

CHAPITRE IV METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE**I : HISTOIRE SUR L'INVENTION DU MICROSCOPE**

Il est difficile de dire qui a inventé le microscope composé. On dit souvent que l'opticien hollandais Hans Janssen et son fils Zacharias Janssen fabriquèrent le premier microscope en 1590, mais ceci provient d'une déclaration de Zacharias Janssen lui-même au milieu du XVII^e siècle. La date annoncée est assez improbable étant donné qu'il a été montré que Zacharias Janssen est né vers 1590.

Un autre favori au titre d'inventeur du microscope est Galilée. Il a développé un microscope composé d'une lentille convexe et d'une autre concave en 1609.

Christiaan Huygens, un autre Hollandais, a développé à la fin du XVII^e siècle un oculaire simple à deux lentilles corrigé des aberrations chromatiques, ce qui fut un grand pas en avant dans le développement du microscope. L'oculaire de Huygens est toujours fabriqué aujourd'hui, mais souffre d'un champ assez réduit et d'autres problèmes mineurs.

On attribue en général à Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) le fait d'avoir attiré l'attention des biologistes sur les utilisations du microscope, même si des loupes ordinaires étaient déjà fabriquées et utilisées au XVI^e siècle. Les microscopes artisanaux de Van Leeuwenhoek étaient des instruments simples et de taille réduite comprenant une lentille unique mais forte. En comparaison, les systèmes à plusieurs lentilles restaient difficiles à mettre au point et il fallut pas moins de 150 ans de développement des optiques avant que le microscope composé puisse livrer une qualité d'image équivalente à celle des microscopes simples de Van Leeuwenhoek. Néanmoins, et malgré de nombreuses revendications, on ne peut pas considérer Van Leeuwenhoek comme l'inventeur du microscope composé.

II : INTRODUCTION

Les cellules sont de très petite taille et d'organisation très complexe. L'étude de leur structure, de leur composition chimique et de leur fonctionnement (physiologie) a nécessité la mise au point d'outils et de techniques appropriés qui ont été perfectionnés au fur et à mesure des progrès scientifiques et technologiques réalisés dans divers domaines. Les progrès de la microscopie ont repoussé la frontière entre le visible et l'invisible. Au microscope électronique, on parvient même obtenir l'image d'atomes d'or cristallin. Aujourd'hui, la médecine, la biologie ne peuvent plus se passer du microscope.

Pour comprendre la biologie cellulaire contemporaine, il est indispensable de se familiariser avec les méthodes et les appareillages utilisés pour son étude.

Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule :

- *- les techniques morphologiques.
- *- les techniques chimiques et biochimiques.
- *- les techniques physiologiques.

Ces techniques sont toutes basées sur l'emploi de microscopes optiques et électroniques ; les manipulations sont justifiées par les deux exigences de l'examen au microscope :

- Les objets à examiner doivent être minces
- Leurs différents éléments doivent présenter un certain contraste.

En cytologie de nombreux procédés préparatoires des cellules sont utilisés pour une analyse morpho fonctionnelle. Nous traiterons dans ce chapitre que les principales techniques histologiques et cytologiques.

III : LA MICROSCOPIE

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Le principe est dans tous les cas le même : une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation. Cette onde est captée par un objectif qui la concentre et passe par un oculaire qui crée une image observable. Cette image est soit observée à l'œil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra CCD et stocké sur ordinateur pour retraitement.

Aujourd'hui la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée : le microscope optique, aussi appelé photonique, parce qu'il utilise des photons et le microscope électronique qui utilise des électrons pour étudier l'objet. Afin d'étudier des structures on utilise un certain nombre de techniques : préparation des coupes fines, coloration négative, ombrage métallique, cryodécapage etc....

A : LA MICROSCOPIE OPTIQUE OU PHOTONIQUE

Cette technique est la plus ancienne utilisée. Elle est également celle dont il existe le plus de variantes. Le principe est le suivant, la préparation est éclairée par une lampe. Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

- soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.
- soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.
- soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie à fluorescence.

Le microscope optique est un instrument d'optique muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions (ce qui caractérise son grossissement) et de séparer les détails de cette image (et son pouvoir de résolution) afin qu'il soit observable par l'œil humain. Il est utilisé en biologie, pour observer les cellules, les tissus, en pétrographie pour reconnaître les roches, en métallurgie et en métallographie pour examiner la structure d'un métal ou d'un alliage.

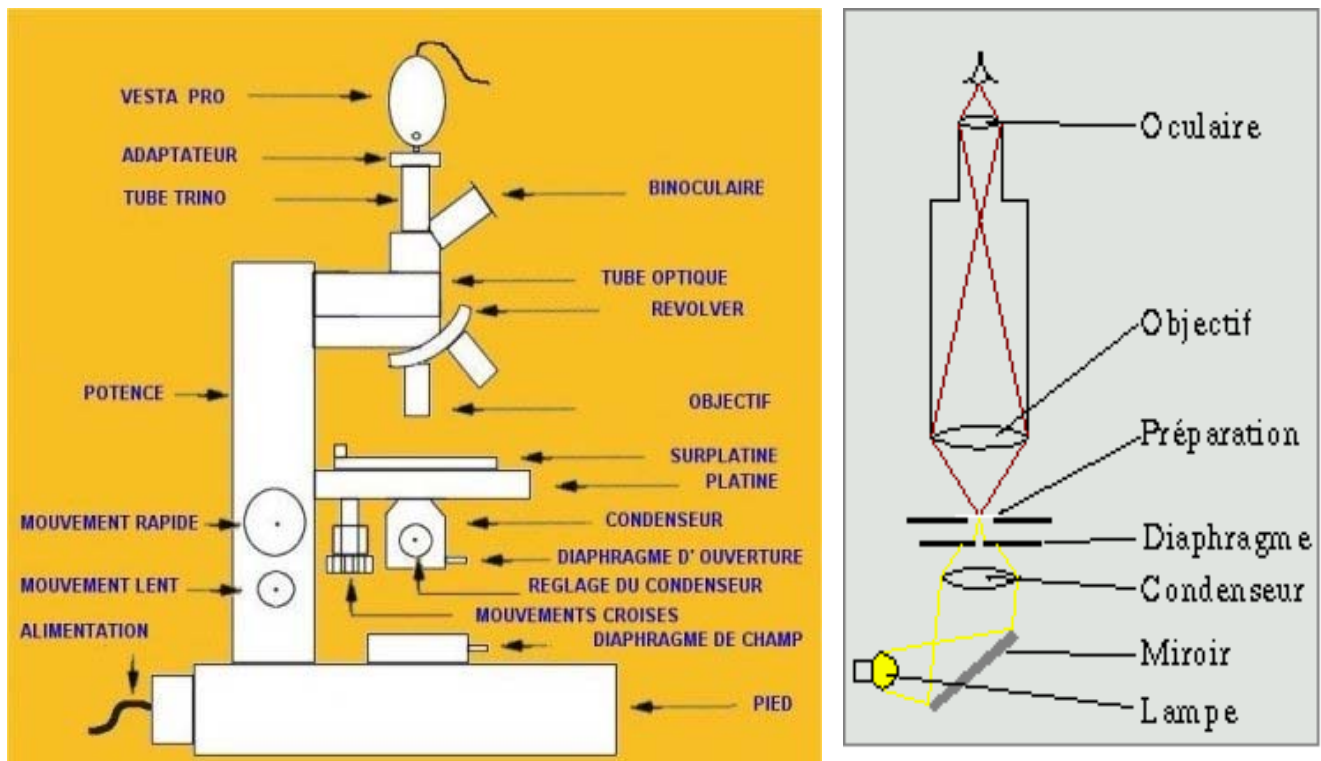
Il ne faut pas le confondre avec la loupe binoculaire qui n'exige pas des échantillons plats de faible épaisseur

Ce microscope il a l'avantage de donner une vue générale des cellules ou des tissus et aussi d permettre l'examen de cellules vivantes ; mais le pouvoir séparateur du microscope optique ne peut dépasser 0,2 μm , le grandissement étant au maximum de 1000.

1 : Présentation du microscope optique :

Un microscope optique en général est composé d'un statif (pied) qui assure la stabilité de l'appareil, d'un tube optique le long duquel existe un système de lentilles en verre et comportant à ses extrémités un oculaire permettant de recueillir l'image et des objectif servant à agrandir un certain nombre de fois l'image de la préparation, d'une platine (porte objet)

percée d'un trou et munie de pinces pour immobiliser la lame et d'une source lumineuse éclairant la préparation. (Voir TP sur la microscopie).



Le microscope est caractérisé par :

- **son grossissement ou puissance** : Egal au produit du grossissement (ou puissance) de l'objectif et de l'oculaire Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer.

- **son pouvoir de résolution** : La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Indépendamment du capteur utilisé et des aberrations ou imperfections des lentilles, la résolution du microscope optique est fondamentalement limitée par la diffraction de la lumière.

La résolution ou le pouvoir séparateur (PS) est définie comme étant la distance minimale séparant deux points individualisables. Chez l'homme le PS est de 0,1 mm à une distance de 25 cm. L'œil humain ne peut distinguer à 25cm que deux objets distants l'un de l'autre que de 0,1 mm. Au-delà l'image des 02 objets sera unique ou nulle.

Le PS du microscope optique est de 0,2 μm alors que celui du microscope électronique est de l'ordre de \AA

2 : Principe du fonctionnement du microscope :

Deux types d'observations sont réalisables en microscopie : l'observation par transmission pour le microscope optique et pour le microscope électronique à transmission et l'observation par réflexion pour le microscope électronique à balayage.

Donc le microscope travaille en :

Transmission : l'échantillon est traversé par des photons et électrons ; les lentilles de verre (MO) ou les champs électromagnétiques (MET) permettent l'obtention d'une image qui est reprise par l'oculaire (MO) ou écran fluorescent (MET).

Réflexion : le microscope ne capte que les rayons réfléchis par les parois de la préparation. Ce type de microscopie donne une image de la surface des objets et non de leur structure interne. L'intensité étant fonction de l'orientation des parois par rapport au système optique, cela donne une image « en relief » de l'objet. Elles ne sont donc pas applicables à des objets sans relief comme les coupes de tissus ! Elles nécessitent « un éclairage latéral » de l'objet. Ce mode de microscopie est peu utilisé, il correspond aux loupes binoculaires ou stéréomicroscopes, au microscope à fond noir en microscopie optique et au microscope électronique à balayage (MEB) en microscopie électronique.

3 : Conditions d'observation en microscopie :

Pour effectuer une observation en microscopie deux exigences s'imposent : l'épaisseur de l'échantillon et le contraste.

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 des photons ou d'électrons d'où la nécessité de faire des coupes très très fines. Les coupes exigées en (MO) varient entre 2 μm à 10 μm et de 0,03 μm à 0,05 μm

Le contraste : L'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de la coupe absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres (effet contraste). En règle générale, les constituants cellulaires présentent des contrastes naturels faibles d'où l'utilisation de certains artifices tels que les montages optiques qui amplifient les contrastes naturels comme le microscope à contraste de phase ou des colorants vitaux sélectifs (MO) ou encore des sels de métaux lourds comme les sels de plomb (ME).

4 : Types de microscopes optiques :

Un certain nombre de microscopes ayant chacun des montages optiques spéciaux ont été mis au point pour permettre l'observation des cellules dans certaines conditions et améliorer la qualité de celle-ci. Le développement de ces microscopes répond principalement à 2 objectifs

- augmenter les contrastes pour mieux visualiser les structures subcellulaires
- améliorer le pouvoir de résolution (voir des détails de plus en plus petits !)

Parmi ces microscopes, nous avons :

a) Microscope à fond noir :

Il permet de révéler certains détails lors de l'observation des cellules vivantes, en augmentant les contrastes naturels. Dans ce type de microscope, la source de lumière est oblique par rapport à la préparation cellulaire.

Un condenseur spécial illumine la préparation sous une incidence rasante, seul les rayons réfléchis sont captés par l'objectif : le fond du champ d'observation est noir, et le moindre objet apparaît brillamment éclairé. Cela permet d'observer des objets dont la dimension est à la limite extrême du pouvoir séparateur, et qui passeraient inaperçus avec les techniques ordinaires. Mais ces objets devenant des sources lumineuses, leur forme et leur dimension ne peuvent pas être correctement appréciés.

b) Microscope à contraste de phase :

Ce type de microscope est largement utilisé pour l'observation de cellules vivantes. Son principe repose sur l'amplification des contrastes naturels en mettant à profit les différences d'indices de réfraction entre les organites ; différences qu'il transforme en différences d'intensités de lumières qui sont alors visibles à l'œil. La base de cette transformation repose sur les interactions entre les ondes lumineuses : on parle d'interférences. Ce microscope est un bon outil pour l'observation des mouvements des cellules et de leurs organites tels que les mitochondrie, les chromosomes, et de suivre les étapes de processus comme la mitose par exemple. Les images de l'observation peuvent être enregistrées par caméra vidéo, les films sont ensuite projetés sur un écran de télévision.

c) Microscope à fluorescence :

D'une manière générale, les molécules fluorescentes absorbent des radiations à une longueur d'onde donnée et émettent des radiations de longueur d'onde plus élevée. C'est le cas des substances appelées Fluorescéine qui fluoresce en vert et la Rhodamine en rouge sont des exemples de ce type de substances largement utilisées dans la biologie cellulaire. Ce microscope est semblable au microscope photonique ordinaire, sauf qu'il est muni d'une source de rayon UV (lampe à UV) et d'un système de filtre qui permet de choisir la longueur d'onde des UV appropriés pour chaque substance. Il est le plus souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à un fluochrome ; à titre d'exemple, on peut aussi détecter la présence d'insuline dans une cellule avec anticorps Anti-insuline marqué par fluorescéine.

d) Microscope à lumière polarisée :

Il permet de détecter des structures biréfringentes qui ont une organisation moléculaire particulière, telles que les microtubules et les chloroplastes et parois des cellules végétales. Les photons lumineux passant à travers certains matériaux tels que les filtres Polaroid ou certains cristaux (Nicol) en ressortent "polarisés" : ils ne vibrent plus que dans un seul plan. Si un second filtre Polaroid ou un second Nicol est disposé sur leur trajet on peut par rotation de ce second filtre les arrêter complètement et obtenir l'extinction totale du faisceau. (Nicol "croisés") Si on place entre les deux filtres croisés un objet actif sur la lumière polarisée, tel qu'une substance organique possédant un carbone asymétrique ou un arrangement moléculaire ordonné, le plan de polarisation est dévié et l'extinction est levée, la lumière issue de l'objet traverse le second filtre. Il faudra opérer une rotation du second filtre pour obtenir à nouveau l'extinction. Un microscope à lumière polarisée est équipé d'un premier filtre au niveau du condenseur et un second filtre en position croisée dans le tube optique

e) Microscope à balayage confocal :

Dans ce type de microscope, l'objet est éclairé par un faisceau laser finement focalisé qui balai rapidement à un seul niveau n'éclairant qu'un plan mince de l'objet, on parle de coupes optiques. Les préparations sont souvent traitées par des colorants fluorescents et la lumière émise par la coupe optique éclairée donne une image sur un écran vidéo. Les coupes photographiques d'un cerveau humain prises par un scanner sont un exemple de ce type.

B : LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Le microscope électronique est beaucoup plus récent : le premier a été construit en 1931, par Max Knoll et Ernst Ruska, ce dernier a d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention. Puis il s'est répandu à partir des années 60. La résolution d'un microscope électronique peut atteindre 2 angströms, mais généralement les meilleurs microscopes atteignent 20 angströms seulement.

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf que au lieu des photons ce microscope fonction avec des électrons le faisceau est produit et accéléré par un canon à électrons (cathode et anode percée). L'ensemble du dispositif est placé sous vide. Les lentilles de verre sont remplacées par des bobines électromagnétiques ("lentilles" électromagnétiques) seules capables de focaliser les électrons, et de créer des images.

Avec ces microscopes on ne peut examiner que des cellules tuées, mais le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques \AA . On aura donc accès à l'ultra structure des organites.

1 : Types de microscopes électroniques

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

- la microscopie à transmission
- la microscopie à balayage

a) Microscope électronique à transmission :

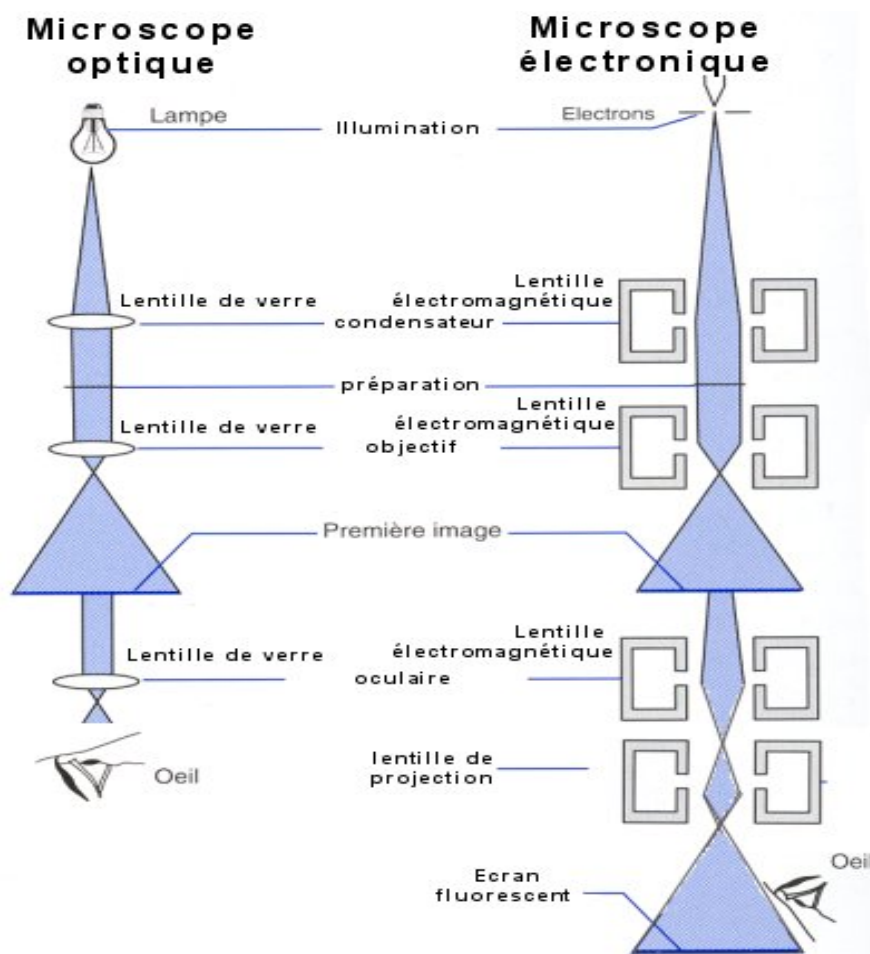
C'est la technique la plus performante. Dans son principe, elle ressemble à la microscopie optique en lumière directe. Le faisceau d'électron est émis par un canon à électron, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse, ils sont plus ou moins absorbée (la préparation est dite plus ou moins dense aux électrons), l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent similaire à ceux qui équipent les téléviseurs noirs et blanc. Hormis le fait que les absorbeurs d'électrons sont des métaux lourds les mêmes techniques de révélation que pour la microscopie en lumière directe peuvent être utilisées.

b) Microscope électronique à balayage (scanning) :

Bien que de résolution plus faible que la précédente, cette technique donne des images absolument spectaculaires, en pseudo 3D.

Le flux d'électrons balaye la surface de l'objet au préalable recouvert d'une couche métallique. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image. Cet appareil permet de gagner en profondeur de champ, mais son pouvoir séparateur est plus faible que celui du microscope à transmission. Il fournit des renseignements sur l'aspect tridimensionnel des surfaces cellulaires, par exemple.

Comparaison entre le microscope optique et électronique



M. OPTIQUE	Caractéristiques	M. ELECTRONIQUE
<ul style="list-style-type: none"> *grossissement : de 25 à 1500 fois *pouvoir séparateur : environ 0.2μm * préparation est traversée par des photons *longueur d'onde : 0,4 à 0,8 μm *lentilles sont en verre *image : est reçue directement *les coupes au microtome : 2 à 10 μm 		<ul style="list-style-type: none"> * grossissement : 1500à 200000 fois * pouvoir séparateur : 10A° * Préparation traversée par les électrons * longueur d'onde : variable de l'ordre de 0,05 A° * les lentilles sont des champs magnétiques * image : est reçue sur écran fluorescent * les coupes à l'ultramicrotome : 0,05μm
Avantages		
<ul style="list-style-type: none"> * on peut voir la cellule en entier * on peut observer une cellule vivante * on peut utiliser des colorants et voire des couleurs réelles 		<ul style="list-style-type: none"> * on peut voir la structure fine de la cellule * on atteint très souvent le niveau moléculaire *a permis de résoudre de vieux litiges (ex : synapse Golgi des végétaux)
Inconvénients		
<ul style="list-style-type: none"> * on ne peut pas pousser l'analyse assez loin 		<ul style="list-style-type: none"> * la cellule est morte * on a pas une vue d'ensemble des structures artificielles (artefacts) apparaissent
Unités		
<ul style="list-style-type: none"> *l'unité est le micromètre ou micron (μm) 1μm = 10⁻³ mm 		<ul style="list-style-type: none"> * l'unité est le nanomètre (nm) 1nm = 1 millimicron = 10⁻⁶ mm ou 10⁻⁹ m

IV : TECHNIQUES DE COUPES ET DE REPLIQUES

Le microscope permet d'observer les cellules d'un tissu, mais dans des conditions très strictes : il faut que l'objet à examiner soit transparent à la lumière. Les objets biologiques ne le sont que rarement, à l'exception des objets naturellement très minces : suspensions (sang, ..) ou cultures cellulaires. Il faut donc les découper en tranches très minces (coupes) de l'ordre de 5 à 10 microns. Pour cela, il faut « durcir » l'objet par différentes techniques physiques ou chimiques. Mais la coupe causerait des dommages irréparables aux tissus et aux cellules et l'observation ne correspondrait pas à la réalité des cellules vivantes : séparation physique de structures proches plus ou moins entraînées par l'outil de coupe, libération d'enzymes lytiques (protéases essentiellement) contenues dans des compartiments spécifiques (lysosomes, peroxysomes, ...) il faut donc au préalable "immobiliser" les structures dans un état aussi proche que possible de l'état vivant et inactiver ces enzymes : c'est le but de toute une série de manipulations qui amèneront les objets biologiques à l'examen convenable au microscope.

A : TECHNIQUES DE COUPE

Pour un examen morphologique des cellules ou des échantillons biologiques en microscopie, des procédés préparatoires de l'échantillon sont nécessaires.

❖ Examen des échantillons en microscopie optique

➤ Examen de cellules vivantes :

Elles peuvent être examinées sans préparation, mais dans un nombre très limité de cas. Il ne peut s'agir que des cellules isolées, naturellement ou en culture.

Une cellule animale dépourvue d'exosquelette se déshydrate très rapidement dans l'air. Son observation ne peut s'effectuer qu'en milieu liquide. L'observation en milieu de culture permet de maintenir la physiologie cellulaire. Mais les boîtes de culture interdisent des objectifs de grossissement utile (maximum X5). L'astuce consiste à inverser le montage du système optique : on illumine la boîte par le haut (les condenseurs actuels permettent de focaliser la lumière sur le fond de la boîte de culture) et l'on observe à travers le fond : microscope inversé.

Comment observer correctement les cellules vivantes ?

Il faut utiliser des techniques qui augmentent les contrastes sans toxicité pour la cellule.

a) les méthodes chimiques, les colorants vitaux :

La quasi totalité des colorants sont très

toxiques pour les cellules, quelques rares colorants n'ont pas cet inconvénient. Ils augmentent le contraste d'absorption de certaines longueurs d'onde, conférant une couleur aux structures qui les retiennent. On peut citer :

Le Vert Janus B spécifique des mitochondries

Le bleu de Trypan, qui ne peut pénétrer dans des cellules vivantes, mais qui colore les cellules mortes (test d'exclusion du bleu trypan) : il est très utilisé pour évaluer la vitalité des cellules.

Les colorants d'exclusion dérivent d'une technique utilisée par les microbiologistes qui visualisaient des levures par contraste en les dispersant dans l'encre de Chine.

b) les méthodes physiques, le microscope à contraste de phase :

ce microscope augmente le contraste des objets. C'est le seul moyen d'observer les mouvements cellulaires et de les filmer.

➤ Examen des cellules mortes:

Il est nécessaire la mise en œuvre de manipulations indispensables à l'obtention d'objets minces et contrastés. On ne peut en effet, examiner que des cellules colorées ; il est aussi nécessaire d'obtenir des coupes minces de ces cellules et donc de les inclure au préalable dans des substances relativement dures, il faut auparavant les fixer, pour éviter toute altération susceptible de se produire au cours des manipulations. La séquence de ces manipulations est donc la suivante : Prélèvement, fixation, inclusion, coupe et coloration.

a) Prélèvement :

Dans le milieu médical, les prélèvements sont effectués en clinique, à l'hôpital ou dans des cabinets privés ou médecin spécialiste. Ils sont réalisés par des chirurgiens.

- On distingue quatre catégories majeures de prélèvement :
 - Les frottis : grattage (du col de l'utérus...),
 - Les biopsies : fragments de tissu ou d'organe,
 - Les organes en intégralité,
 - Les liquides d'épanchement divers (pleural, ascitique, péricardique, etc.).

Il existe également des techniques de prélèvement plus sophistiquées : par excision, ponction ou microdissection.

b) Fixation :

C'est l'action de tuer les cellules, en évitant tout phénomène agonique, de manière à conserver les structures dans un état morphologique aussi proche que possible de l'état vivant. Une bonne fixation doit éviter tout artefact : apparition d'une structure nouvelle (par coagulation), disparition d'une structure normalement présente (par solubilisation), déformation ou déplacement des constituants cellulaires (par cristallisation) on peut fixer à l'aide de procédés chimiques : Alcool, formol, acide acétique, etc....ou bien par des procédés physiques, comme la congélation brusque (meilleur fixateur).

c) Déshydratation :

Pour déshydrater les tissus, on les plonge dans des alcools de degrés croissants, 70°, 80°, 90°, 100°, pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations.

La paraffine n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine. La paraffine n'est pas 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)
- On remplace l'alcool par le toluène (Substitution)

d) Inclusion :

La coupe ne peut être pratiquée que dans une substance assez dure ; c'est pourquoi on imprègne les tissus d'une substance d'enrobage, en général la paraffine ; l'alcool n'étant pas parfaitement miscible avec la paraffine, on plonge le tissu déshydraté dans un solvant organique intermédiaire miscible à l'alcool et la paraffine, le xylène, puis dans la paraffine

maintenue liquide à l'étuve entre 50 et 60°C. On refroidit alors et on obtient un bloc de paraffine durcie contenant le tissu à examiner.

Cette imprégnation suppose une déshydratation et une substitution de l'eau par l'alcool, solvant de la paraffine. En effet l'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool).

e) Coupe (microtomisation) :

Le bloc de paraffine est découpé en tranches minces à l'aide des microtomes qui sont des appareils permettant de débiter les blocs de paraffine en coupes de quelques microns à quelques dizaines de microns. Les forces de frictions entre couteau et bloc échauffent la paraffine et la mettent en surfusion, ce qui permet de coller les coupes les unes à la suite de l'autre : ruban de coupes sériées. On les recueille sur des lames de verre (porte objets) autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement.

f) Ré hydratation :

Les coupes collées sur 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. Cela permet de les colorer, car la majorité des colorants sont solubles dans l'eau ou dans l'alcool.

g) Coloration :

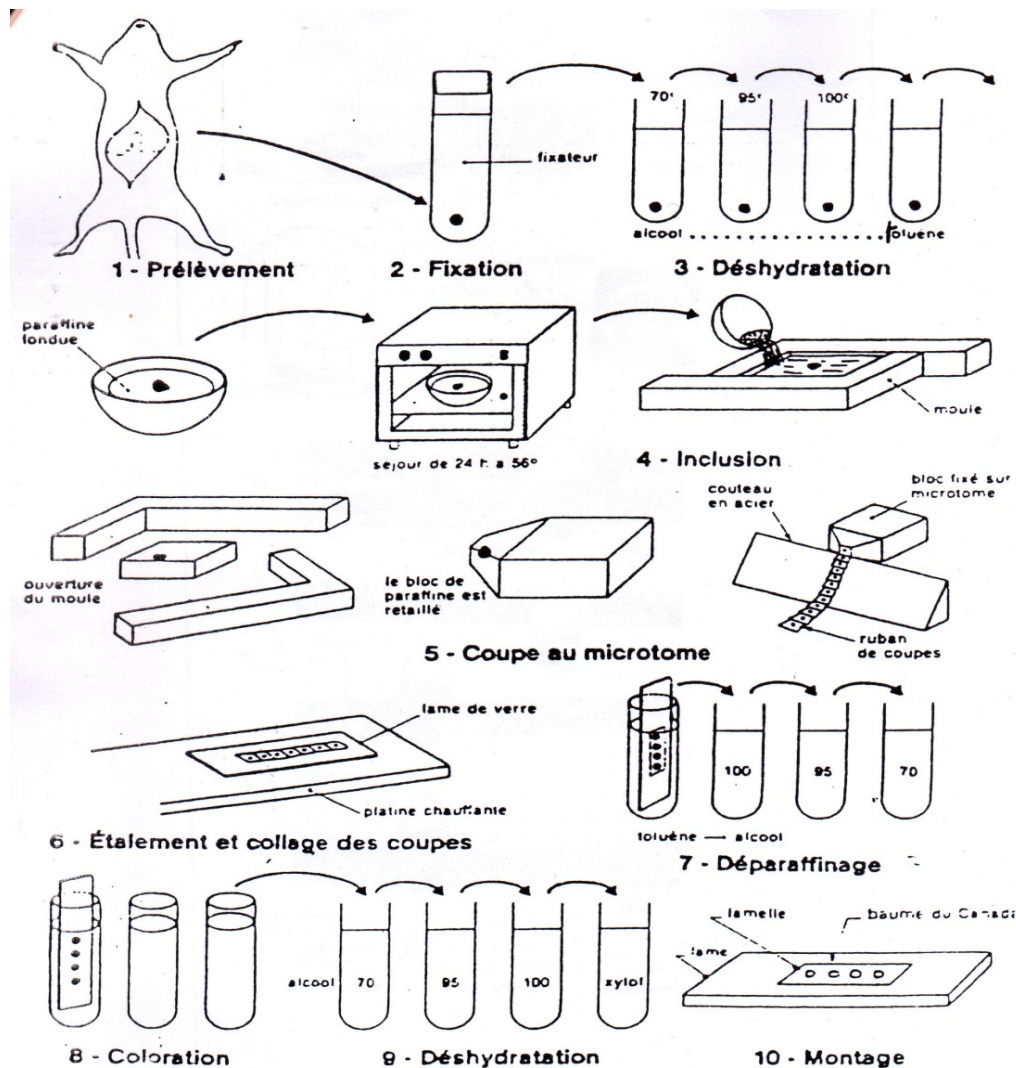
Les objets biologiques coupés et examinés par transparence ne sont pas ou peu colorés: ils offrent très peu de contraste, donc de visibilité, et aucun détail ne peut être perçu. Il faut renforcer le contraste de couleur des différents organites ou mieux les colorer. Cette lame de verre est alors plongée dans un colorant. On dispose nombreux colorants naturels, qui se fixent sur telle ou telle structure de la cellule, par exemple, le vert de méthyle colore en vert la chromatine

On utilise deux catégories de colorants : Les plus courants sont :

l'hématoxyline, qui colore les noyaux cellulaires en bleu violacé

L'éosine, qui colore les cytoplasmes en rose

Les bleus (Bleu de méthylène, de toluidine) sont également employés en routine.



Techniques de préparation de coupes pour le microscope photonique

❖ Examen des échantillons en microscopie électronique

La séquence de manipulation est analogue à celle qui a été exposée pour la microscopie optique.

a) Fixation : encore plus exigeante (les artefacts sont plus visibles), elle est réalisée avec des fixateurs spéciaux, comme : le tétraoxyde d'osmium OsO_4 et le glutaraldehyde $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$. Ce sont les deux principaux fixateurs chimiques utilisés en microscopie électronique.

b) Déshydratation : elle suit le même principe qu'en microscopie optique; mais elle est délicate car les tissus doivent être conservés jusqu'au niveau moléculaire.

c) Inclusion : elle se fait dans un milieu très dur, dans des matières plastiques telle que la résine. Une fois refroidi, durci par polymérisation, on obtient un échantillon solide.

d) Coupe : effectuée sur un ultramicrotome, elle fournit des tranches encore plus minces, de 50 nm.

e) Coloration : c'est plutôt une imprégnation (il n'y a que le noir et le blanc en microscopie électronique) par des sels de métaux lourds, comme les sels de plomb ou d'uranyle, qui augmente le contraste des structures cellulaires.

B : TECHNIQUE DE REPLIQUES

Elle est généralement applicable au MEB et s'effectue en 03 étapes : la congélation de l'échantillon, la cryofracture et l'obtention des réplique.

❖ Examen de répliques après cryofracture et cryodécapage :

Cette technique permet de réaliser une empreinte topographique (réplique) après fracture d'un échantillon congelé. Elle permet l'obtention d'une simple ou d'une double réplique (moulage des deux faces de la fracture).

Le tissu est fracturé après fixation à basses températures, le trait de fracture présente des reliefs dus à l'hétérogénéité des constituants cellulaires. Ceux ci sont accentués par la projection selon une incidence rasante (ombrage) d'une fine couche métallique. Celle ci est ensuite détachée et constitue une réplique qui peut être examinée au microscope. On a alors une idée des reliefs de la surface d'un organite ou même d'une membrane si la fracture l'a délamainée (coupe tangentielle).

Elle est généralement applicable au MEB et s'effectue comme suit :

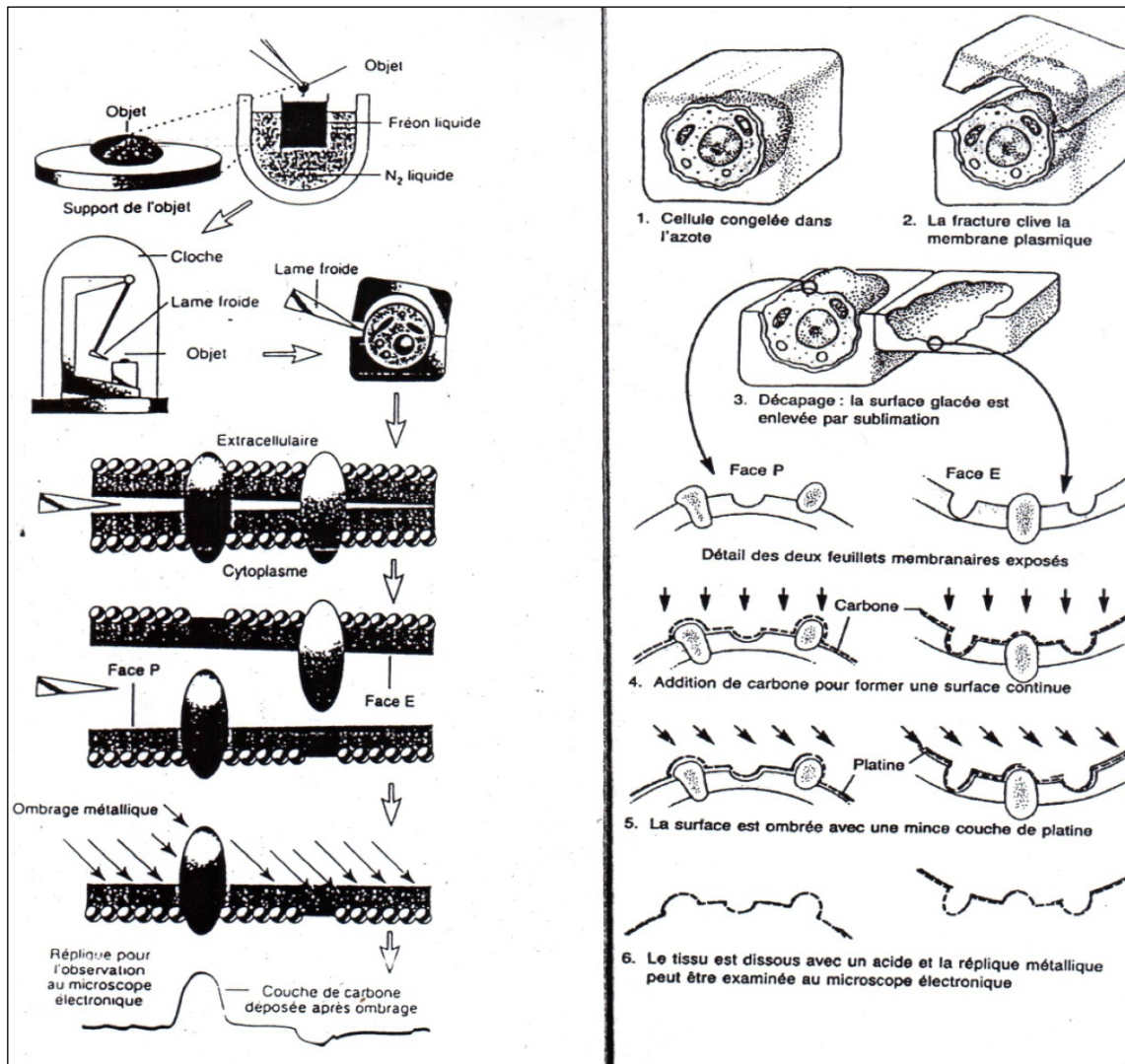
La congélation de l'échantillon, la cryofracture, le décapage, ombrage et obtention de la réplique.

Les tissus prélevés sont congelés rapidement sans fixation ou après fixation. A fin d'éviter les dégâts provoqués par la formation de cristaux de glaces, les tissus sont imprégnés de substances telles que le glycérol, puis congelés rapidement dans des liquides à température très basses comme le fréon liquide, dont le point de fusion se situe à -150°C ou en plaçant l'échantillon au contact d'un bloc de métal refroidi dans l'hélium liquide. Quand le tissu est congelé, on l'observe souvent par la technique de la réplique de **cryofracture**, illustrée dans la figure ci-dessous. De petits fragments de tissus sont mis sur un petit disque métallique et congelé rapidement, le disque est ensuite placé dans un support spécial et le bloc de tissu congelé est frappé par une lame, provoquant à partir du point de contact une fente qui clive le tissu en deux parties.

Quand le plan de fracture traverse une cellule composée d'organites très divers, de composition différente. Ces structures ont tendance à dévier le plan de fracture, vers le haut ou vers le bas, provoquant dans les surfaces des protubérances, des dépressions et des crêtes qui reflètent les contours du protoplasme traversé. En d'autres termes, les surfaces exposées par la fracture donnent des informations sur le contenu de la cellule. Le but est de rendre visibles ces informations. Pour ce faire, la technique de la réplique utilise la surface de fracture comme un moule sur lequel on dépose une couche de métal lourd. Le métal est déposé à la surface du tissu congelé qui vient d'être exposée dans l'enceinte même qui a servi à produire la fracture. Le métal est déposé sous un angle qui accentue la topographie locale par ombrage. On dépose ensuite une couche de carbone au dessus de la couche métallique directement à partir du haut, plutôt que latéralement, de manière à obtenir une couche uniforme de carbone qui cimente les plages métalliques dans un film continu. Quand on a ainsi obtenu un moulage de la surface, on peut faire fondre le tissu qui a servi de modèle, l'enlever et l'éliminer ; c'est la réplique de métal et de carbone qui est placée sur la grille et observée dans le faisceau d'électrons.

Par conséquent, cette technique convient particulièrement pour étudier l'intérieur des membranes.

La réplique de cryofracture est, par elle-même, une technique extrêmement utile, mais elle peut encore servir pour donner plus d'informations quand on y ajoute une étape de **cryodécapage**. Au cours de cette étape, l'objet congelé et fracturé, toujours dans la chambre froide, est placé sous vide à une température élevée pendant une ou quelques minutes : une couche de glace superficielle s'évapore (sublimation). Après l'élimination de l'eau, la surface de la structure peut être recouverte par un métal lourd.



Préparation de répliques de cryofracture pour l'observation au microscope électronique

VI : TECHNIQUES DE COLORATION

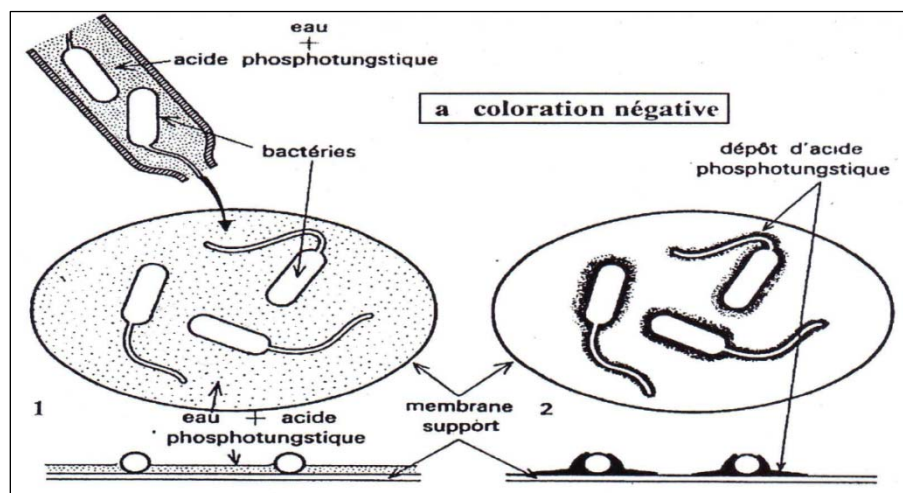
Le microscope électronique convient tout autant pour l'étude de très petites particules, comme les virus, les ribosomes, éléments de cytosquelette et complexes protéiques. On peut également mettre en évidence la forme des protéines et acides nucléiques individuels au microscope pour autant qu'ils ont leur propre contraste suffisant. Un des meilleurs moyens de rendre ces substances visibles est l'utilisation de techniques de coloration négative. Il y a

également une autre technique largement utilisée pour rendre visible de très petites particules isolées est leur ombrage.

A : LA COLORATION NEGATIVE

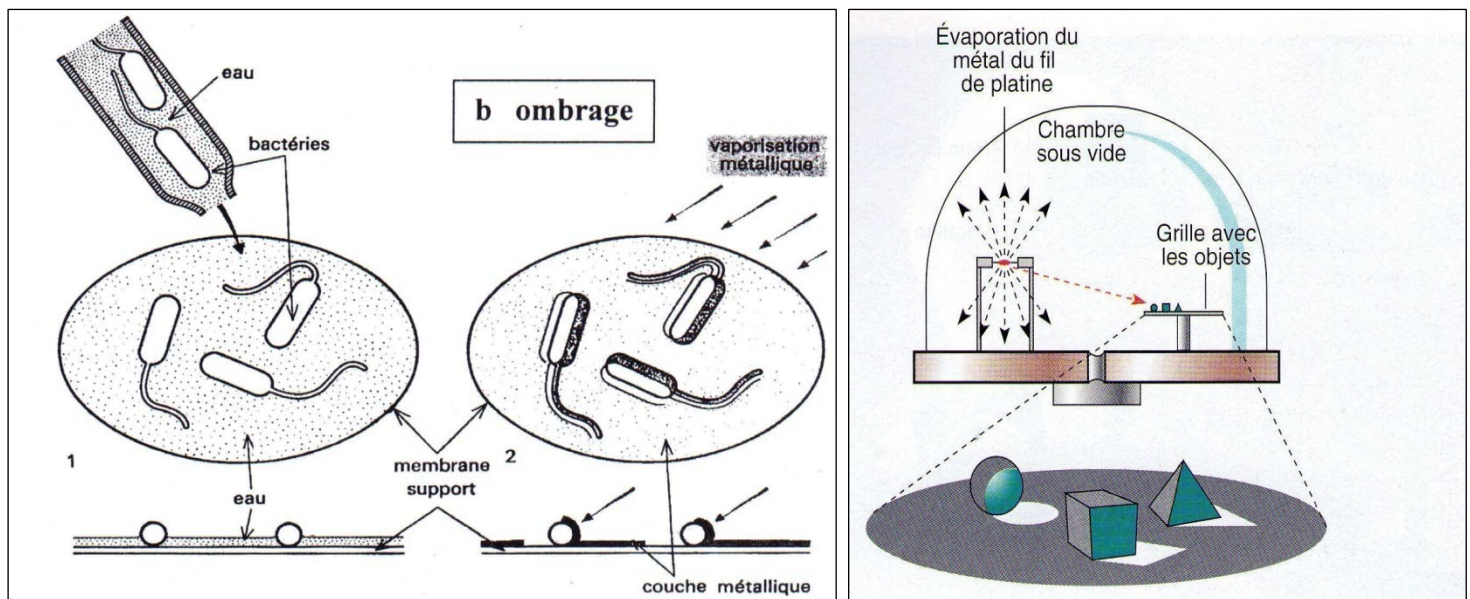
Les échantillons minces (de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur) sont adsorbés sur une grille métallique recouverte d'un film de carbone fin (quelques nanomètres). Ce sont typiquement des complexes protéiques ou des virus.

On forme un dépôt de métal lourd sur toute la surface de la grille sauf aux endroits où se trouvent les particules. Par conséquent, la structure de l'objet se distingue par sa clarté relative sur l'écran fluorescent. Dans cette technique, on place une goutte de colorant (acétate d'uranyle ou phosphotungstate de potassium) sur une grille qui porte les particules à étudier et on laisse s'évaporer la plus grande partie de la goutte. A cause de la tension superficielle, le colorant a tendance à envelopper la particule sur le film qui le supporte et pénétrer dans toutes les irrégularités qui s'ouvrent à la surface de la particule. Le reste de la particule recueille peu de colorant. De par sa forte masse atomique, le colorant dévie les électrons dans le diaphragme objectif. Ainsi l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure, d'où le nom de coloration négative. L'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre sur les photographies.



B : L'OMBRAGE

Une autre technique largement utilisée pour rendre visible de très petites particules isolées est leur ombrage. Les grilles sont placées dans un espace fermé, où l'on fait le vide. Dans la chambre se trouve un filament composé d'un métal lourd (généralement le platine) avec du carbone. Le filament est porté à haute température, ce qui provoque son évaporation et le dépôt d'un revêtement métallique sur toutes les surfaces accessibles dans la chambre. Le métal se dépose donc sur les surfaces qui font face au filament, tandis que les surfaces opposées de l'objet et les parties du support qui sont dans l'ombre restent non revêtues et incapables de diffracter les électrons. Par conséquent, les zones qui sont dans l'ombre sont éclairées sur l'écran, alors que les régions couvertes de métal sont foncées. Cette relation est inversée sur la plaque photographique, qui est le négatif de l'image. Par conséquent, on représente les préparations ombrées en imprimant une image négative dans laquelle la particule paraît éclairée par une vive lumière blanche (correspondant à la surface revêtue), avec une ombre foncée produite par la particule. Cette technique donne un très bon contraste pour un matériel isolé et produit une impression d'image en trois dimensions (3D).



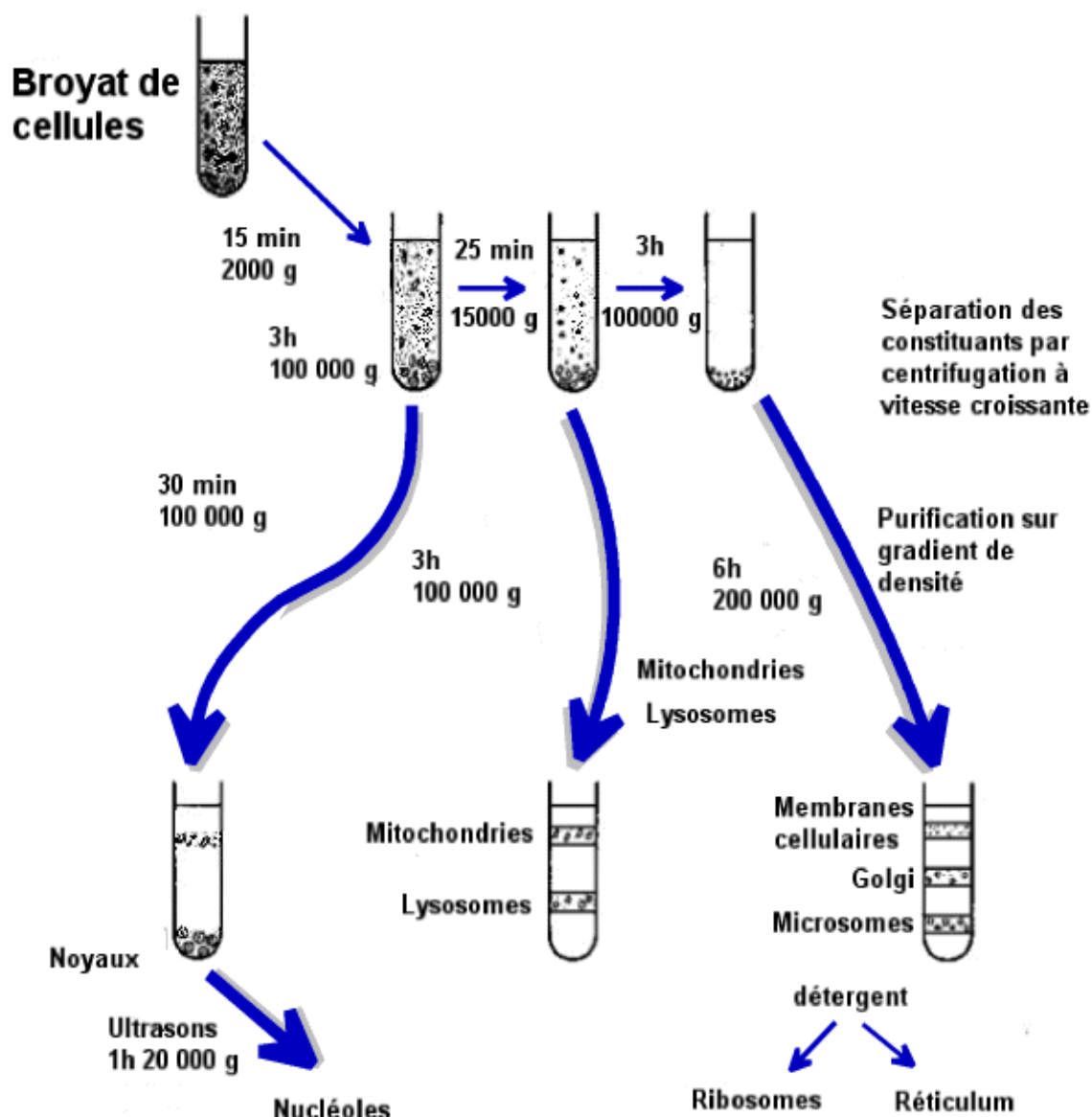
V : TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES ORGANITES

Fractionnement cellulaire

Afin d'analyser leur structure ou leur composition, il peut être intéressant de séparer les différentes structures présentes dans la cellule.

Pour ce faire, on broie une culture de cellules. La séparation des constituants peut alors se faire par centrifugation. Soumis à l'effet centrifuge, les structures les plus massives se rassemblent dans le fond du tube en rotation.

L'accélération centrifuge est exprimée en multiples de l'accélération de pesanteur terrestre notée **g**. L'accélération à laquelle on soumet les échantillons atteint des valeurs de 100 000 à 200 000 g.



Les différentes fractions issues de la centrifugation peuvent ensuite être identifiées et analysés chimiquement.

N B : Les techniques histologiques, cytologiques, coloration négative et ombrage, renseignent sur la morphologie des cellules et de leurs organites, alors que les techniques d'Autoradiographie et de fluorescence renseignent sur la physiologie de la cellule.