

## 1<sup>ère</sup> vague de question Pr Long-Mira : Préparation tissulaire en histologie

Noir : Questions des étudiants    Couleurs : réponses de la prof

- ✓ Les étudiants ne comprennent pas la différence dans le résultat obtenu entre la coloration par ombrage en ME et la cryomicroscopie. Est-ce que ces 2 techniques mettent en évidence la même chose (NON, car on travaille sur 2 types d'échantillons différents l'un est fixé déshydraté et l'autre pas) et c'est seulement le moyen de mise en œuvre qui diffère ou est-ce que l'on obtient un résultat différent ? Dans les 2 cas on obtient une réplique de surface (oui) alors quelle est la différence (traitement de l'échantillon) ? Je viens de revoir les diapos et je comprends la confusion d'autant plus qu'il y a une erreur (qui sera également corrigée ds jalon). La technique d'ombrage permet l'accentuation des contrastes (et la visualisation des surfaces) on parle de coloration par abus de langage (cette technique ne se termine pas toujours par la dissolution de la réplique, notamment pour les petits objets on s'arrête à l'étape 2 ! *non dit en cours, ne fera pas l'objet d'une question* !). La cryomicroscopie quant à elle est une technique qui permet d'éviter la fixation (et la déshydratation) donc on observe l'objet dans les conditions les plus proches du réel. Après décapage de l'échantillon on pourra effectivement faire une « coloration » par la technique d'ombrage (précédemment décrite).

### I- La ME en transmission (MET)

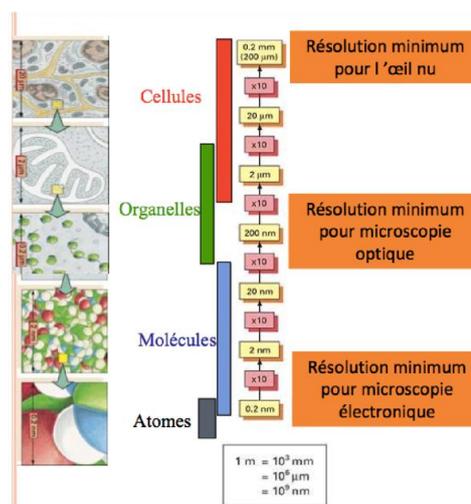
Les techniques spéciales

- **Marquage à l'or** : visualiser des protéines spécifiques
- **Ombrage** : visualiser des surfaces
- **Cryomicroscopie** : pas de fixation, pas de coloration  
-> Cryofracture : membranes

- ✓ Les étudiants se demandent pourquoi vous précisez que la résine en époxy pour la ME est insoluble dans l'eau alors que l'échantillon est déshydraté juste avant. Est-ce seulement une précision ou est-ce qu'il y a un rapport avec les étapes d'avant ou d'après ? C'est juste une précision, il existe différents types de résine, l'époxy (ou épon) est la plus couramment utilisée et non soluble dans l'eau.
- ✓ Confirmez-vous que le vert lumière et le bleu d'aniline sont 2 colorants distincts mais permettant de visualiser le collagène de type 1 ? Car à l'oral vous auriez dit que ces 2 colorants étaient la même chose ce qui a porté à confusion certains étudiants qui ont pensé que c'était un même produit qui portait 2 noms différents. Le trichrome de Masson (comme son nom l'indique) associe 3 colorants. **Hématoxyline** (colorant nucléaire bleu foncé/noir) + **Fuchsine ponceau** (colorant cytoplasmique rouge)

+ **bleu d'aniline** (colorant des fibres de collagène en bleu) qui peut dans certains cas être remplacé par le **vert lumière** (colorant des fibres de collagène en vert). Le bleu d'aniline et le vert lumière ne sont pas « la même chose » mais colore tous deux le collagène en vert ou en bleu

- ✓ Les étudiants se demandent si les pathologies sont à apprendre dans votre cours ou si elles ne sont là que pour l'illustrer et aider à la compréhension. Doivent-ils apprendre quelle coloration convient pour quelle pathologie ? **NON ! Mais savoir quelle coloration pour quel éléments cellulaire/tissulaire.**
- ✓ Concernant **l'inclusion en paraffine**, l'année dernière vous sembliez dire qu'il n'y avait qu'une seule étape de « paraffinage », seulement quand la paraffine liquide coule sur l'échantillon. Or cette année vous semblez dire qu'il y a d'abord un enrobage en paraffine puis que la paraffine coule sur l'échantillon enrobé. Les étudiants ne comprennent pas trop cette partie sur l'inclusion en paraffine. Du coup peut-on dire que l'inclusion en paraffine est précédée d'une étape de déshydratation et d'enrobage comme écrit dans la ronéo ou seulement précédée d'une étape de déshydratation comme sur votre diapo et sur la ronéo de l'année dernière ? **Oui !! Effectivement je n'avais pas assez insisté l'année dernière. Les étapes sont déshydratation, enrobage en paraffine puis inclusion en paraffine. L'enrobage a lieu après la déshydratation au sein d'un automate, le but est que l'échantillon soit complètement imprégné de paraffine ce qui facilitera l'inclusion (étape d'après) et la coupe.**
- ✓ Enfin, confirmez-vous cette phrase, « plus la résolution est élevée, plus on peut distinguer 2 points très proches l'un de l'autre ». **OUI ! Les étudiants trouvent cette phrase en contradiction avec ce schéma où la résolution minimum de l'œil nu est plus importante que celle de ME ? NON. La résolution est la capacité à distinguer de façon nette et séparée, 2 « objets » contigus. Ainsi à l'œil nu on peut distinguer de objets séparés de 0.2 mm alors qu'avec un ME on peut distinguer 2 objets distants de 0.2 nm. La résolution (ou pouvoir de résolution ou pouvoir séparateur) est plus élevée pour le ME. Plus la résolution (ou pouvoir de résolution) est élevée mieux on peut distinguer 2 points (ou objets) très proche de l'autre. Y a-t-il une nuance à percevoir ? Non, je modifierai sans doute le schéma l'année prochaine pour éviter les confusions.**



- ✓ L'année dernière vous aviez précisé qu'en cryomicroscopie il y avait bien coloration mais pas de fixation, or sur votre diapo il y a marqué que la cryomicroscopie évite la fixation et la coloration, est ce une erreur ? **Oui cf première question.**