

Apport de la microscopie électronique dans les Sciences Biologiques et Médicales en 2012

**Master 1
UE N°8**

**Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale
Hôpital Pasteur
CHU de Nice**

Plan

- A. Introduction : les grands principes
- B. Méthodologie générale: du prélèvement à l'observation microscopique
- C. Les techniques spéciales
- D. Applications pour le diagnostic
- E. Exemples d'applications en recherche
- F Evaluation questions/réponses

A. Les grands principes

Les grands principes (1)

- Différences entre microscopie optique et microscopie électronique
 - Les photons et les électrons
 - Les grossissements (1000 # 100 000)
 - Le pouvoir séparateur (0,5 μm # 0,2 nm)
 - Le délai de réponse
 - Les indications
 - La technicité
 - La toxicité
 - Le coût

Les grands principes (2)

- Constitution d'un microscope électronique à transmission
 - Le filament et le canon à électron
 - Les lentilles magnétiques
 - Les condenseurs
 - L'objectif
 - Les lentilles intermédiaires et le projecteur
 - La « canne porte objet » et les grilles
 - La chambre d'observation
 - La pompe à vide

Les grands principes (3)

- Les différents types de microscope électronique
 - Le microscope à transmission
 - Le microscope à balayage
 - Le microscope pour l'analyse X.....

Microscope électronique à transmission



Microscope électronique à transmission



B. Méthodologie générale

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- I. Le choix du prélèvement
 - orientation par la macroscopie : en territoire « d'intérêt »
 - à distance des foyers de nécrose
 - de 0.3 à 0.6 cm³

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- II. La fixation
 - immédiate
 - dans la glutaraldéhyde diluée (tube plastique contenant 0.2 ml de la solution mère diluée extemporanément dans 3 ml d'un tampon PBS); bon fixateur des protéines et des acides nucléiques
 - placer le tube à 4°C, 24 h à 48 h

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- III. La post fixation
 - dans l'acide osmique à 2% diluée à 1% avec du PBS
 - Pendant 1h 30
 - Fixe en noir les lipides
 - Toxicité
 - Coût

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- IV. La déshydratation
 - dans des bains progressifs d'alcool de degré croissant (30°C, 70°C, 95°C, 100°C)
 - Permet de substituer l'eau de l'échantillon pour permettre l'inclusion dans la résine epoxy non miscible à l'eau)
 - Indispensable pour une observation « sous vide »
 - Durée d'environ 12h, le bain à 70°C durant la nuit

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- V. L'inclusion
 - dans la résine epon
 - Insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool
 - Résine dure
 - Résine stable sous un faisceau d'électron
 - Résine hydrophobe
 - Précédée par une phase de substitution dans de l'oxyde de propylène (45 min) et une phase d'imprégnation (50% d'oxyde de propylène et 50% d'epon, 1h30)
 - Polymérisation à l'étuve : 37°C, 1h puis 60°C 24h

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- VI. Les coupes semi fines
 - à l'ultramicrotome
 - avec des rasoirs de verre
 - les coupes de 0,5 μm sont colorées au bleu de toluidine et sont examinées avec un microscope optique
 - permettent de repérer les zones d'intérêt

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- VII. Les coupes ultrafines
 - se réalisent avec un ultramicrotome
 - se font avec des rasoirs de diamant (angle de coupe de 45°)
 - mesurent de 600 à 900 Angstrom d'épaisseur
 - Coupes or (900) ou argent (600 A)
 - Recueil sur des grilles de nickel ou de cuivre

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- VIII. Les colorations
 - l'acétate d'uranyle (conservation à l'obscurité)
 - contre coloration au citrate de plomb (attention à la réaction avec le CO₂)
 - Durée totale 3h

Microscopie électronique

Méthodologie générale

- IX. L'observation au microscope
 - Le placement des grilles
 - Les contraintes
 - L'analyse photographique

« Sorbonne »



« Sorbonne »



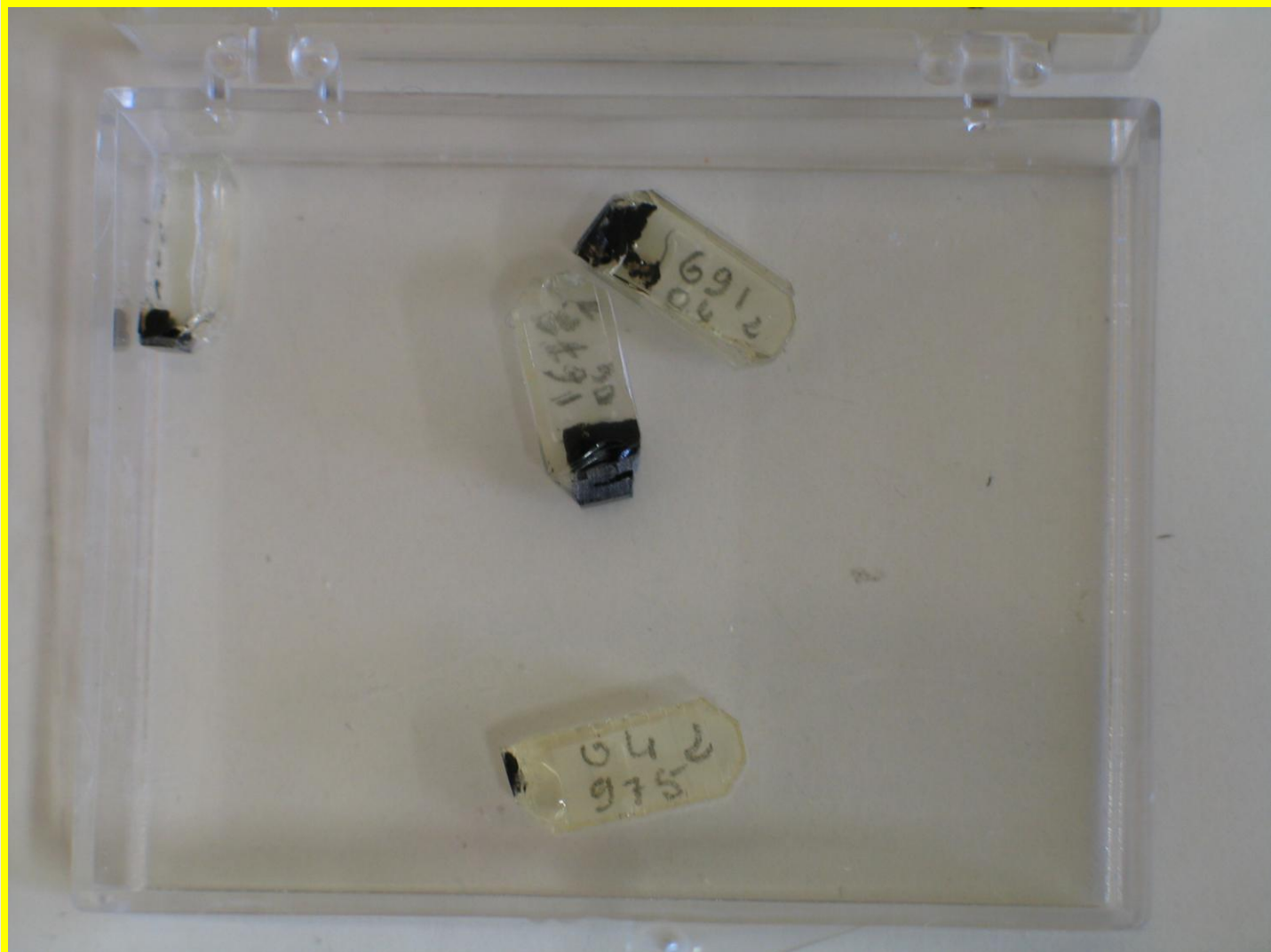
Confection des rasoirs en verre



Confection des rasoirs en verre



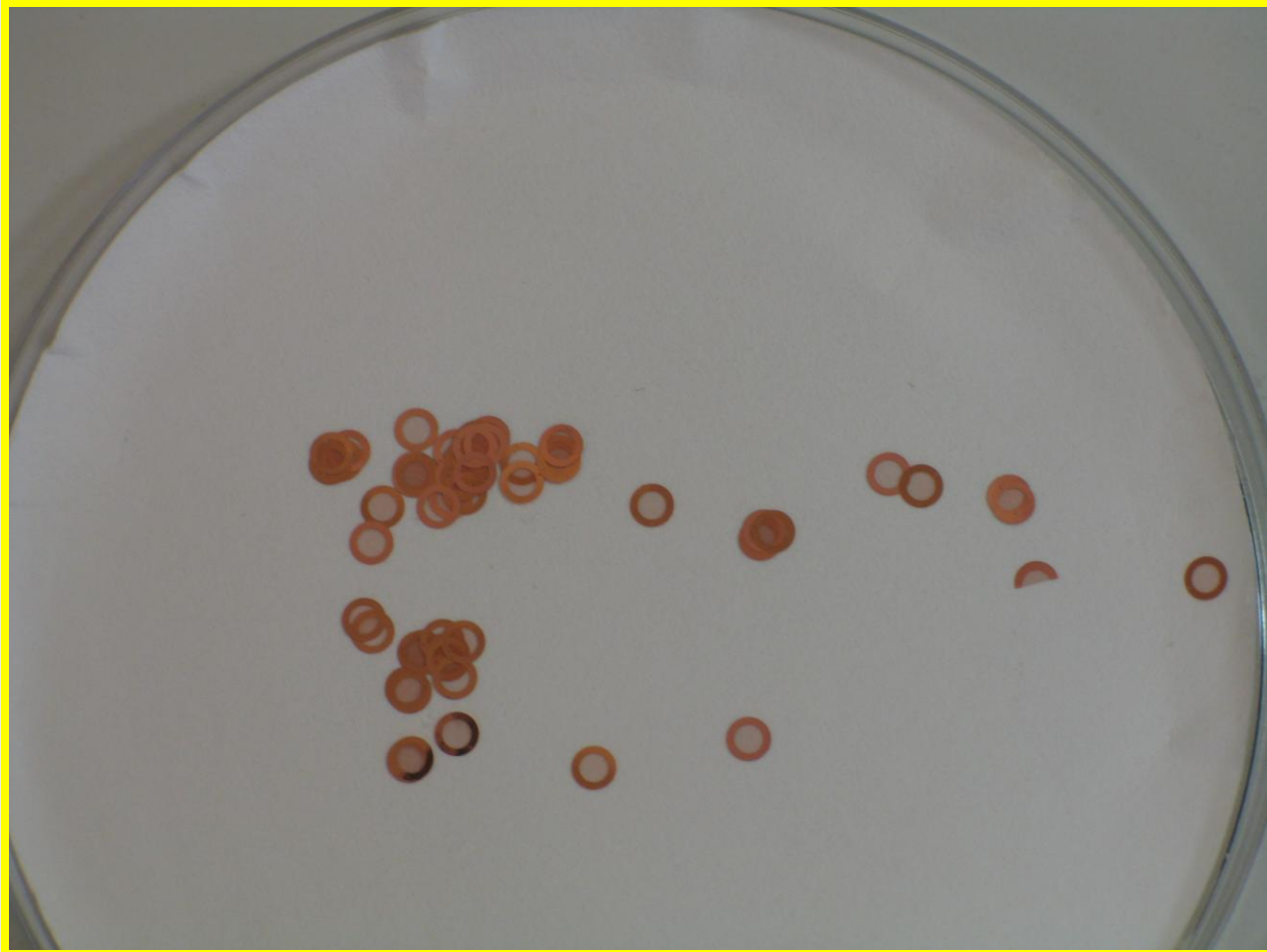
Gélules d'Epoxy contenant un échantillon « osmifié »



Ultramicrotome



« Grilles »



Microscope électronique à transmission



C. Les techniques spéciales

Les techniques spéciales (1)

- Les techniques de marquage:
 - trouver un compromis en la préservation des sites antigéniques et la conservation d'une bonne morphologie
 - Les règles à respecter
 - Fixation dans la paraformaldéhyde et pas de post fixation
 - Résine hydrophile (résines acryliques, LR white, lowycri)
 - Inclusion : polymérisation à froid de la résine (système AFS)
 - Affinité des anticorps
 - Accès à des antigènes intracytoplasmiques ou membranaires
 - Attention aux faux positifs et aux faux négatifs
 - Marquage avec des billes d'or (technique d'immunogold)
 - L'intérêt

Les techniques spéciales (2)

- L'ultracryotomie
- L'hybridation in situ
- La microscopie électronique à balayage à haute résolution

D. Applications pour le diagnostic

Applications pour le diagnostic

- En pathologie tumorale
- En pathologie infectieuse
- En pathologie métabolique et dégénérative
- En pathologie iatrogène

Pathologie tumorale

Les tumeurs neuroendocrines

Les mélanomes

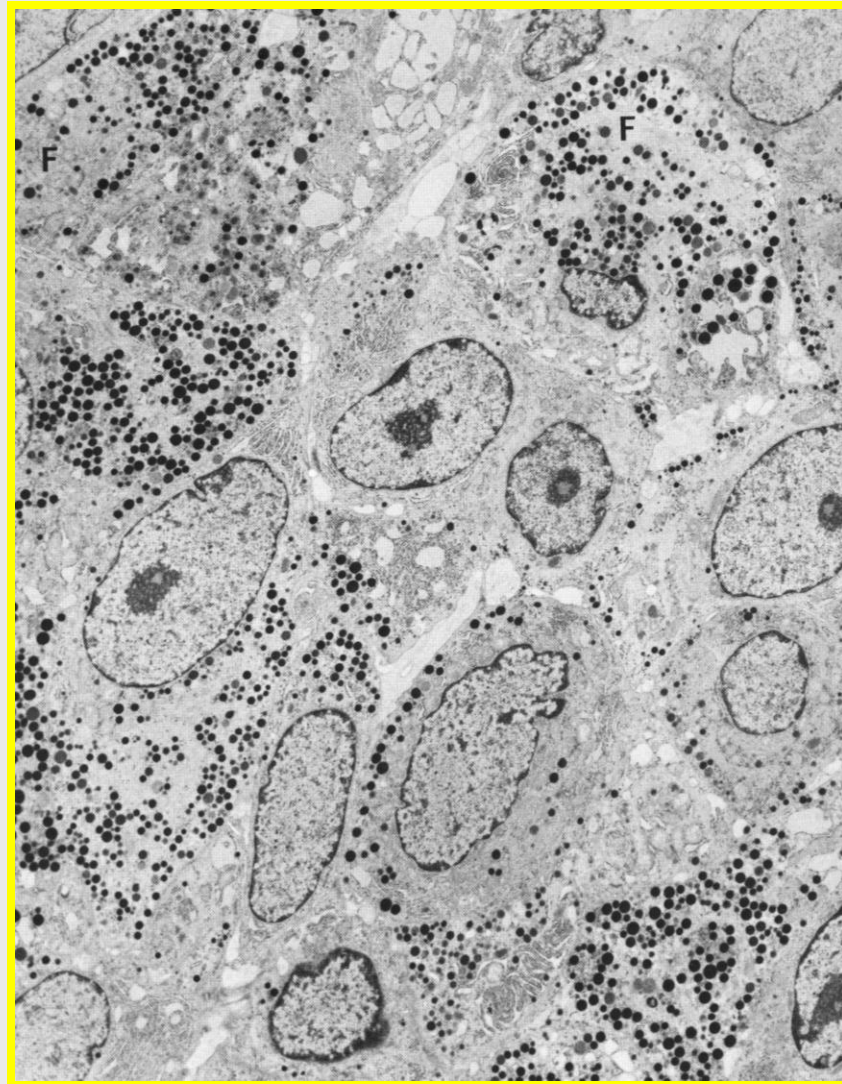
Les angiosarcomes

L'histiocytose langheransienne

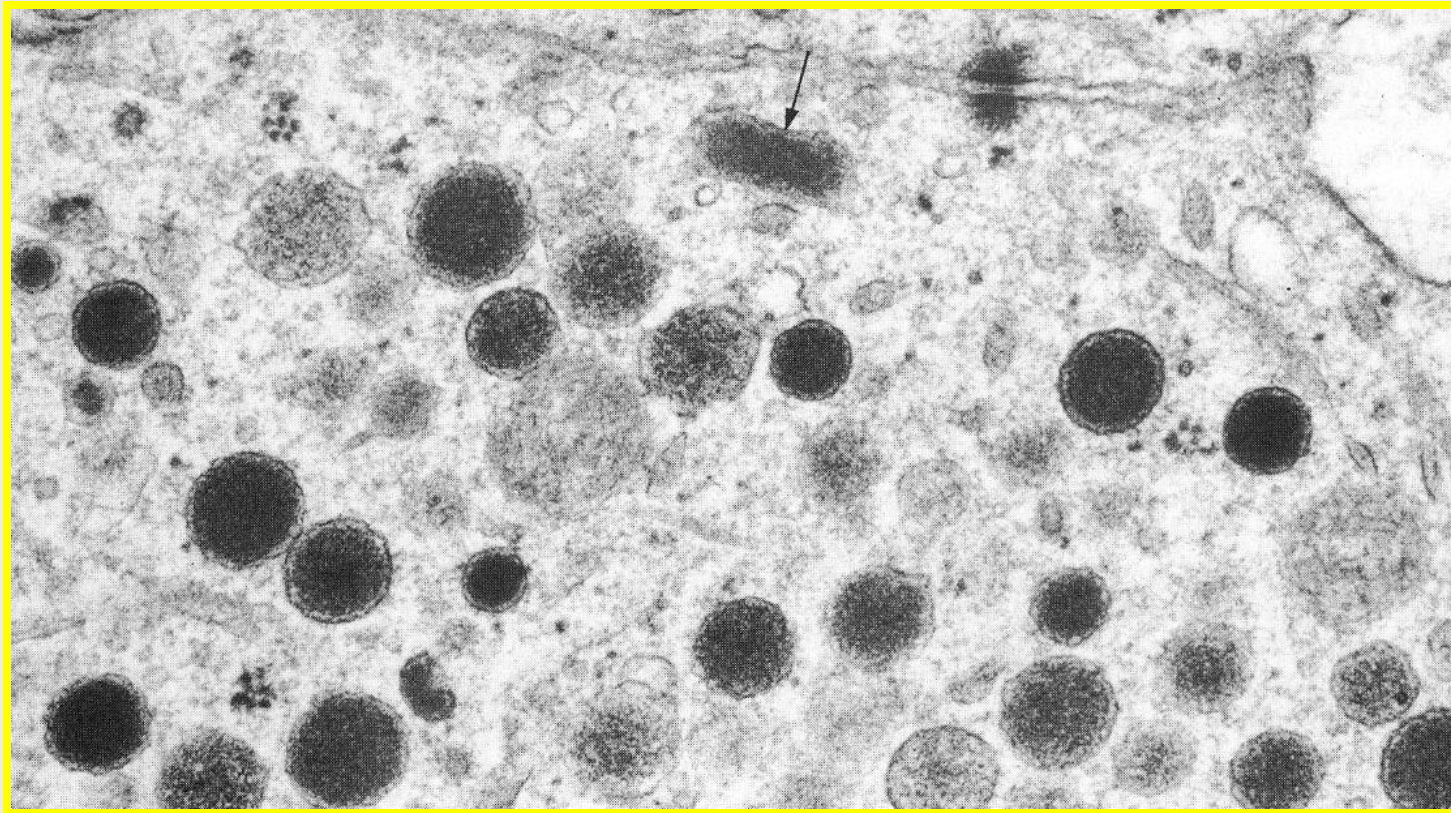
Divers

Pathologie tumorale
ex : tumeur neuroendocrine

Tumeur neuroendocrine



Grains neurosécrétoires



Pancréas

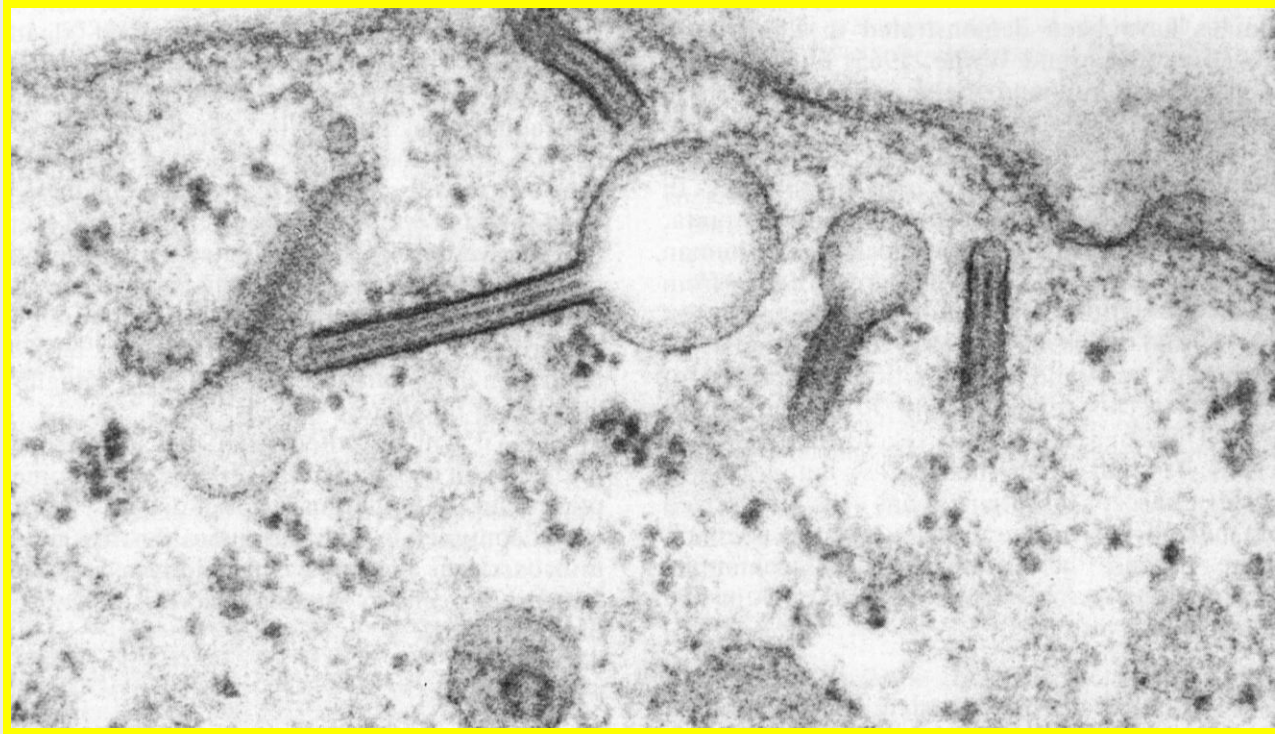
(grains neurosécrétoires)



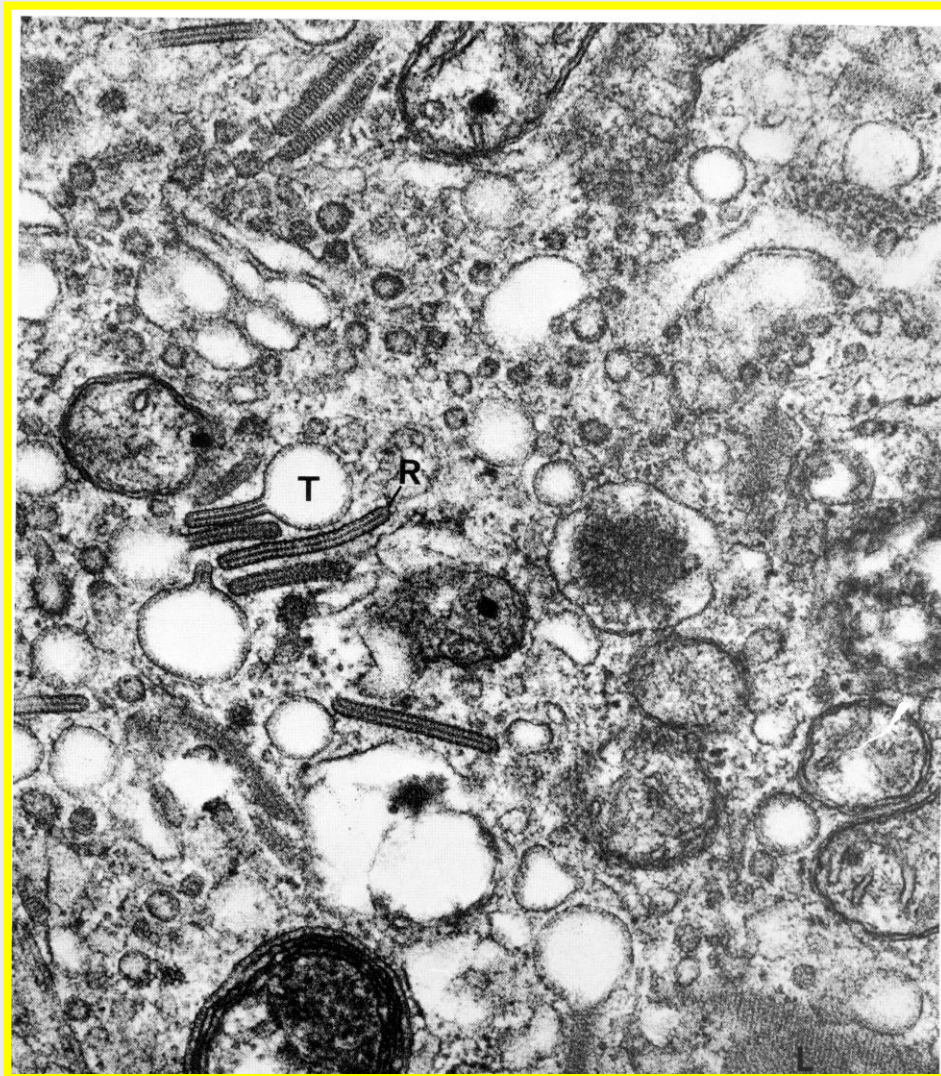
Pathologie tumorale

ex : histiocytose langheransienne

Histiocytose Langheransienne



Histiocytose Langheransienne



Histiocytose (peau)



Pathologie tumorale
ex : mélanome malin

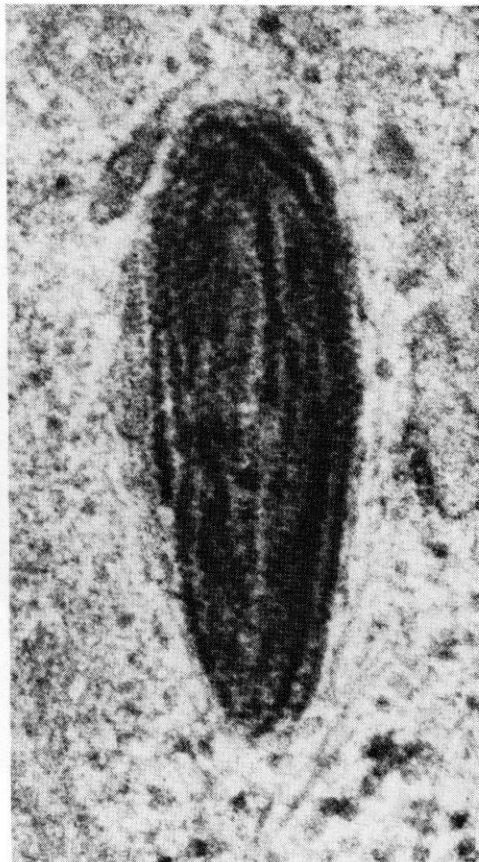
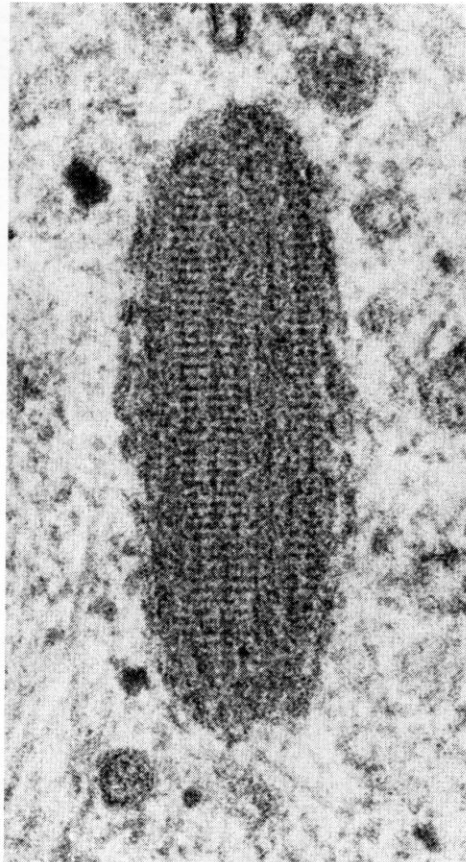
Mélanome malin



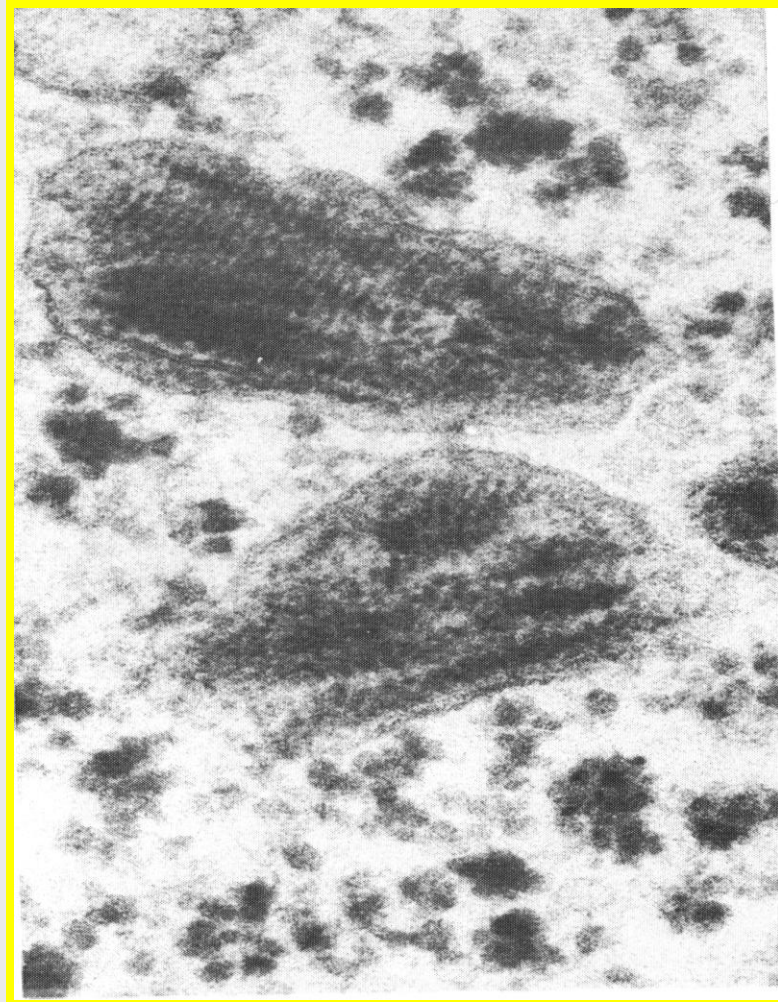
Mélanome malin



Mélanosomes

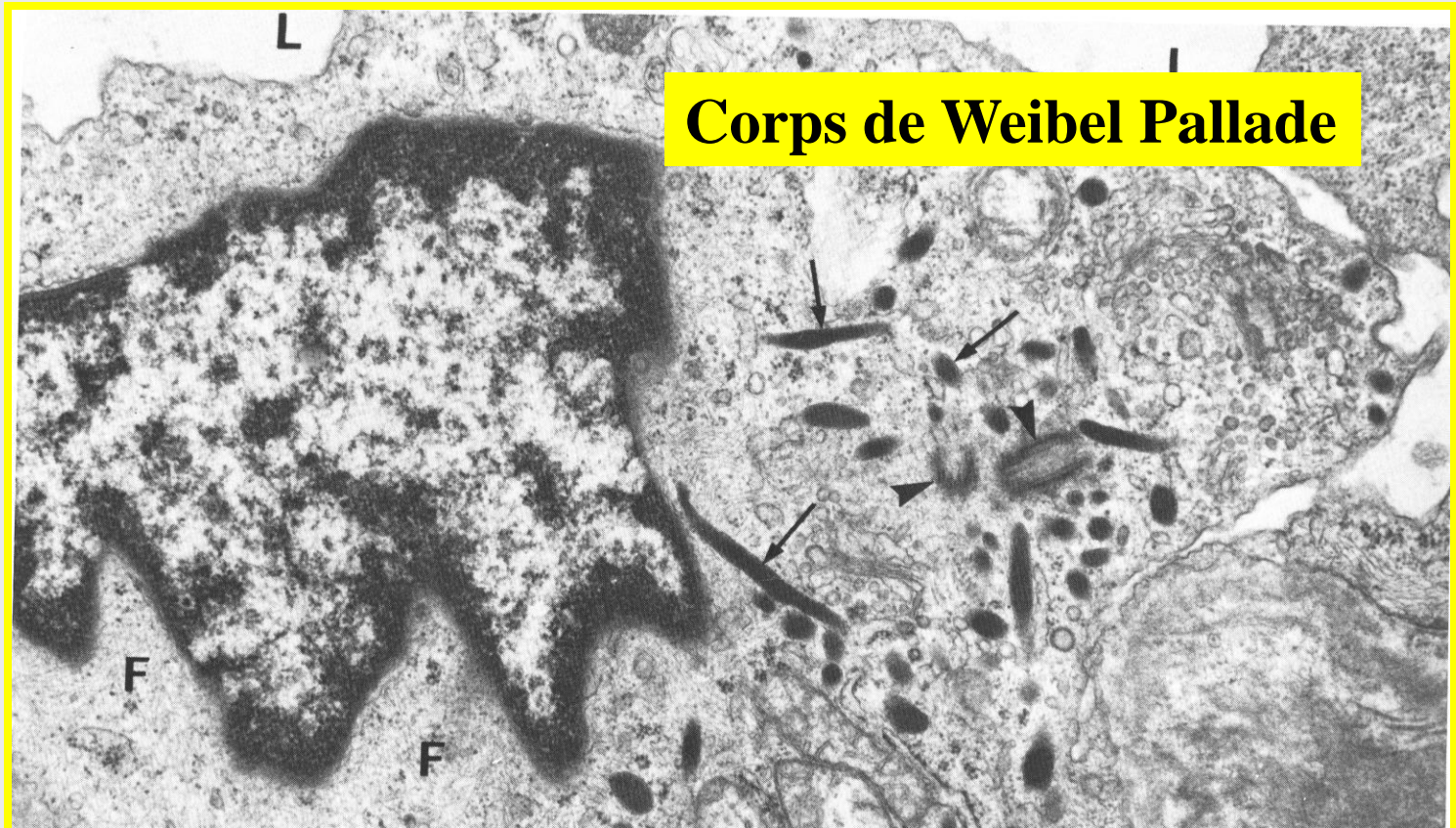


Mélanosomes

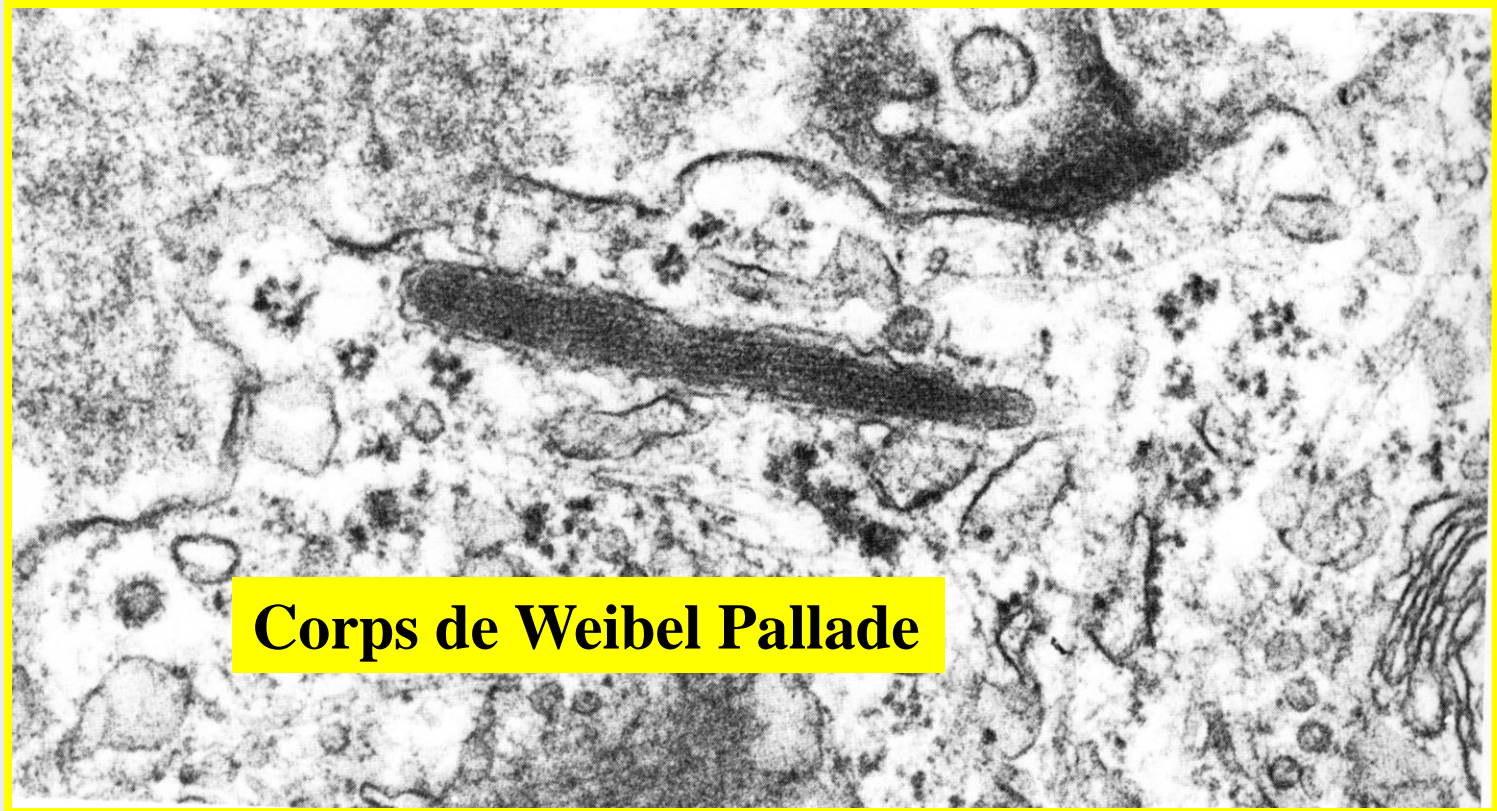


Pathologie tumorale
ex : angiosarcomes

Angiosarcome *(cellule endothéliale)*



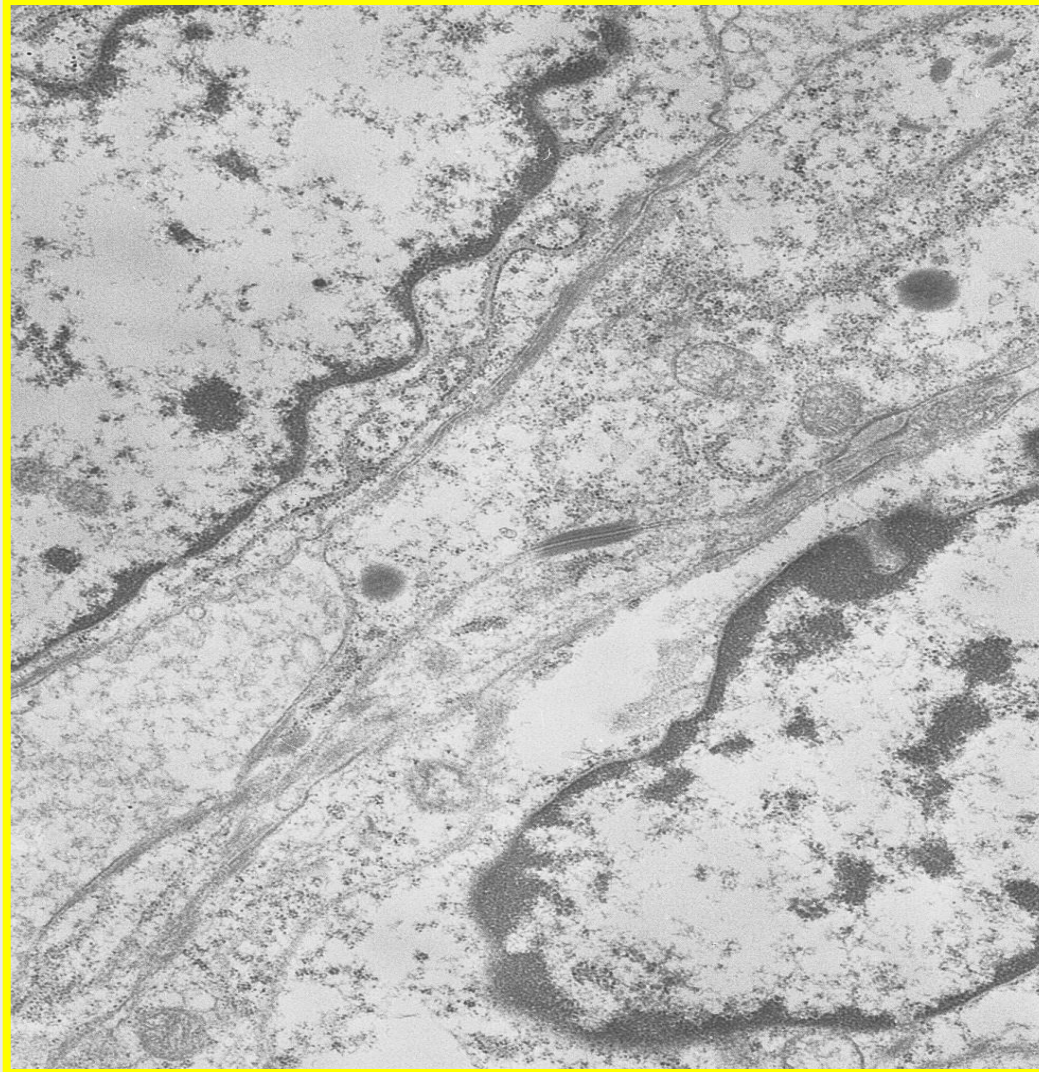
Angiosarcome (cellule endothéliale)



Corps de Weibel Pallade

Pathologie tumorale
ex : divers

Desmosome



Filaments de cytokératine



Schwannome



Schwannome

