

Techniques Histochimiques en Microscopie électronique

1- Considérations générales

Les contraintes de fixation doivent respecter les caractéristiques physico-chimiques des fluides cellulaires afin d'éviter les mouvements d'ions et d'eau. Une modification de la structure cellulaire est la conséquence de déplacements d'eau et d'ions.

Les paramètres physico-chimiques à prendre en compte sont l'osmolarité, le pH et la concentration ionique.

Les fixateurs pour la microscopie électronique sont des mélanges osmotiquement et ioniquement équilibrés.

Le fixateur doit pénétrer rapidement et les échantillons doivent être petits pour éviter un défaut de fixation au centre de l'échantillon. Si ce n'est pas le cas, le risque est que seule la périphérie de l'échantillon soit correctement fixée, mais l'observation du centre de l'échantillon ne sera pas bonne.

1-1 Osmolarité

Une cellule vivante est semi-perméable, elle est en équilibre osmotique avec le milieu extracellulaire. La plupart des fixatifs n'évitent pas la semi-perméabilité. Seul le tétroxyde d'osmium empêche la semi-perméabilité.

Les fixatifs et la solution de rinçage doivent donc être préparés avec une solution d'équilibre osmotique avant l'utilisation de tétroxyde d'osmium, également appelé acide osmique. Après l'action du tétroxyde d'osmium, les tissus peuvent être soumis à toutes sortes de solvants, même organiques.

1-2 Le pH

Une variation de pH a plusieurs répercussions sur les protéines. Les variations peuvent affecter la conformation, la polymérisation et même provoquer la

dissolution et la libération d'acides aminés. Donc, des variations structurales peuvent être observées

Pour l'équilibre du pH, plusieurs tampons peuvent être utilisés. Ces tampons sont des mélanges de sels basiques et acides. Ils doivent être solubles dans l'eau mais pas dans d'autres solvants. Ils ne doivent pas être toxiques, avec une grande capacité. Le pH des tampons est généralement compris entre 5 et 8.

Plusieurs tampons minéraux sont disponibles. Nous ne donnons ici que les plus employés:

- ✓ **Tampon de Sörensen** - Ce sont les tampons les plus anciens utilisés en microscopie électronique. Leur pH est compris entre 5,0 et 7,6. Leur préparation est facile mais la dissolution du sel est difficile et une cristallisation peut se produire.
- ✓ **Le cacodylate de sodium** - Le cacodylate de sodium ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) est un tampon de grande capacité. Les sels d'arsenic étant toxiques, les membranes intracellulaires peuvent être gonflées. L'inflation des membranes peut être utile pour souligner la visualisation de certains types de cellules. Le tampon cacodylate de sodium est souvent choisi pour l'observation des lymphocytes et autres cellules sanguines, au moyen de la microscopie électronique.

1-3 Composition ionique

La composition ionique doit être équivalente à celle du plasma. Sa détermination est empirique. Pour obtenir les meilleurs résultats, utilisez une pression osmotique douce avec une forte concentration ionique comparable à celle du plasma.

2- Les fixatifs utilisés en microscopie électronique

- **Le permanganate de potassium** - KMnO_4 a certainement été l'un des premiers fixateurs utilisés en microscopie électronique. Le contraste était bon, mais les tissus n'étaient pas très bien fixés.

- **Aldéhydes** - Les deux principaux fixateurs utilisés en microscopie électronique sont le formaldéhyde et le glutaraldéhyde. Évitez le glutaraldéhyde pour l'immunocytochimie. Fixer de petits fragments (environ 3 mm³). Le glutaraldéhyde réagit avec les groupes –NH₂. Il pénètre lentement. Il réagit essentiellement avec les protéines globulaires et fibrillaires, les histones et les acides nucléiques. Il réagit très peu avec les glucides et non avec les lipides.
- **Tétroxyde d'osmium** - Le tétr oxyde d'osmium, également appelé acide osmique, est fortement lié à des molécules organiques. C'est un bon fixateur. Il pénètre et réagit lentement. Il est généralement utilisé comme postfixatif après fixation avec des aldéhydes. OsO₄ réagit avec les lipides non saturés et le glycogène. Il ne réagit pas très bien avec les protéines ou les acides nucléiques. Fixer de petits fragments (environ 3 mm³). Le tétr oxyde d'osmium est utilisé comme fixateur et molécule de coloration.

3- techniques de coloration

3-1 Contraste standard avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb

En microscopie électronique, le contraste ou la coloration est effectué avec des éléments densément électroniques. Certaines méthodes de coloration permettent de visualiser toutes les structures. Les techniques cytochimiques donnent une coloration spécifique pour des molécules précises.

Résultats: les composants cellulaires sont colorés. Cette méthode standard donne de bons résultats pour apprécier la structure générale et l'ultrastructure des tissus.

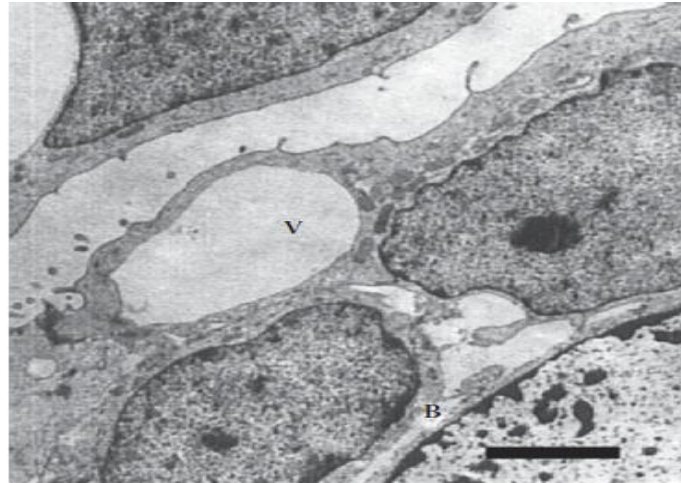


Figure 1 : Contraste standard avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb

3-2 Visualisation de l'appareil de Golgi avec le tétr oxyde d'osmium

Fixateur - Le tétr oxyde d'osmium est à la fois un fixateur et un colorant utilisé pour visualiser les tissus. La réaction se fait sur des blocs.

Résultats: les complexes de Golgi sont denses en électrons.

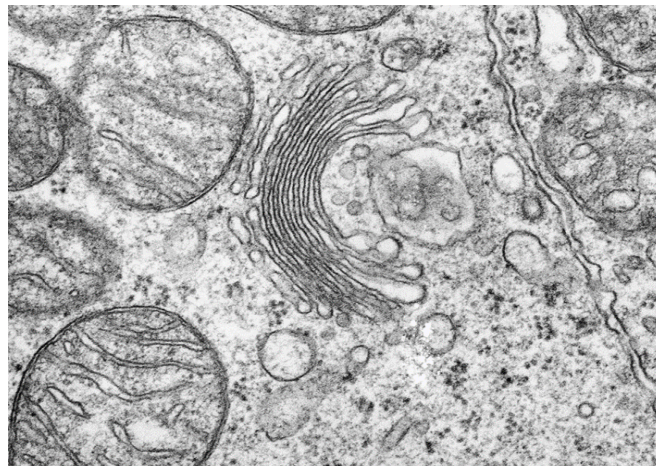


Figure2 : appareil de golgi en ME

3-3 Visualisation des synapses avec de l'iodure de bismuth

Fixateur - Fixation au glutaraldéhyde à 6,5% dans un tampon pH 7,4. La coloration est faite sur des blocs.

Résultats — Les synapses sont visualisées avec la densité électronique.

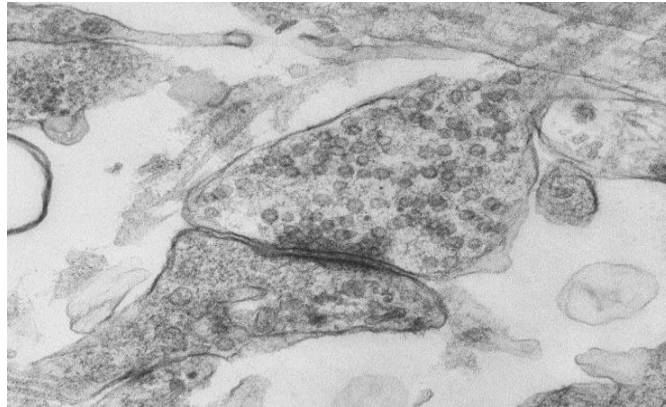


Figure3 : Synapse en ME

3-4 La Coloration négative

La coloration négative est une technique très utile en microscopie électronique, elle permet de caractériser la morphologie des particules isolées comme les bactéries, virus, protéines, nanoparticules, liposomes, exosomes, etc. Elle est réalisée à l'aide du phosphotungstène

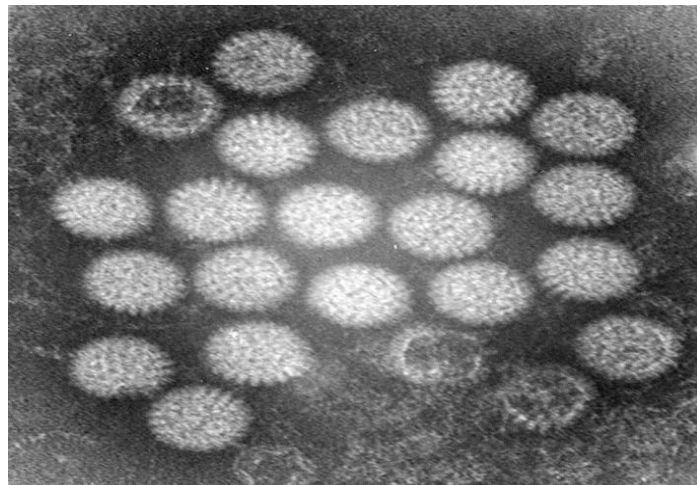


Figure4 : Des virus en coloration négative

3-5 Visualisation des mucopolysaccharides

Fixateur - Les blocs doivent être fixés avec du glutaraldéhyde ou du glutaraldéhyde-paraformaldéhyde. Ensuite, ils sont postfixés avec du tétroxyde

d'osmium, incorporés dans de la cire, et une section est obtenue après c

Résultats — Cette méthode peut être utilisée pour visualiser le mucopolysaccharide acide et l'acide sialique. Les mucopolysaccharides acides et l'acide sialique sont électrons denses.

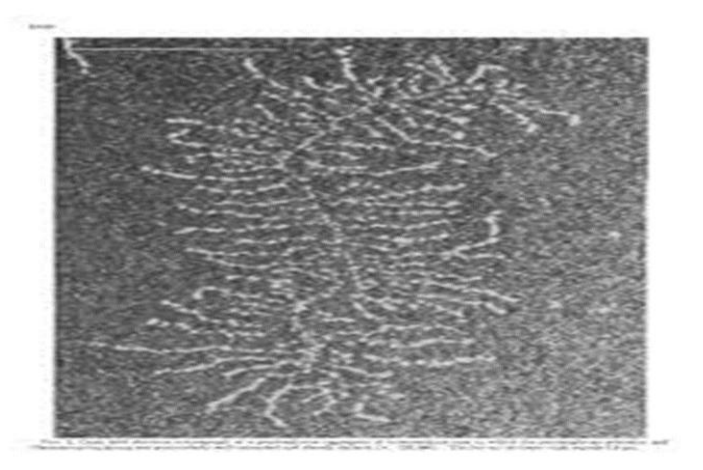


Figure5 : mucopolysaccharide

3-6 Visualisation du glycogène par acide périodique - Thiocarbohydrazide (TCH) - Protéinate d'argent

Fixateur - Des fixatifs classiques peuvent être utilisés. La coloration se fait directement sur les sections libres. Utilisez des sections flottantes. La manipulation est délicate.

Résultats - Les mucopolysaccharides, les glycoprotéines et le glycogène sont électro-denses en fonction de la durée d'incubation dans le TCH.

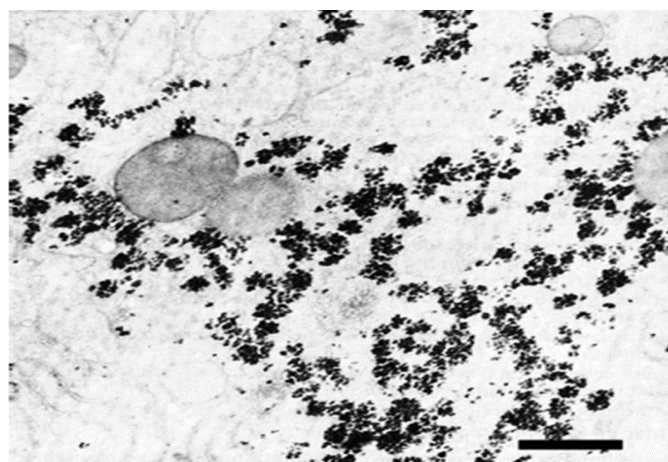


Figure6 : le glycogène en ME

3-7 Visualisation des protéines et de collagène

➤ Méthode de l'acide phosphotungstique

Fixatif - Des fixatifs classiques peuvent être utilisés. La coloration est effectuée lors de la déshydratation du bloc de tissu.

Résultats : les protéines et le collagène sont denses aux électrons.

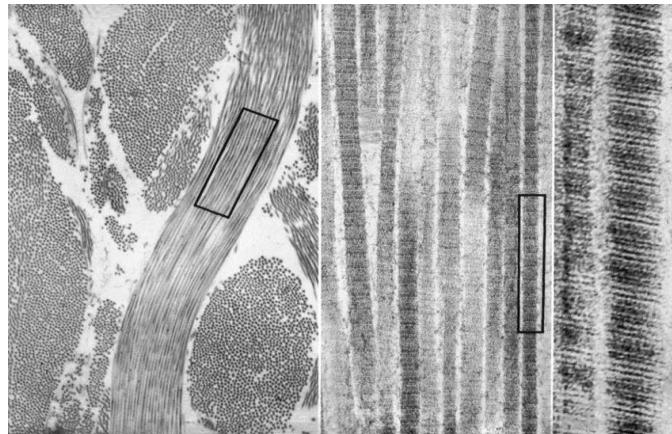


Figure7 : le collagène en ME

3-8 Visualisation des acides nucléiques

➤ Méthode au bismuth

Fixatif - Des fixatifs classiques peuvent être utilisés.

Résultats: les acides nucléiques sont denses aux électrons

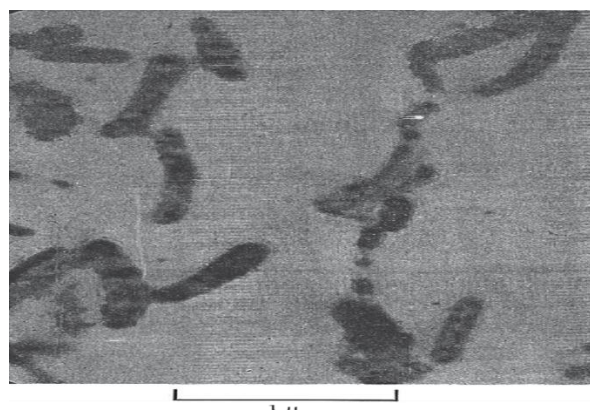


Figure8 : acides nucléiques en ME

3-9 Visualisation des lipides

➤ Considération générales

Comme cela a été vu précédemment, les lipides sont très sensibles à la préparation des tissus. La déshydratation avec des solvants lipidiques doit être évitée. Par contre, La fixation avec du tétroxyde d'osmium entraîne la rétention des lipides.

Non seulement le fixateur les préserve, mais il donne également une coloration grise à ces molécules.

Les lipides sont visualisés avec du tétroxyde d'osmium, utilisé comme fixatif ainsi que comme substance colorante. Il préserve les phospholipides membranaires afin que les cellules puissent être observées en microscopie électronique.

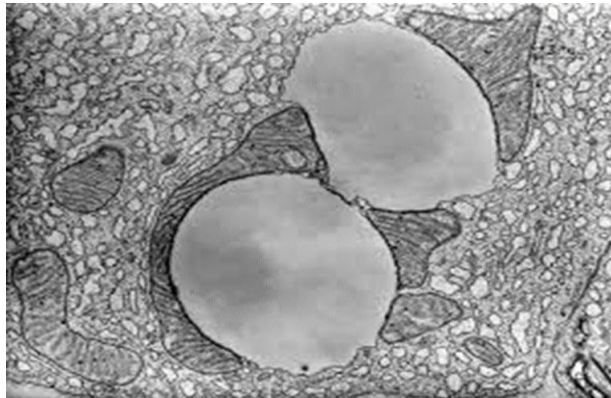


Figure9 : gouttelettes de lipides cellulaire en ME