

Actualisation de la technique complète des coupes à la paraffine

Dominique Biarrot¹

Une fois le prélèvement réalisé, et les parties à étudier choisies, le processus peut commencer.

La fixation

LES FIXATEURS sont très nombreux :

→ Pour les tissus animaux, nous conseillons vivement le FIXATEUR DE BOUIN (pas de limite de durée pour le bain).

→ Pour les végétaux : FIXATEUR À BASE DE FORMOL OU AFA, ou FAA (bain de 1 à 24 heures).

Alcool absolu (80 cc) - Formol à 30 à 40 % (15 cc) - Acide acétique glacial (5 cc).

→ Autre formule :

Alcool à 70%² (90 cc) - Formol à 30 à 40 % (5 cc) - Acide acétique glacial (5 cc).

La déshydratation



Pour les pièces fixées au Bouin ou au formol, il faut compter environ 1 heure par mm d'épaisseur.

Selon Jean-Marie Exbrayat³ :

Éthanol à 70 % : 4 heures - Éthanol à 95 % : 2x 12 h - Éthanol à 100 % : 2x 4 h.

Selon Yvan Lindekens (Belgique)⁴ :

Éthanol à 70 % : 4 heures - Éthanol à 95 % : 2x 4 h - Alcool isopropylique pur : 3x 4 h (cette étape représente la transition entre la déshydratation et l'imprégnation, car la paraffine est soluble dans cet alcool).

Si la pièce est fragile, passer d'abord par 2 bains supplémentaires :

Éthanol à 10 % : 4 heures - Éthanol à 30 % : 4 h.

ASTUCE → La pièce à traiter sera placée dans un morceau de gaze attaché au sommet du flacon.

¹ Dominique Biarrot, F-27330 La Barre-en-Ouche - biarrot.dominique@wanadoo.fr

² N'oublions pas que le titrage d'un alcool s'obtient par addition d'une quantité très précise d'eau bidistillée, selon les normes de la table de Gay-Lussac.

³ Exbrayat J.M., 2000 - « Méthodes classique de visualisation du génome en microscopie photonique », collection « Techniques de visualisation moléculaire », 182 p.

⁴ Yvan Lindekens, voir le forum « Le Naturaliste ».

- Toutes les parties du prélèvement seront ainsi en contact avec le liquide de déshydratation.
→ La manipulation du fragment en est aussi grandement facilitée, puisqu'on ne touche plus à celui-ci lors des changements de bains ou de flacons.
NB : Il faut se souvenir que si l'alcool a déjà servi plusieurs fois, la partie inférieure du flacon contient un alcool moins titré.

Préparation de la paraffine

LA PARAFFINE du commerce se présente souvent en granulés, et son point de fusion est toujours précisé (entre 45 et 70°). Le Paraplast est une paraffine de synthèse qui imprègne bien les pièces. Certains techniciens ajoutent parfois de la cire d'abeille, car elle confère à la paraffine une souplesse qui améliore la facilité de coupe et l'adhérence de la pièce au bloc de fixation (avec mon vieux microtome, les résultats sont nettement améliorés).

Paraffine : 100 g - cire d'abeille : 5 g.

L'imprégnation



Le remplacement de l'alcool par la paraffine doit se faire lentement. Le tissu sera placé dans un bain de paraffine, dont la température est légèrement supérieure à celle du point de fusion, pendant plusieurs heures (entre 4 et 12 heures). L'alcool isopropylique utilisé dans la dernière phase de la déshydratation va rendre cette opération plus efficace. Cette opération n'impose pas l'utilisation d'une étuve, et peut se réaliser avec un bain-marie ; il suffit d'enfermer le prélèvement dans une petite boîte, elle-même placée dans une plus grande, qui flotte sur l'eau du bain (voir les 3 illustrations ci-dessus).

L'inclusion

Le tissu imprégné va être inclus dans un bloc de paraffine. Pour former le moule final, nous vous proposons 3 techniques : les cassettes (voir ci-dessous), les barres de Leuckart et pour les bricoleurs, la fabrication de petits moules en carton (ce dernier cas de figure laisse la possibilité de fabriquer ses moules sur mesure, en fonction de la taille des prélèvements).



MODE OPÉRATOIRE

- ++ Verser la paraffine dans le moule.
- ++ Attendre un peu avant de poser le prélèvement : le fond se refroidit plus vite, et le prélèvement sera ainsi placé plus haut.
- ++ Utiliser des pinces chauffées pour la mise en place.



ASTUCE → Ne pas oublier de placer dans la paraffine, sur le bord du moule, un petit morceau de papier (aide-mémoire) qui indique où se situe le prélèvement, et son orientation car, une fois la paraffine refroidie, on ne distingue plus rien.

◀ Versage de la paraffine entre des barres de Leuckart.

Cas particulier : les très petits prélèvements ou les prélèvements très fragiles

TECHNIQUE DE LA DOUBLE INCLUSION AGAR – PARAFFINE

- ++ Dans un 1er temps, confectionner un petit moule en carton.

- ++ Utiliser une plaque chauffante.
- ++ Mélanger 1,3 g de poudre d'agar-agar (gélose) avec 100 cc d'eau ; faire dissoudre la gélose en chauffant ; une fois dissoute, ajouter 2,5 cc de formol (il durcit la préparation).
- ++ Verser un fond de la préparation (2 à 3 mm) dans le moule ; attendre la prise en gel (maintenir le mélange initial au chaud pour éviter sa prise).
- ++ Sous la loupe binoculaire, positionner les pièces dans le moule.
- ++ Couvrir avec une nouvelle couche.
- ++ Attendre la prise.
- ++ Sortir les blocs du moule.

DÉSHYDRATATION

- + Placer le bloc de gel dans un film de gaze.
- + Tremper dans de l'alcool à 70° (30 minutes au moins), de façon à rendre le bloc plus dur.
- + Le tailler au plus près des pièces à étudier.
- + Replacer dans le film de gaze, et déshydrater comme pour une pièce normale (voir pager précédente).

IMPRÉGNATION

La paraffine remplace l'alcool isopropylique, ce qui a pour effet de réduire le volume du bloc dans une grande proportion (cette imprégnation sera de 12 à 24 h.).

INCLUSION

Pour inclure le petit bloc d'agar ainsi obtenu, le mettre en place dans un bloc de paraffine, comme pour une pièce normale (voir pager précédente).

Il est possible ainsi d'inclure et de couper des structures de très petite taille (moins de 1 mm), grâce au travail sous la loupe binoculaire).

Il est toujours possible de faire refondre le bloc si le positionnement de la pièce n'est pas satisfaisant.

La coupe

PRÉPARATION DE LA LAME DE COUPE

Avec les microtomes modernes à lames à usage unique, il n'y a pas de préparation spéciale (il faut simplement changer de lame chaque fois que cela s'impose).

Mais avec les microtomes anciens, il est nécessaire d'affûter⁵ régulièrement la lame⁶.

++ Passage sur la pierre (la meilleure est, sans hésitation, la pierre de coticule⁷ belge, qui donne, à mon sens, un résultat parfait). La manière de faire est sujet à discussion : sur la pierre maintenue en permanence humide, je pratique un mouvement régulier et lent, en suivant le dessin du symbole de l'infini (un 8 horizontal), chaque face de la lame subissant le même nombre de mouvements, et sans appuyer (le poids du couteau est suffisant).

++ Passage sur le cuir sec à la manière des barbiers anciens, avec des allers-retours, pour enlever le morfil.



TAILLE DU BLOC DE PARAFFINE

Rogner le front de coupe au plus près du prélèvement, et garder les bords supérieur et inférieur parallèles (seule manière d'obtenir un beau ruban).

FIXATION DU BLOC DE PARAFFINE SUR LA PORTE OBJET DU MICROTOME

++ Soit coller à la chaleur sur le porte-objet (PO) d'un microtome ancien : chauffer le PO, y placer fermement le bloc de paraffine et refroidir sous l'eau (voir les 3 photos ci-dessus).

++ Soit fixer dans les mâchoires de l'étau, sur un microtome récent.



La réalisation des coupes rencontre de nombreuses difficultés, toutes surmontables ; les principales causes sont :

++ Mauvaise qualité du tranchant (lame ébréchée ou émoussée : cela se remarque immédiatement, car on distingue des sillons dans la tranche de paraffine).

++ Angle de coupe trop faible ou trop prononcé.

++ Température ambiante trop élevée (le froid facilite la coupe).

++ Un prélèvement mal déshydraté ou mal imprégné.

◀ Frottis d'eau albumineuse.

⁵ Entendons-nous bien ! Il s'agit simplement de maintenir le fil et le tranchant d'une lame en parfait état. Si cette dernière a été ébréchée, la réparer est affaire de spécialiste : un amateur ne peut y arriver.

⁶ Les anciennes lames de microtome sont lourdes et massives, et coûtent cher. Elles sont très dangereuses à manipuler, et requièrent une attention de tous les instants. Afin de devoir les aiguiser le moins souvent possible, nous utilisons une astuce, qui consiste à déplacer la lame, dans ses fixations, d'environ 1,5 cm, après une centaine de coupes, et de marquer la zone utilisée.

⁷ Le coticule de Vielsalm dit « pierre à rasoir » ou « pierre beige » est une variété de schiste cristallin à grain très fin, composé de petits cristaux de grenat, d'un diamètre compris entre 5 et 20 µm. Vieille de 480 millions d'années, elle est d'origine sédimentaire, mais contient en outre, une part importante de manganèse. Sa dureté, associée à la finesse de son grain, lui confère un pouvoir abrasif exceptionnel, remarqué il y a plusieurs siècles déjà. Le gisement, dont il semble bien que ce soit le seul au monde, est quasi épuisé et son exploitation sera bientôt arrêtée.

COLLAGE DES COUPES

Les lames doivent être dégraissées, et conservées dans de l'alcool méthylique ; les sécher avec du papier absorbant ; passage rapide dans la partie inférieure de la flamme d'un brûleur à gaz ou d'une lampe à éthanol pur ; essuyer avec un linge non pelucheux, imbibé de méthanol.

Préparation d'une solution mère d'eau albumineuse (Formule de Mayer)

50 cc de blanc d'œuf frais + 50 cc de glycérine (d'autres formules proposent glycérine et blanc d'œuf frais à poids égal) ; mélanger et filtrer sur gaze (la filtration est très lente) ; ajouter un cristal de thymol ou de phénol pour la conservation.

Solution de travail : diluer 10 à 20 gouttes de la solution mère dans 25 cc d'eau bidistillée (ou encore 1cc de la solution mère dans 20 cc d'eau bidistillée.

Réaliser un frottis avec 1 goutte de la solution de travail sur les LPO.

Positionner les coupes sur les LPO.

L'étalement se fera doucement, mais si la coupe est très chiffonnée ou ondulée, l'étalement se fera mieux sur des lames tièdes.

Mise en réserve des lames sur une plaque chauffante (il existe des modèles de laboratoire, avec thermostat), mais il est possible d'utiliser un chauffe-plat de cuisine, dont la température de surface est ordinairement de 70°. Si on y place un carton et quelques feuilles de papier, la température de surface descend à la température voulue, c'est-à-dire largement en dessous du point de fusion de la paraffine utilisée.

Une bonne adhérence à la LPO n'est obtenue que si l'eau albumineuse sous la préparation est évacuée ; cela peut se faire en inclinant les LPO et en les laissant dans cette position durant 4 heures.

Préparation à la coloration

Pour ce genre de manipulation, l'utilisation de cuves à coloration s'avère très pratique car on peut traiter 10 lames à la fois. La coloration peut se faire aussi directement sur la LPO, en utilisant une pipette de Pasteur ; les quantités de couleurs utilisées dans ce cas sont très petites.

1) DÉPARAFFINAGE : 1er bain de toluène ou de xylène de 5' (pour chasser la paraffine) - 2ème & 3ème bain de toluène (5') ; on peut aussi terminer par 2 bains d'alcool isopropylique, ce qui améliore la dissolution de la paraffine (selon Langeron, le toluène durcit plus les pièces traitées). Employer des tubes de Borel (voir photo ci-dessous), ou de petits bocalux de récupération.

2) RÉHYDRATATION PAR L'ALCOOL : 1er bain d'alcool à 95°, durant 5', pour chasser le toluène - 2ème bain à 95° (5') - 3ème bain à 60° (5') - 4ème bain à 30° (5').



3) BAIN DANS L'EAU BIDISTILLÉE ou dans le PBS (tampon phosphate salin : comprimés dans le commerce).

4) On passe ensuite aux différents PROTOCOLES DE COLORATION prévus.

◀ Différents modules permettant des colorations de pièces libres, en petite quantité (cela consomme peu de colorant). On peut ainsi appliquer 3, 4, 12 colorations différentes à un même échantillon, sur un espace très réduit.

2 modèles de cuve à coloration ►
 (en verre et en plastique), à utiliser pour des frottis
 ou des coupes déjà collées sur une LPO. Elles
 permettent de traiter 10 lames à la fois.
 On peut aussi les utiliser pour le rinçage, la déshy-
 dratation, ou autres opérations impliquant de tra-
 vailler sur des séries de lames.



M. Lecomte - 2013 ©

QUELQUES ILLUSTRATIONS COMPLÉMENTAIRES



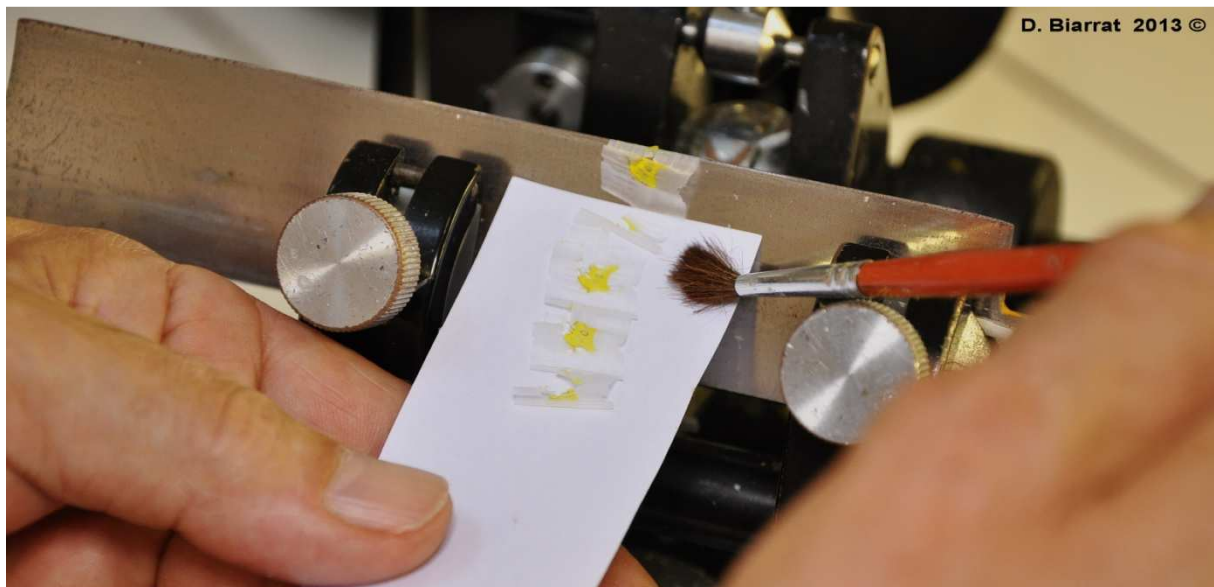
D. Biarrat 2013 ©

▲ Versage de la paraffine dans des moules réalisés avec du papier rigide.



D. Biarrat 2013 ©

▲ Mise en réserve des lames portant les coupes et séchage, sur un chauffe-plat, en position inclinée.



D. Biarrat 2013 ©

▲ Transfert des coupes sur un support rigide, à l'aide d'un pinceau.