentille convexe et d'une autre concave.

À noter : le nom de "microscope" a été officiellement créé par Demisiano en 1645.

Cette invention a permis de très nombreuses découvertes, notamment celle de la cellule par Robert Hooke, en 1665.

Dans son traité *Micrographia* (1667), Robert Hooke présenta un microscope à trois lentilles en verre coulé qui présente déjà la forme actuelle, avec une table pour porter l'objet, un système de mise au point et un système d'éclairage à condenseur constitué d'un ballon d'eau et d'une lentille plan convexe.

4. Définition

Le microscope optique ou microscope photonique est un instrument d'optique muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petite dimension et de séparer les détails de cette image afin qu'elle soit observable par l'œil humain ; le but principal de l'appareil est, de faire apparaître, de « résoudre » des détails aussi fins que possible.

Plutôt par conséquent, que de se laisser impressionner plus qu'il ne convient par les valeurs de grossissements atteintes, il devra accorder toute son attention à la qualité des images obtenues et en particulier à leur degrés de netteté et de luminosité, il faut savoir en effet, que si l'on fait croire le grossissement d'un instrument, on constate que le nombre de détails perceptibles commence à augmenter, puis passe par un maximum, puis décroît quand le grossissement devient trop fort. Donc le grossissement n'est pas tout, ce qui est primordial, c'est la qualité de l'image et parmi les facteurs de cette qualité, le « pouvoir résolvant » ou « pouvoir séparateur » de l'appareil, qui présente la possibilité de distinguer les fins détails de l'objet, le grossissement n'intervient que d'une façon secondaire pour présenter convenablement à l'œil cette image.

5. Le pouvoir résolvant ou pouvoir séparateur

Le pouvoir de résolution est la capacité qu'à un instrument d'optique à distinguer deux objets distincts très proche l'un de l'autre. Plus le pouvoir de résolution est élevé, plus la limite de résolution (la distance entre les deux objets) est faible.

La résolution des microscopes optiques ne peut être supérieure à 0,2 micromètre, cette résolution étant limitée par la diffraction de la lumière. Des techniques permettent de s'approcher de cette limite : l'utilisation d'un objectif à immersion (dans l'huile), ou en diminuant la longueur d'onde de la lumière (toutefois limitée au visible).

6. Description du microscope

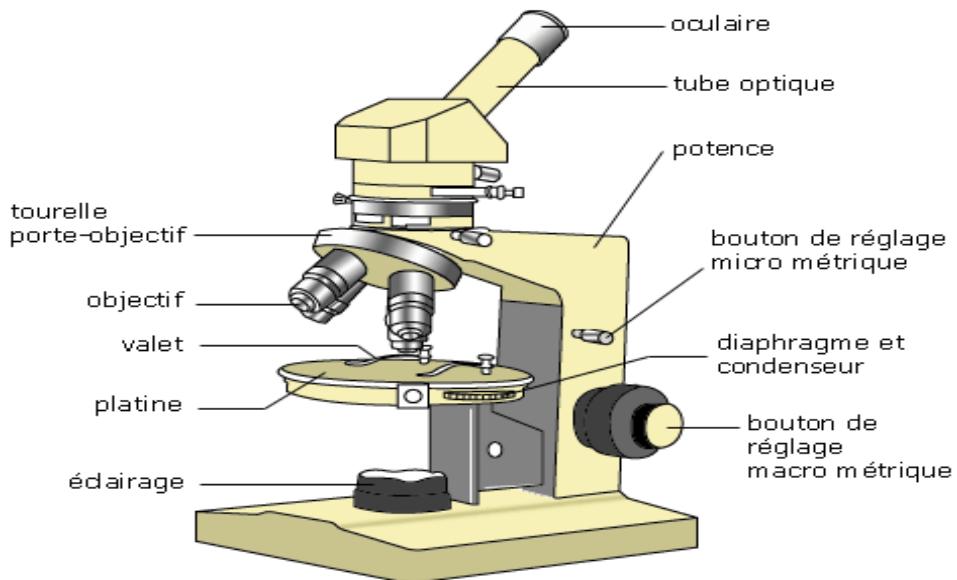


Figure 1. Schéma d'un microscope optique.

Un microscope se compose essentiellement de deux parties :

- **Une partie mécanique**, dénommée statif ou monture,
- **Et une partie optique**, la première servant de support à la seconde.

6.1. La partie mécanique

La partie mécanique des microscopes peut varier d'aspect suivant les modèles réalisés par les constructeurs ; elle est formée :

- **Du pied**, généralement de forme semi-circulaire ou en fer à cheval, destiné à assurer la stabilité de l'appareil. Dressé sur ce pied :
- **La Potence**, formant une sorte de bras plus au moins recourbé, ce bras est souvent articulé avec le pied de façon à pouvoir prendre une position inclinée. C'est par la potence, dans sa région recourbée, qu'il faut saisir l'instrument pour le soulever.

Ce bras porte à sa partie supérieur, le corps ou tube du microscope, et les mécanismes de déplacement de ce tube, et à la partie inférieure, la platine et le miroir.

- **Le corps du microscope**, destinée à porter le système optique, peut se déplacer parallèlement à la potence à l'aide de deux mouvements,

- L'un rapide.
- L'autre lent.

- **Le mouvement rapide**, qui donne une mise au point approximative, une image floue grâce au **vis macro métrique** et,

- **Le mouvement lent**, destiné à parfaire la mise au point est obtenue au moyen d'une **vis micro métrique**.

Le corps du microscope comporte un tube intérieur (ou tube tirage) qui pénètre à frottement doux dans le tube extérieur ; l'allongement du tube a pour but de permettre de corriger l'aberration de sphéricité introduite dans l'image microscopique par l'emploi de lamelles couvre-objets d'épaisseurs variées.

La distance entre l'extrémité supérieure du tube à tirage et l'extrémité inférieure du corps où se vise l'objectif est de 160 mm.

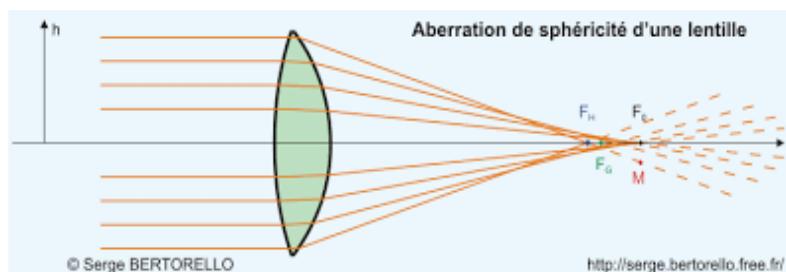


Figure 2. Aberration de sphéricité d'une lentille.

À la base du corps se trouve :

- **Le révolver (tourelle porte-objectifs)**, tournant sur lui-même de façon que l'on puisse amener successivement chaque objectif dans le prolongement du tube.

- **La platine ou chariot**, est une plaque percée d'un orifice sur laquelle on place la préparation à examiner. Elle est suivant les modèles, carrée ou ronde. Elle est accompagnée d'une sur platine mobile à mouvements rectangulaires permettant un déplacement régulier et mesurable des préparations.

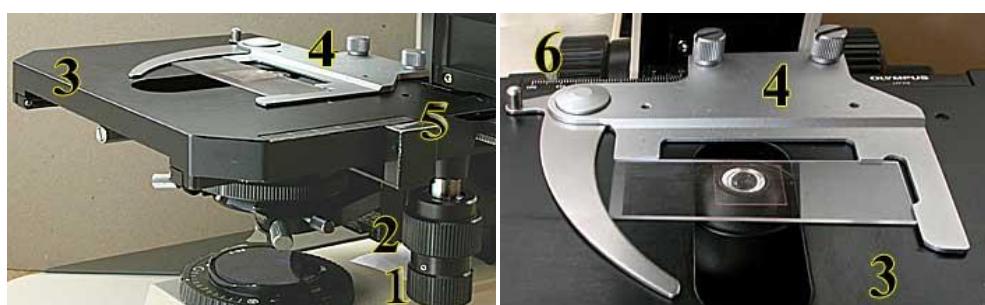


Figure 3. Sur platine.

En dessus se trouve deux pinces métalliques fixes, **les valets**, pour retenir la lame et diminuer les effets de vibration.

N.B : Une préparation microscopique est constituée d'une lame porte objets, d'une lamelle couvre objets ainsi que l'objet de petite taille à observer.



Figure 4. Les valets.

6.2. La partie optique du microscope: est formée par l'association de deux systèmes optiques, représentés par les objectifs et les oculaires.

- **Les objectifs** sont vissés à la partie inférieure du tube ou sur le révolver permettant l'usage successif des objectifs. Ils donnent de l'objet examiné une image agrandie, réelle et renversée.



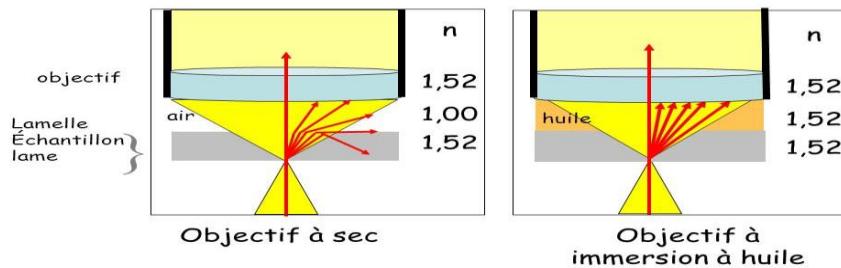
Figure 5. Les objectifs.

Lentille ou ensemble de lentilles réalisant le grossissement, il y a en général plusieurs objectifs, correspondant à plusieurs grossissements.

Il existe deux (02) sortes d'objectifs, caractérisée par leur mode d'emploi :

- **Les objectifs à sec**, se mettent au point directement sans l'interposition d'un milieu ;
- **Les objectifs à immersion**, il est nécessaire d'interposer entre la lentille frontale et la préparation une goutte de liquide d'immersion (huile de cèdre), cette goutte étant destinée à faire dévier et à ramener vers la frontale de l'objectif certains rayons lumineux.
- L'immersion est une technique de microscopie optique permettant d'augmenter le pouvoir résolvant des objectifs en plaçant entre la lentille frontale de l'objectif à immersion et la lamelle couvre-objet, une goutte d'huile à immersion dont l'indice de réfraction ($n=1,518$) est proche de celui du verre ($n= 1,515$).

Réfraction de lumière et microscopie



Les objectifs à immersion



S'il y a faible réfraction, l'objectif capture plus de rayons lumineux

$$\text{ON}_{\max} = (1,52) = 1,4$$

Intérêt des objectifs à immersion, de grande ON

Dr. EL MAHI .F.Z
Maître de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Figure 6. Les objectifs à immersion.

Ces objectifs à immersion, leur puissance ne peut être atteinte qu'en éliminant l'air entre l'échantillon couvert par la lamelle et la frontal de l'objectif. Ces objectifs sont destinés à l'obtention de grossissements très élevés.

- **Les oculaires** sont introduits dans la partie supérieure du tube. Ils jouent le rôle d'une loupe avec laquelle l'œil regarde l'image donnée par l'objectif. L'image obtenue est virtuelle, inversée latéralement.

Une image virtuelle, image construite par les lentilles qui est agrandie et située à environ 25 cm derrière l'extrémité de l'oculaire et dans l'axe de celui-ci.



Figure 7. Les oculaires.

L'oculaire est complémentaire de l'objectif, il agrandit l'image produite au plan focal de l'objectif.

L'oculaire peut être remplacé par un appareil photo, ou dans le cas de la vidéo microscopie d'une caméra vidéo, ceci permet de faire l'observation sur un moniteur vidéo, pour faciliter l'utilisation et le traitement des images (impression, traitement informatique, etc.).



Figure 8. Microscope à appareil photo et caméra.

N.B: L'objectif est la partie proche de l'objet à observer tandis que **l'oculaire** est proche de l'œil.

- **Le condenseur**, est destiné à assurer l'éclairage des préparations pour l'usage des objectifs forts, en réunissant sur l'objet la plus grande partie des rayons lumineux venus de la source d'éclairage (le miroir ou la lampe).



Figure 9. Le condenseur.

- **Le diaphragme**, qui sert à faire varier l'ouverture du faisceau éclairant. Il est constitué de disque tournant percé de trou de différents diamètres. Ce diaphragme est un système d'iris dont le diamètre est modifiable à volonté. Le diaphragme permet de rétrécir le cône lumineux qui frappe la préparation, jusqu'au plus minces possibles.



Figure 10. Le diaphragme.

- **Système d'éclairage** : il se compose d'une source lumineuse (lampe ou miroir).

- **Le miroir** : permet de diriger les rayons lumineux sur l'objet à examiner.
- **La lampe** : source de lumière artificielle de meilleure température, de couleur et de stabilité.

7. Principe du microscope optique

Le microscope optique est un système optique à lentilles dont le but est d'obtenir une image agrandie de l'objet observé.

L'objet à observer est placé devant le premier groupe optique appelé « objectif ». Si l'objet est au-delà de la distance focale, cela forme une image réelle renversée de taille différente ; l'image est plus grande que l'objet si celui-ci est situé à une distance inférieure au double de la distance focale de l'objectif.

Le deuxième groupe optique du côté de l'observateur est l'oculaire : il est positionné de sorte que l'image soit dans son plan focal. Ainsi, l'œil observe une image « à l'infini » (pour un observateur standard), donc en relâchant les muscles chargés de l'accommodation, offrant un meilleur confort visuel.

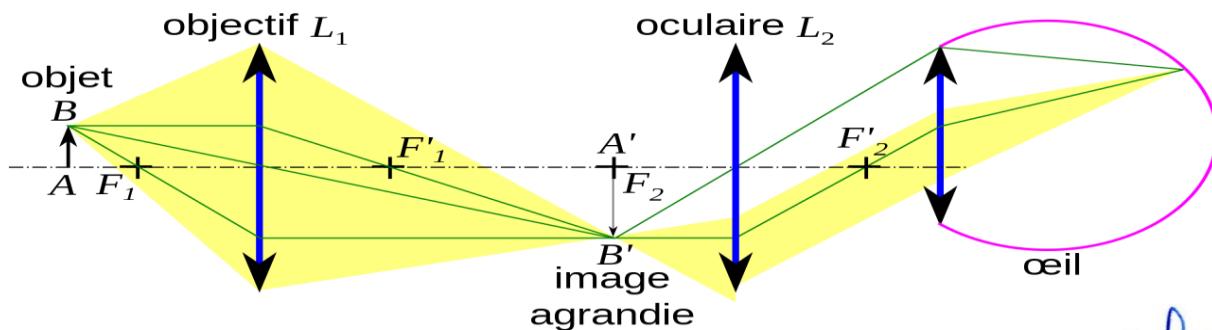


Figure 11. Principe du microscope optique.

AB: objet à étudier représenté par un segment de longueur AB.

L₂, L₃ : respectivement l'objectif et l'oculaire.

F₁: distance focale entre l'objet et l'arrière plan de l'objectif estimée en mm.

F₂: distance focale entre l'arrière plan de l'objectif et l'image estimée en cm (25 cm).

Dr. EL MAHI .F.Z
Maître de Conférences
Acytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

L'objet AB est proche du foyer objet F₁ de l'objectif L₁ :

- **Etape 1** : L'objectif L₁ donne une image A₁B₁ intermédiaire, réelle et renversée de AB, située dans un plan image quelconque de L₁ qui est dans ce cas le plan focal objet de L₂.

- **Etape 2** : A₁B₁ est alors objet pour l'oculaire L₂ et comme il est situé dans son plan focal objet L₂ agit comme une loupe et donne une image A'B' à l'infini qui sera virtuelle, renversée et plus grande que l'objet.

- **Etape 3** : Cette image à l'infini devient objet pour l'œil de l'observateur qui n'accorde pas et l'observe comme au travers d'une loupe, à travers l'oculaire L₂.

8. Le grossissement du microscope optique

Le grossissement étant simplement le grossissement fourni par le microscope, il est obtenu en multipliant les grossissements individuels des différents éléments du microscope. Ceux-ci sont notés sur les éléments optiques. En général, on obtient donc le grossissement en multipliant le grossissement de l'oculaire par le grossissement de l'objectif. Le grossissement est exprimé en dimensions linéaires.



Figure12. Éléments optiques d'un microscope et exemple de calcul d'un grossissement.

B. Cet oculaire indique un grossissement de $\times 10$.

C. Cet objectif indique un grossissement de $\times 2,5$.

Une observation avec cet oculaire et cet objectif se réalise donc à un grossissement de : $\times 25$ ($10 \times 2,5 = 25$).

9. Mise en place de la préparation et mise au point

Pour effectuer des observations au microscope, il est essentiel de procéder systématiquement et de ne négliger aucune étape, et ce à chaque fois que vous observez une nouvelle lame. La procédure pourra vous sembler longue et complexe au début, mais la pratique répétée de ces étapes vous permettra d'obtenir de bons résultats plus rapidement. Les « raccourcis » que vous pensez prendre feront en sorte que vous serez incapables d'obtenir une image nette, ou même une image visible! Les étapes à suivre sont les suivantes :

1) Vérifications préliminaires

1.1-Assurez-vous que l'objectif, l'oculaire et la lame sont bien propres.

1.2-Assurez-vous que l'objectif le plus faible (4X) est bien dans le prolongement du tube optique.

1.3-Assurez-vous que la source lumineuse est allumée (et à une intensité modérée).

2) Installation de la préparation

2.1-À l'aide de la vis macrométrique, abaissez la platine au niveau le plus bas possible, afin de faciliter la mise en place de la préparation.

2.2-Posez la préparation sur la platine, la face portant la lamelle sur le dessus et fixez-la en place à l'aide des valets.

2.3-À l'aide des vis de déplacement du chariot, centrez la préparation sur l'orifice de la platine.

3) Mise au point et ajustements

3.1-Mettez l'œil à l'oculaire et effectuez une première mise au point à l'aide de la vis macrométrique ; tournez la vis à une vitesse modérée pour ne pas « passer tout droit ».

3.2-Effectuez ensuite une mise au point plus fine avec la vis micrométrique ; encore une fois, n'allez pas trop vite!

3.3-La qualité des CONTRASTES de l'image peut être améliorée en modifiant l'intensité lumineuse à la source, la hauteur du condensateur (sur certains microscopes) ainsi que l'ouverture de son diaphragme.

4) Passage à un plus fort grossissement

Notes importantes :

- L'utilisation de l'objectif 100X (produisant un grossissement total de 1000X) requiert des précautions particulières pour éviter de briser l'objectif (et la lame). Dans le cadre de ce cours, nous n'utiliserons pas l'objectif 100X. Prenez bien soin de regarder ce que vous faites lorsque vous changez d'objectif, afin de ne pas changer par erreur pour l'objectif 100X.
- Le passage à un objectif plus puissant doit se faire uniquement une fois que l'image est nette à plus faible grossissement. Donc, avant de changer d'objectif pour un plus puissant, l'image obtenue doit être d'excellente qualité.

Voici maintenant les étapes à suivre lors d'un changement d'objectif (pour passer à un plus fort grossissement) :

4.1-À l'aide des vis de déplacement du chariot, centrez la partie de l'image que vous voulez agrandir. En effet, tout le contour de l'image disparaîtra du champ lors du passage à un plus fort grossissement.

4.2-Tournez le revolver pour bien aligner l'objectif suivant dans l'axe du tube optique (ATTENTION : PAS VERS L'OBJECTIF 100X!).

4.3-Effectuez la mise au point avec la vis micrométrique seulement ; allez-y d'autant plus lentement que le grossissement est fort (il est très facile de « passer tout droit » sur l'image nette, à fort grossissement).

4.4-Ajustez la hauteur du condensateur et l'intensité de la source lumineuse si nécessaire. Il faut souvent augmenter légèrement l'intensité lorsqu'on augmente le grossissement.

5) Calcul du grossissement

Multipliez le grossissement de l'oculaire par celui de l'objectif.

Règles à respecter.

Utiliser une préparation bien contrastée (lame préparée) !

Eclairer convenablement la préparation !

Faire une pré-mise au point l'œil à la hauteur de la platine !

Commencer toujours une observation avec le plus faible grossissement !

Ne pas essayer d'utiliser pour le moment l'objectif à immersion !!

10. Consignes d'utilisation du microscope optique

Le MO est un instrument précis et coûteux, fruit de recherches de nombreux savants au cours des siècles. Il comprend des parties mécaniques d'une très grande précision et des optiques tout aussi fragiles. Il doit être manipulé avec beaucoup de précaution et protégé des chocs, de la poussière et de l'humidité. Il y a donc certaines règles à suivre.

Toujours déplacer doucement le microscope en le tenant par la potence et non par le tube optique ou la platine ce qui pourrait endommager les mécanismes délicats.

La saleté sous toutes ses formes est le pire ennemi du microscope. Un microscope sale reflète un mauvais entretien, pour cela :

- Éviter de toucher les oculaires et autres parties optiques avec les doigts.
- Avant d'utiliser le microscope, nettoyer les parties optiques avec le papier à lentille et le liquide nettoyant.
- Après usage : placer l'objectif 4X dans l'axe optique ; abaisser la platine au maximum ; enlever la dernière préparation observée et éteindre la lumière ; si l'huile à immersion a été utilisée, nettoyer les objectifs 40X et 100X ; débrancher le fil électrique et placer la housse sur le microscope ; ranger le microscope à sa place.

11. Entretien du microscope

- Il est essentiel de préserver le microscope de la poussière et de l'humidité.

- Lorsque le microscope n'est pas en usage, il faut l'enfermer dans sa boîte (son emballage),
- Laisser toujours les oculaires en place pour éviter l'entrée de la poussière dans le tube.

11.1. Avant l'observation

- S'assurer que les objectifs et les oculaires sont bien propres.
- Enlever de temps en temps les poussières et traces graisseuses des oculaires et des objectifs.
- On peut sans inconvénient démonter les oculaires pour en nettoyer l'intérieur mais il ne faut jamais tenter de démonter les objectifs.
- Installer le microscope sur une table solide; faire en sorte qu'étant assis, l'œil arrive normalement à l'oculaire par une inclinaison légère du corps, il est préférable de garder le microscope dans sa position verticale.

11.2. Soins à donner aux préparations

- Avant l'observation, passer un linge propre sur la préparation pour enlever les poussières;
- Au cours des observations, veuillez à ce que la lentille frontale de l'objectif n'entre jamais en contact avec le couvre-objet.

Dr. EL MAHI .F.Z
Maitre de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA



Technique de cryodécapage (Technique des répliques)

La technique de cryodécapage est une méthode utilisée pour la recherche en biologie. Elle permet l'obtention d'une coupe cellulaire formée à partir d'un échantillon congelé. Elle comprend les étapes suivantes :

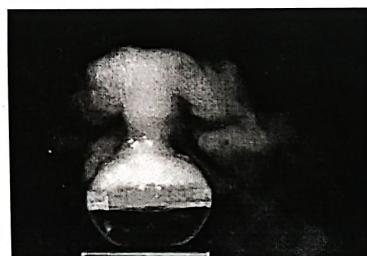
1. La congélation

C'est un processus de fixation très rapide qui assure une bonne conservation de la moindre petite structure cellulaire.

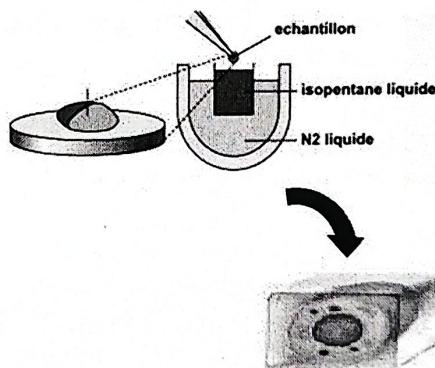
L'objet est congelé à une température de -196 à -200°C dans l'azote liquide par le biais du fréon.

Le fréon :

- Dérivé du méthane obtenu en substituant des atomes d'hydrogène à des atomes de chlore ou de fluor, utilisé en particulier pour la production du froid dans les appareils de réfrigération.
- Le fréon (marque commerciale) est un gaz hydrochlorofluorocarboné ou chlorofluorocarboné (HCFC, CFC).



Azote liquide



Congélation dans l'azote liquide

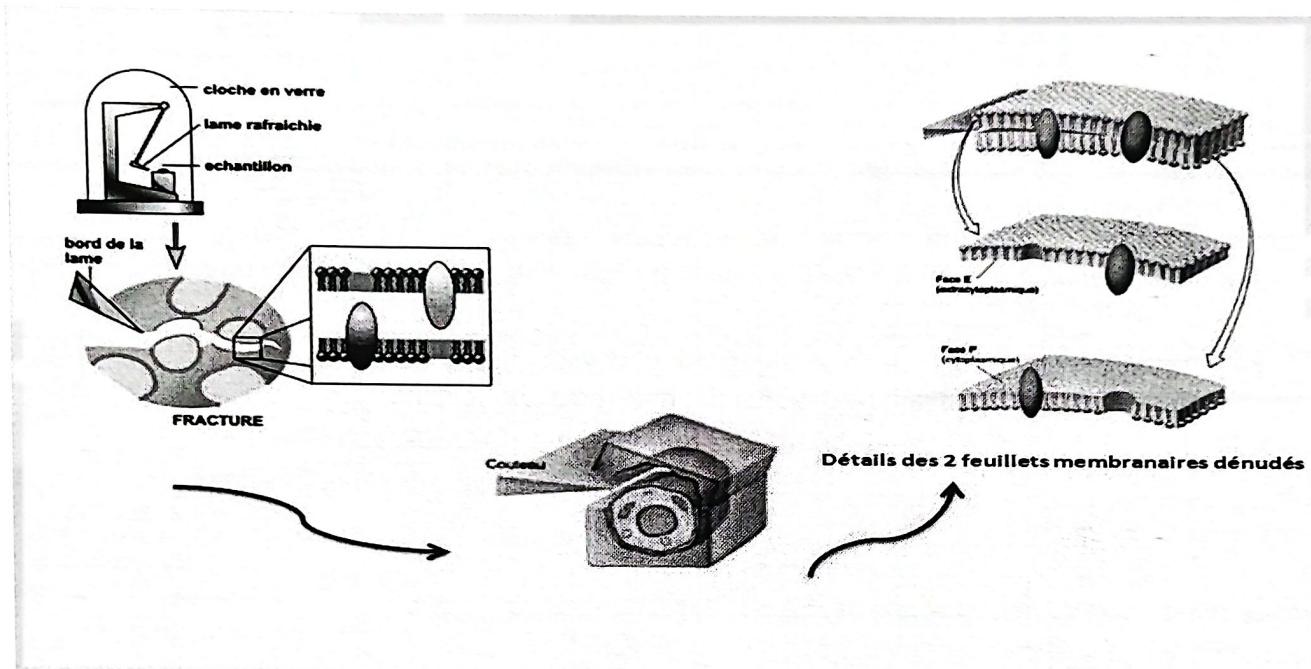
2. Coupe ou cryofracture

Une légère cryofracture décape la surface de l'objet, le couteau est une lame en acier refroidie par l'azote liquide qui permet de réaliser une coupe avec une surface lisse.

La surface mise à nue permet de montrer de multiples structures [membranes, organites et des détails plus fins (composants granulaires de la membrane ...)] qui restent invisibles car elles sont enrobées dans de l'eau congelée.

L'étape cruciale du protocole est la fracture, et non la coupure, de l'échantillon congelé, et ceci à très basse température. Cette cryofracture dégage une surface irrégulière à travers l'échantillon, et c'est cette surface qui sera observée.

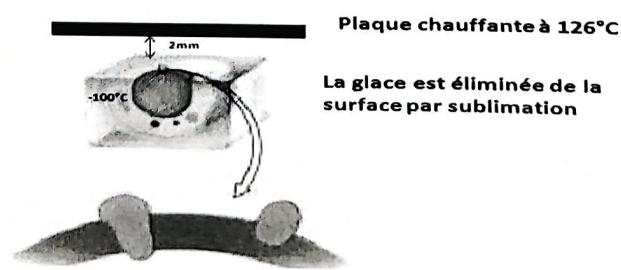
Le plan de fracture passe toujours par les zones de moindre résistance qui sont en générales les espaces inter-membranaire (espace péri nucléaire de l'enveloppe nucléaire) ou bien les régions intra-membranaires qui correspondent aux parties hydrophobes (feuillet clair) de la bicouche lipidique, on obtient dans ce dernier cas une hémi-membrane.



Coupe ou cryofracture

3. Décapage (élimination de la couche de glace)

Pour augmenter le pouvoir de résolution, on provoque une étape de sublimation dans un vide élevé (10^{-6} Barr) en approchant à 2mm environ de la surface de l'échantillon qui est à -100°C une plaque portée elle-même à une température de 126°C qui assure une évaporation de l'eau de la surface de fracture.

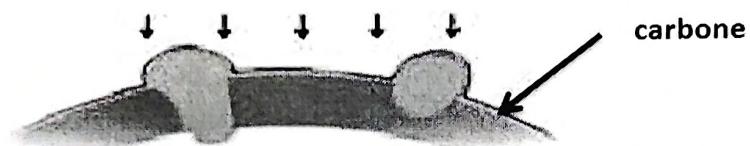


Membrane nucléaire à nu, avec ses protéines et ses particules

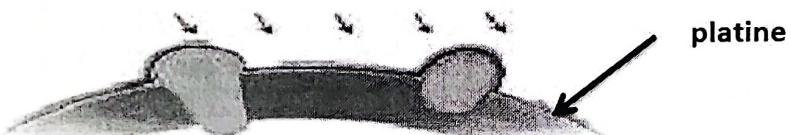
4. L'Ombrage métallique

Il correspond à une première vaporisation verticale d'une mince couche de carbone, c'est la réplique carbonée. Cette dernière est ombrée avec une deuxième vaporisation oblique de platine ce qui fait ressortir les détails superficielles en produisant un effet d'ombre.

On obtient ainsi un moulage de la surface de fracture.



Dépôt d'un film continu de carbone à la surface



Ombrage de la surface par un film de platine

5. Isolement de la réplique

La réplique obtenue est retirée de l'enceinte sous vide par dissolution du support organique en utilisant un acide minéral (soit HCl soit H₂SO₄).

6. Observation de la réplique en ME à balayage

L'image observée de la réplique révèle des reliefs de la surface décapée.

Cette technique est particulièrement utilisée pour l'étude des membranes cellulaires.

Au (MEB), l'observation des répliques obtenues par la technique du cryodécapage montre que la membrane plasmique est formée de deux hémimembranes (demi-membranes), l'une exoplasmique ou externe et l'autre protoplasmique ou interne, dans lesquelles sont insérées des particules globulaires intramembranaires. Ces particules ont une répartition et une densité différente dans les deux hémimembranes, d'où l'asymétrie de la membrane plasmique.

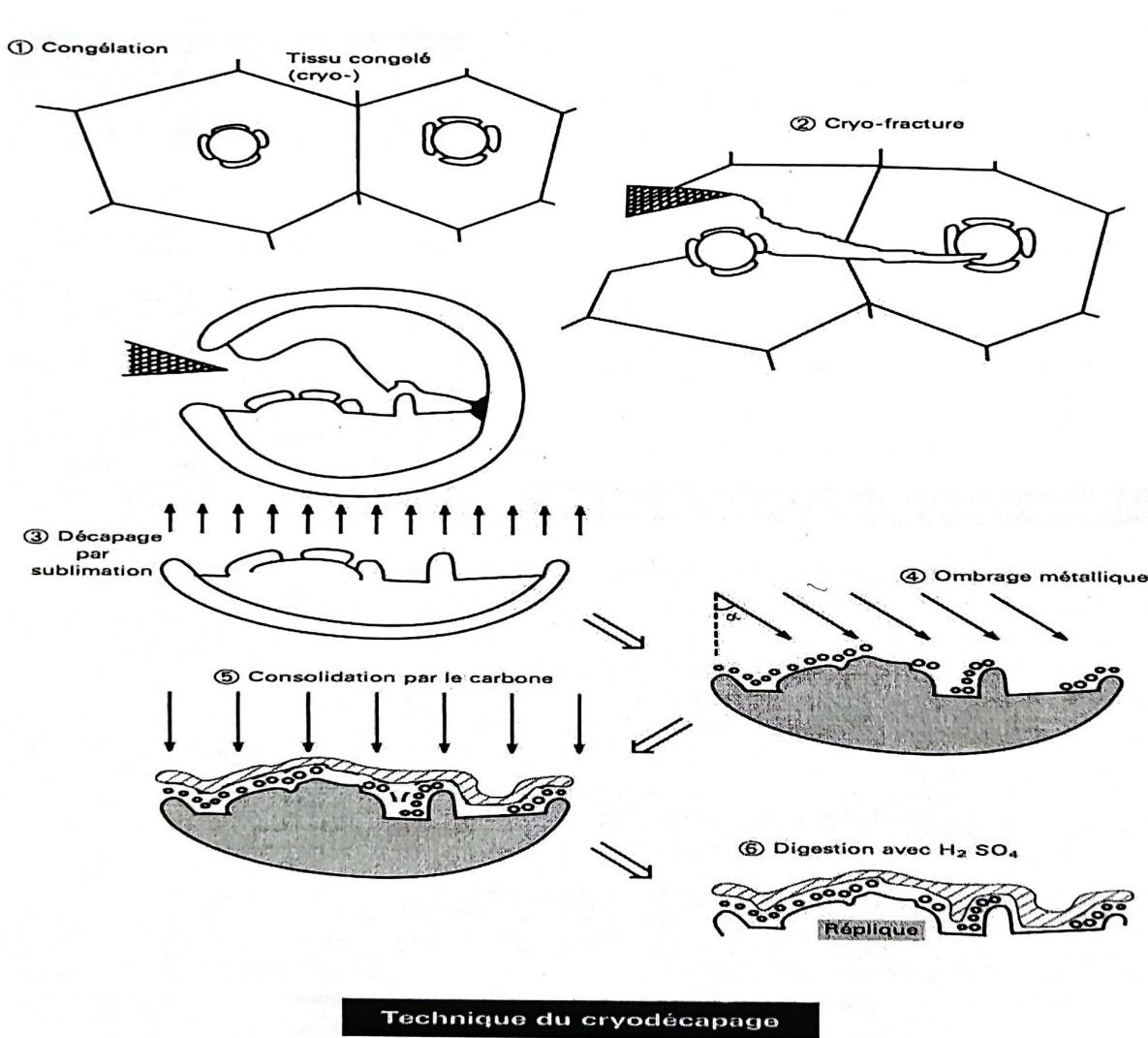
Quel est l'intérêt de cette méthode ?

A la différence de la structure universelle constante de la Membrane Plasmique en MET, l'observation des répliques des MP en cryodécapage montre des structures très variables (selon le type de membrane), soient lisses, soient granuleuses. Même la densité des granules est variable d'une Membrane Plasmique à une autre.

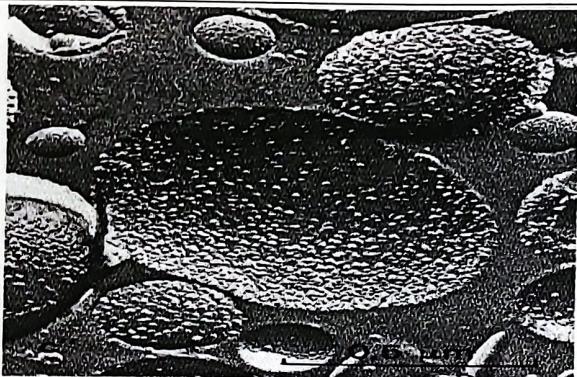
Cette méthode démontre donc une variabilité structurale expliquant la variabilité fonctionnelle connue des membranes.

Observation des membranes plasmiques en cryodécapage

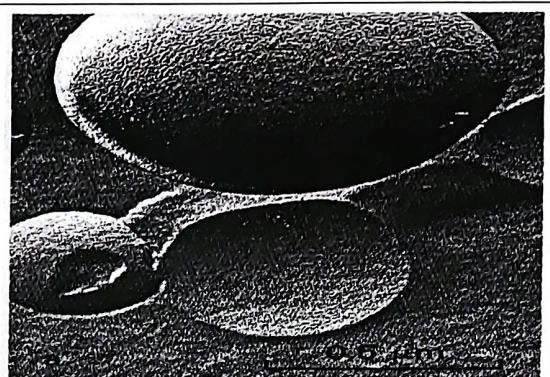
La technique du cryodécapage :



L'observation des répliques des membranes plasmiques en cryodécapage montre des structures très variables, soit lisses, soit granuleuses.

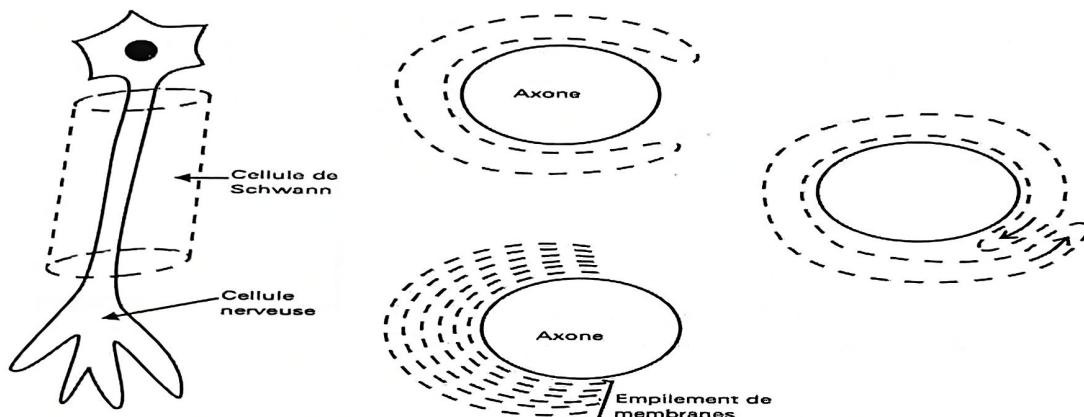


La face granuleuse de l'hémi-feuillet



La face lisse de l'hémi-feuillet

➤ La gaine de myéline, autour des axones, est un « concentré » de lipides membranaires.



Formation de la gaine de myéline

La cellule de Schwann entour l'axone des neurones. On va avoir n couches de membrane plasmiques.

Ce matériel est privilégié quand on veut utiliser les lipides membranaires.

La gaine de myéline en cryodécapage



Dr. RIH . A
Maître de Conférences
UDL - SBA

Les techniques de préparations des coupes pour la microscopie optique et électronique

Pour rendre visible ce que l'on veut observer, il est nécessaire de mettre en œuvre des techniques diverses (préparation des échantillons) que l'on applique au matériel. Pour l'observation en MO ou en ME, les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

I. Pour la MO : fixation au formol, inclusion en paraffine, colorations standard (hématoxylène-éosine ou HES ou trichrome)

Pour qu'un échantillon soit observé au microscope photonique (MO) ou au microscope électronique à transmission (MET), il faut deux conditions :

1. L'épaisseur de l'échantillon.

2. Le contraste.

1. L'épaisseur de l'échantillon

Pour une observation par transmission, l'échantillon doit présenter une faible épaisseur afin de permettre le passage du faisceau incident de photons ou d'électrons.

2. Le contraste

L'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de l'échantillon absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres: c'est l'effet contraste.

En générale, les constituants cellulaires présentent des contrastes naturels faibles; l'utilisation de certains artifices tels que des montages optiques qui amplifient les contrastes naturels ou de colorants sélectifs (cas de Microscope Photonique) ou encore des sels de métaux lourds (Microscope Electronique) est nécessaire.

Lorsque l'objet répond aux impératifs (faible épaisseur & contraste), on peut l'observer en lumière transmise (entre lame & lamelle directement sauf en cas de coloration).

Si non on doit avoir recours à des procédés qui permettent précisément à la confection des coupes.

La plupart des tissus végétaux et animaux sont beaucoup plus opaques (épais & massif) et pour les analyses microscopiques, on doit réaliser des tranches minces, ou coupes.

Celles-ci sont réalisées par des techniques histologiques appelées les Techniques de Fixation et de Coupe des échantillons.

En microscopie photonique ou en MET, on parle de coupes de paraffine (sous-produit du raffinage des huiles de pétrole, utilisée pour la fabrication des bougies).

Dr. EL MAHI .F.Z
Maître de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Qu'est-ce qu'un examen histopathologique ?

L'obtention de coupes minces, transparentes de tissus des organes observables au microscope optique.

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.

Quel est l'intérêt de l'examen histopathologique?

Il permet de faire l'anatomie des organes, de connaître la structure et de comprendre le fonctionnement des tissus pathologiques pour découvrir et définir les anomalies tissulaires.

I.1. Les procédés préparatoires de l'échantillon (MO)

Pour un examen morphologique des cellules ou d'échantillons biologiques (tissus) en microscopie photonique, des procédés préparatoires de l'échantillon sont nécessaires, qui sont comme suite :

- 1) Prélèvement.
- 2) Fixation.
- 3) Déshydratation.
- 4) Paraffinage.
- 5) Enrobage (Moulage).
- 6) Coupe au microtome (Microtomisation).
- 7) Étalement & collage de coupe.
- 8) Séchage & Déparaffinage.
- 9) Hydratation.
- 10) Coloration.
- 11) Déshydratation.
- 12) Montage.
- 13) L'observation au M. photonique (ou MET).



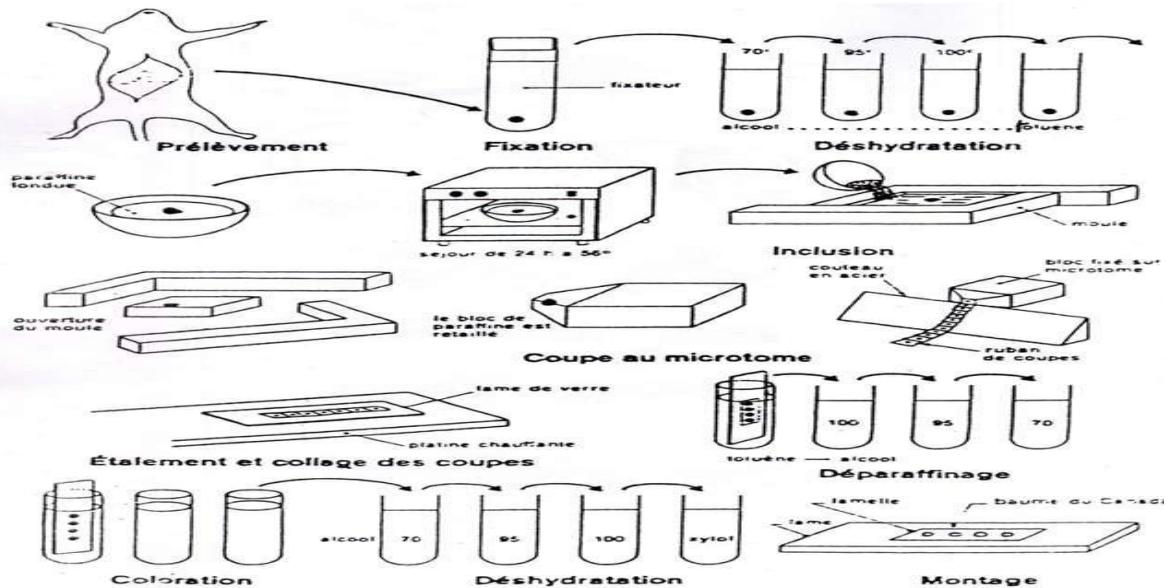


Figure 1. Les procédés préparatoires de l'échantillon.

1/ Prélèvement

C'est le recueil d'un échantillon biologique (un organe, un tissu ou un liquide).

Le prélèvement est réalisé à partir des organes des animaux ou à partir des organes humains.

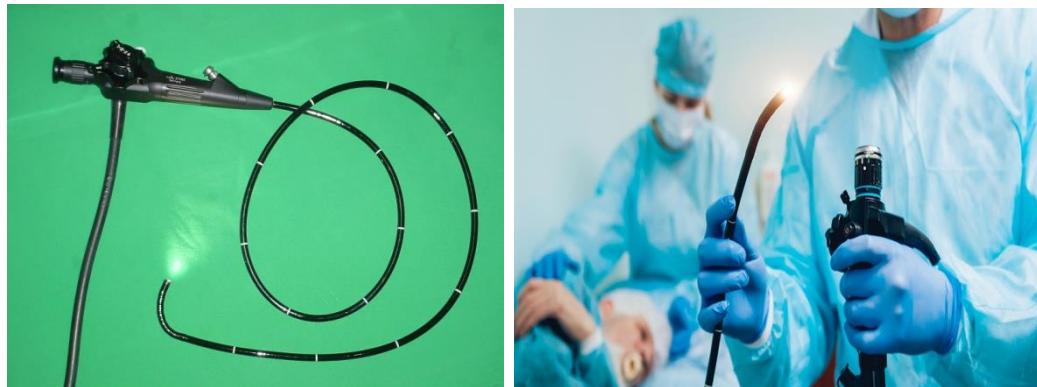
Le prélèvement doit se faire aussi délicatement que possible afin de ne pas dégrader l'organisation tissulaire. Une fois obtenu, ce prélèvement doit immédiatement être immergé dans un grand volume de liquide fixateur.

Les prélèvements adressés à l'anatomopathologiste sont d'origine diverses :

- **Biopsie** (directe comme pour la peau, le muscle ou avec **endoscopie*** pour les organes des appareils respiratoire, digestif et urinaire).



Figure 2. Biopsie cutanée.

**Figure 3. L'endoscopie.**

* L'endoscopie est une méthode d'exploration des organes et des cavités internes de l'organisme. Réalisée au moyen d'un endoscope. L'endoscopie - ou fibroscopie - a une double fonctionnalité : diagnostique et thérapeutique.

- **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.**

**Figure 4. Pièce lobo-isthmectomie droite de la glande thyroïde**

(Thyroïdectomie partielle).

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

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

Dr. EL MAHI .F.Z
Maitre de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Conservation des prélèvements : Tout prélèvement tissulaire soustrait à son milieu ambiant se dessèche rapidement et s'autolyse, ne permettant plus aucune étude microscopique.

Il est possible de ralentir ces altérations par:

- le froid (un abaissement de température +4°C interrompt sans dénaturation les réactions enzymatiques, autorisant une longue conservation du prélèvement);
- la fixation (réalisée grâce à des agents chimiques appelés fixateurs).

2/ Fixation

Il s'agit d'une étape critique qui conditionne le succès de l'étude cytologique. C'est l'action de tuer les cellules et de figer les tissus dans un état plus proche de leur état initial ; le volume du fixateur est 5 à 10 fois plus que celui du prélèvement.

Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol ou le liquide de Bouin (mélange d'eau 5%, acide acétique 10%, formol 25% et d'acide picrique 75%).



Figure 5. La fixation.

- **Durée:**

La durée de la fixation varie selon le volume et la densité des prélèvements:

- Quelques heures pour un petit fragment biopsique (une biopsie au minimum 2 à 5 heures).
- Plusieurs semaines pour un cerveau humain entier.
- Une pièce opératoire 48 heures.

Les prélèvements ayant achevé leur fixation sont déposés dans des cassettes en plastique, directement après l'étape d'examen macroscopique au cours de laquelle sont prélevés des fragments de petite taille.

Quelque soit les fixateur le prélèvent doit être échantillonné et la taille des échantillons adaptée à celle de la cassette d'inclusion.

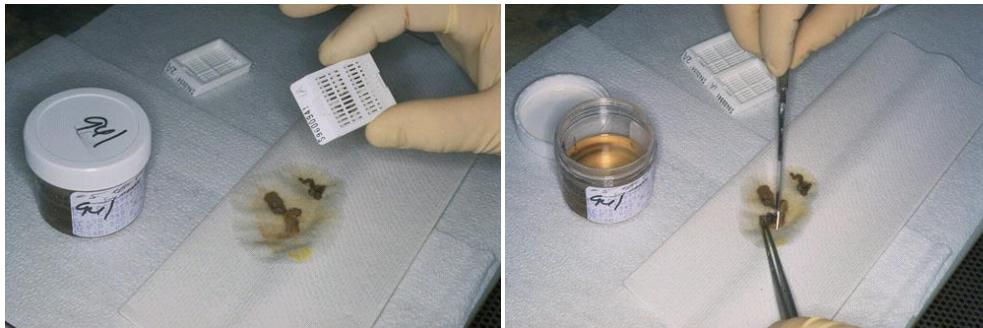


Figure 6. Réalisation d'un petit échantillon tissulaire ensuite placé dans une cassette.

(Photos prises au service d'anatomie pathologique CHU de Sidi Bel Abbés)

3/ Déshydratation et paraffinage

Elle a pour but d'éliminer l'eau de l'échantillon (intracellulaire) et de la remplacer par la paraffine (un mélange d'hydrocarbures saturés et de cires ; chimiquement neutre, soluble dans les solvants et facile à couper au rasoir). La paraffine n'étant pas miscible à l'eau, les pièces fixées devront être déshydratées avant l'inclusion dans la paraffine. Cette dernière n'est non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; on procède donc à une double substitution :

- On remplace l'eau par de l'alcool (déshydratation), par passage dans des bains d'alcools à degrés croissants ($70^\circ \rightarrow 90^\circ \rightarrow 100^\circ$),
- On remplace l'alcool par le toluène (substitution).

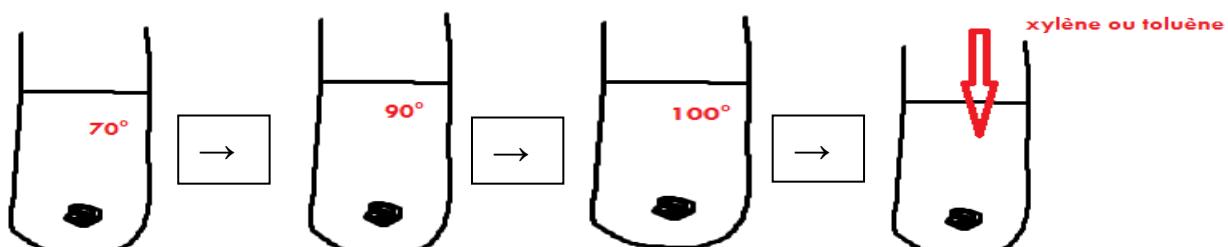


Dr. EL MAHI .F.Z
Maitre de Conférences
de Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Figure 7. Automate de déshydratation (Leica).

(Photo prise au service d'Anatomie Pathologique, CHU de SBA).

- Un dernier bain est réalisé dans un solvant organique du milieu d'inclusion (xylène ou toluène).



3 bains d'alcool de degrés croissants.

Bain de xylène ou toluène.

Figure 8. La déshydratation.

- Le prélèvement est ensuite placé dans des bains de paraffine fondue (2 à 3 bains successifs pendant 4H à 56° C dans une étuve), qui infiltre alors tout le prélèvement.
- Cette étape favorise le durcissement des échantillons, en remplaçant le milieu intracellulaire aqueux par un milieu solide.



Figure 9. Appareil de l'enrobage (Leica).



Figure 10. Séjour dans l'étuve: 24h à 56°C.

(Photo prise au service d'Anatomie Pathologique, CHU de SBA).

N.B.: Parfois on trouve les deux étapes précédentes en une seule étape appelée Technique d'inclusion (déshydratation + paraffinage), automatisée dans des appareils à inclusion, qui dure 16 heures et 20 min, durant laquelle les cassettes vont être plongées successivement dans 12 bains.

L'imprégnation par la paraffine se fait à une température de 56 °C (qui est le point de fusion de la paraffine).

5/ Enrobage (moulage)

C'est de mettre le prélèvement dans un moule et l'enrober de paraffine pour obtenir un bloc solide contenant le fragment tissulaire à l'intérieur afin de faciliter la coupe.



Dr. EL MAHI .F.Z
Maitre de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Figure 11. Le paraffinage, moulage et inclusion.

L'échantillon tissulaire est placé ensuite sur une plaque réfrigérée, la paraffine se solidifie, et on obtient un bloc.



Figure 12. Obtention d'un bloc (démoulage).

Les blocs obtenus sont retaillés sous forme de pyramide, puis fixées sur un porte-objet pour passer aux coupes (les coupes sont effectuées à l'aide d'un microtome),



Figure 13. L'emplacement du bloc sur le porte objet du microtome.

6/ Coupe au microtome

Les coupes du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) reliées entre elle sous forme de ruban. Les coupes ainsi obtenues ont une épaisseur moyenne de 2 à 5 microns.



**Figure 14. Confection de coupes ultraminces ou ultrafines
Ruban de coupes séries.**

7/ Étalement et collage des coupes

- **Étalement :** Les coupes sont déposées à la surface d'un bain-marie dont la température est portée à une valeur sensiblement inférieure à celle de la fusion de la paraffine, et recueillies sur des lames en verre autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement.
- **Collage :** s'effectue en plaçant les lames sur une plaque chauffante à 40°C pd 15 min. Ces lames sont préalablement recouvertes d'albumine bovine ou de polylysine afin de favoriser l'adhérence du tissu à la lame. Les lames porte-objet sont identifiées individuellement par une inscription gravée ou écrite du côté des coupes.



Figure 15. Étalement et collage des coupes.

8/Séchage – Déparaffinage

- Les lames sont mises à égoutter puis sécher dans une étuve à 30°C pendant 2 heures.



Figure 16. Le séchage des lames.

- L'imprégnation des coupes par la paraffine ne permet pas la diffusion des colorants utilisés comme agent de contraste. Pour cela, on met les lames comportant l'échantillon sur une plaque chauffante à 60° pendant 15 minutes afin d'éliminer la paraffine.

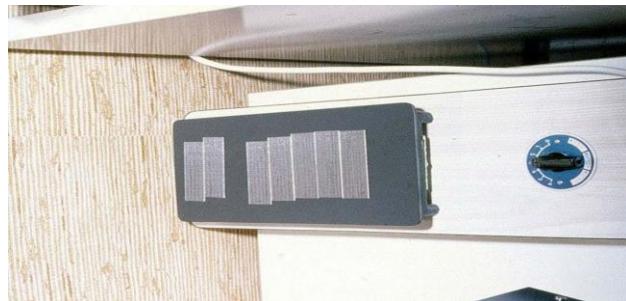


Figure 17. Déparaffinage.

9/ Réhydratation

- Puisque les colorants sont habituellement employés en solutions aqueuses, l'échantillon doit être hydraté, en suivant un trajet inverse de celui de la déshydratation.
- Les coupes collées sur la lame de verre sont déparaffinées à l'aide d'un solvant organique et ramenées à l'eau par des bains d'alcools de concentrations décroissantes.

2 bains d'un solvant de la paraffine.

2 bains d'alcool (100°).

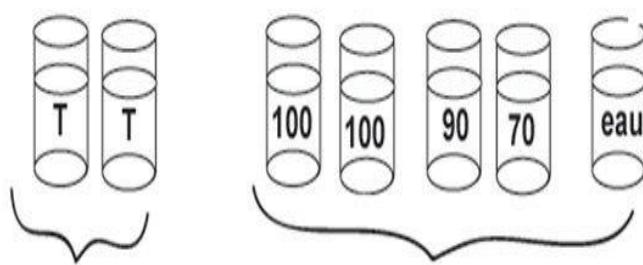
1 bain d'alcool (95°).

1 bain d'eau distillée.

- Cela permet de les colorer.

Dr. EL MAHI .F.Z
Maitre de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Préparer les lames avant coloration



DEPARAFFINAGE

REHYDRATATION



Figure 18. Déparaffinage et réhydratation des coupes.

Figure 19. Séchage des lames.

10/ Coloration

Réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation (membrane, cytoplasme, noyau,...). Comme 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 plus fréquemment utilisées associent deux ou trois colorants différents :

Ex 1 : l'Hématoxyline-Eosine (H.E.) associe l'hématine qui colore les noyaux en violet et l'éosine qui colore les cytoplasmes en rose ; les colorations trichromiques usuelles sont l'Hématine-Eosine-Safran (H.E.S.) par ajout de safran colorant en jaune les fibres de collagène, et le trichrome de Masson qui associe un colorant nucléaire (hématoxyline), un colorant cytoplasmique et un colorant bleu ou vert colorant les fibres de collagène.

Ex 2 : coloration Bleu Alcian ou du Rouge Mucicarmin : Le mucus présent dans certains tissus peut être coloré par la révélation des mucopolysaccharides acides respectivement en bleu ou en rouge.

Ex 3 : coloration à l'acide périodique de Schiff (PAS) met en évidence les glucides par un colorant rouge à pourpre. Permettant de mieux visualiser le glycogène ou les mucines contenus dans certaines cellules ou encore les lames basales des épithéliums qui sont riches en glycoprotéines.

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

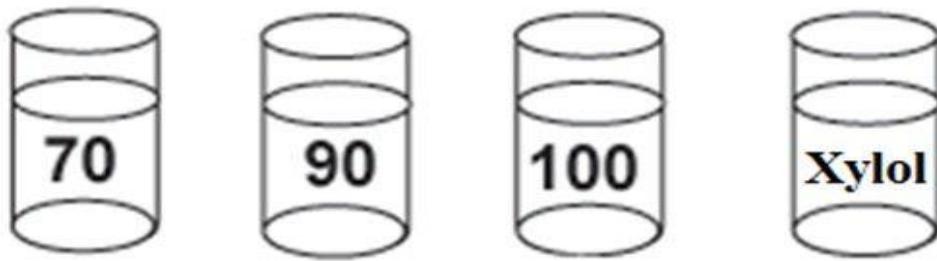


Figure 20. Automate de coloration (Leica).

(Photo prise au service d'Anatomie Pathologique, CHU de SBA).

11/ Déshydratation

L'échantillon est déshydraté par passage dans une série de bains d'alcools de degrés croissants et un bain de toluène/xylol.



DESHYDRATATION

Figure 21. La déshydratation.

12/ Montage

Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle (pour protéger définitivement les préparations) avec une résine synthétique « le Baume de Canada » dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre.

On dispose alors d'une « préparation microscopique » (simplement appelée « lame » dans le langage courant) prête à être observée au MO.

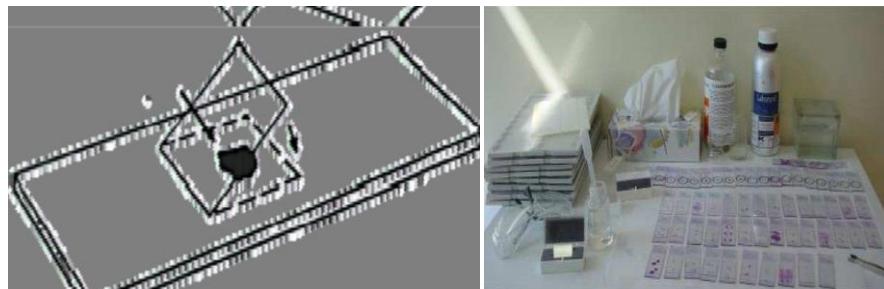


Figure 22. Le montage.



Dr. EL MAHI .F.Z
Maitre de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Figure 23. Le baume de Canada (résine végétale naturelle).

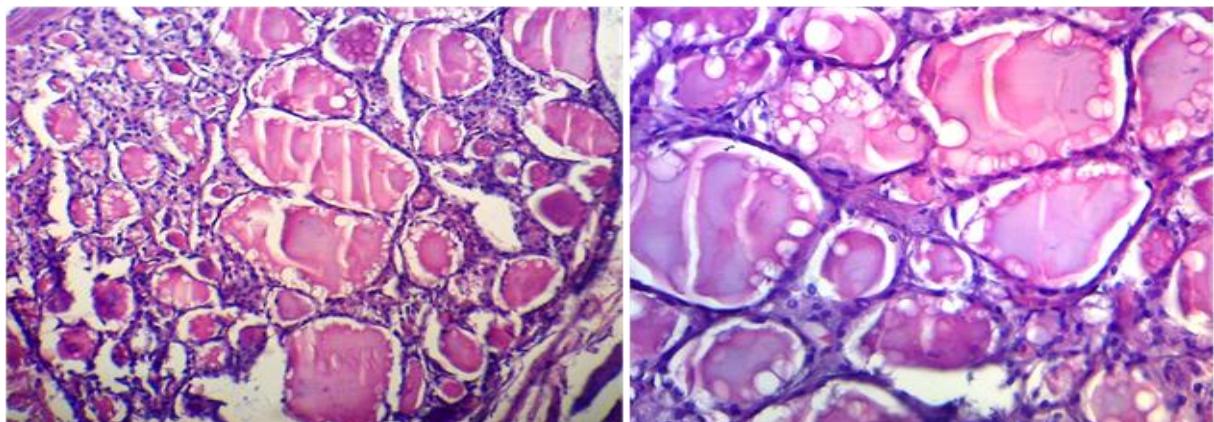
13/ Observation microscopique (Acquisitions et analyses d'images)

C'est avec la lame histologique que l'on peut observer, exploiter, étudier, diagnostiquer et analyser l'échantillon à travers ses coupes, à l'aide du microscope optique. . On peut réaliser des images du tissu, on intégrant au microscope optique, un appareil photo commandé par un ordinateur.

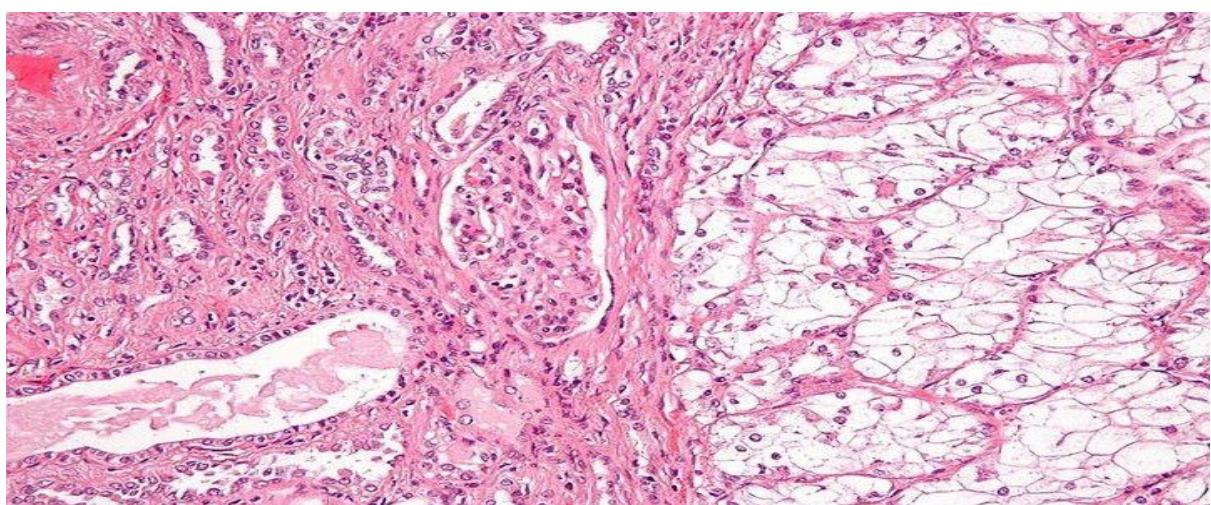


Figure 24. Observation microscopique des coupes.

13/ Exemples de résultats



Plaque 1: Observation microscopique illustrant un goître nodulaire droit d'un patient opéré pour un nodule thyroïdien en utilisant le colorant de l'hématoxylène éosine.



Plaque 2 : Aspect histologique typique d'un carcinome rénal à cellules claires (à droite de la plaque); le rein non tumoral (à gauche de l'image) observé en microscopie optique au grossissement (x 100) après coloration à l'hématoxylène-éosine.

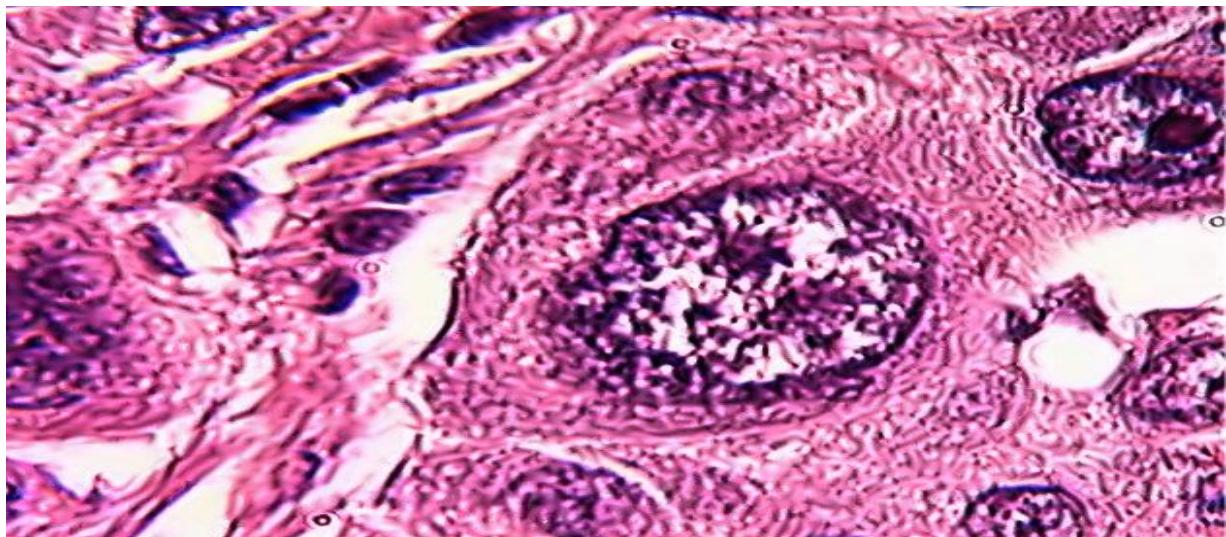


Planche 3. Cellule cancéreuse agrandie.

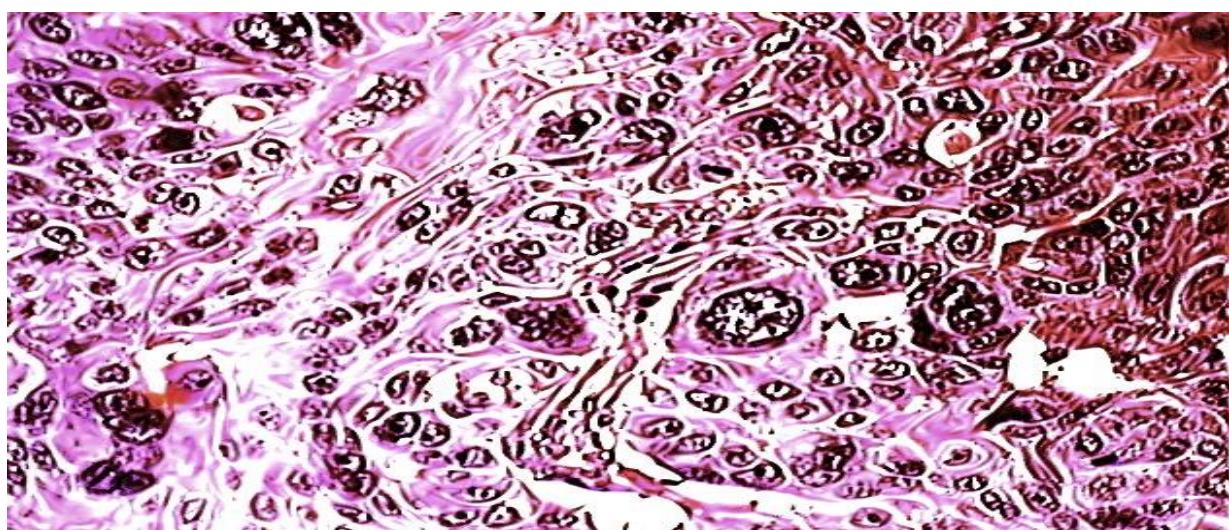


Planche 4. Cancer du poumon (Tabac).

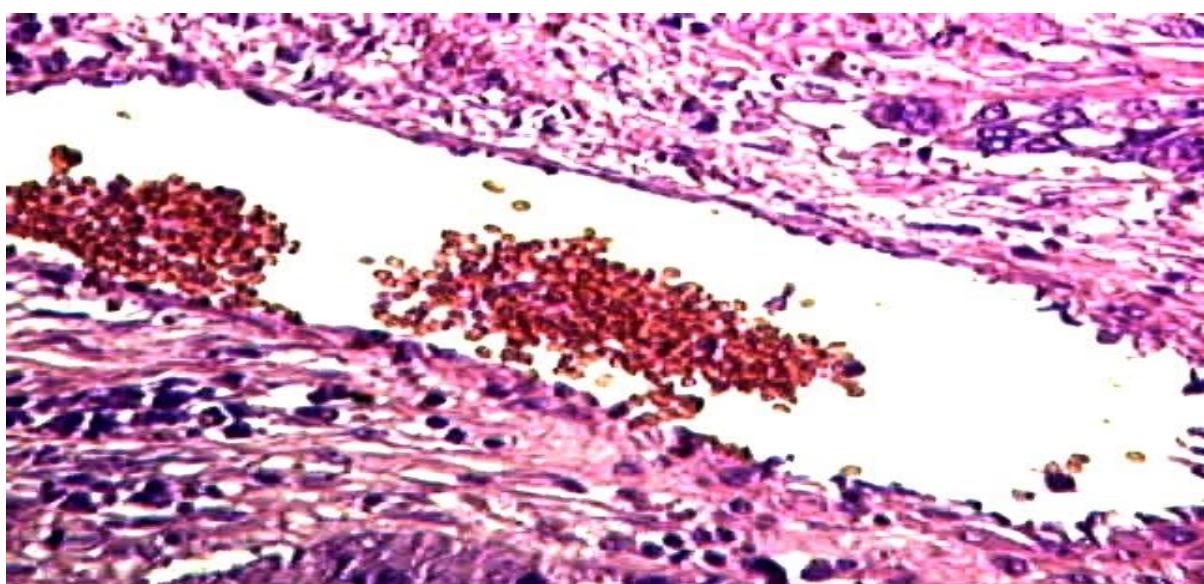


Planche 5. Capillaire dans une tumeur du poumon

Dr. EL MAHI .F.Z
Maitre de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

II. Pour la ME : fixation à la glutaraldéhyde, postfixation à l'acide osmique, inclusion en épon, contraste par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb

II.1. La préparation des coupes ultrafine (Observation au MET)

La technique dite « standard » de ME est analogue dans ses principes à celle de MO, mais les modalités précises diffèrent.

Les cellules doivent être coupées en tranches très fines (50 à 100 nm) pour permettre aux électrons de les traverser.

Pour cela :

- Les cellules sont tuées par des fixateurs (glutaraldéhyde, tétr oxyde d'osmium) qui préservent les structures cellulaires.
- Les échantillons fixés sont lavés dans l'eau, puis déshydratés dans les alcools et dans l'oxyde de propylène.
- Les échantillons sont inclus dans une résine synthétique type Epon ou Araldite.
- 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.
- Les coupes cellulaires sont recueillies sur une grille en cuivre. La grille est trempée dans une solution de métaux lourds (uranium, plomb) pour noircir les structures cellulaires et augmenter le contraste. La grille est ensuite introduite dans le MET pour l'observation.
- Le contraste des coupes s'effectue habituellement avec de l'acétate d'uranyle (contrastant les nucléoprotéines : noyau, nucléole, ribosomes) et des sels de plomb comme le citrate de plomb (contrastant les membranes).

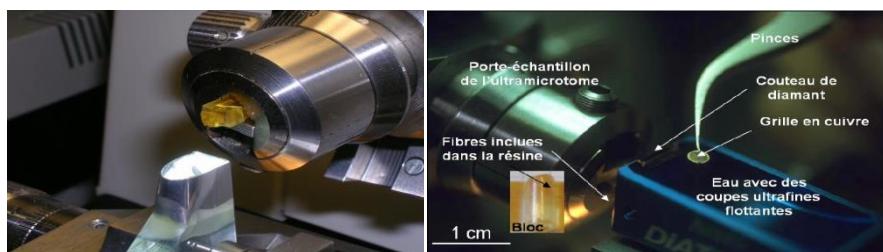
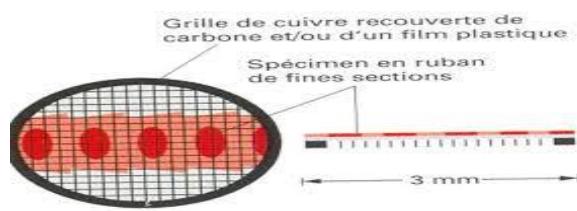


Figure 25. L'ultramicrotome.



Dr. EL MAHI .F.Z
Maître de Conférences
en Cytologie
Fac de Médecine-UDL-SBA

Figure 26. La grille en cuivre.

N.B: Un **ultra microtome** est un appareil de très grande précision qui permet des coupes de **60 à 100 nm**, servant en **microscopie électronique**.