

METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE

1ère PARTIE :

METHODES D'ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES CELLULES

Introduction

La plupart des méthodes sont basées sur l'emploi des microscopes, la taille des cellules et de leurs constituants est en effet généralement trop petite pour qu'il soit possible de les observer à l'œil nu. Il existe toute une gamme de microscopes.

1. Les microscopes

1.1. Les microscopes à lumière ou microscopes photoniques

Les parties des microscopes la figure ci-dessous montre les différentes parties des microscopes optiques



Il existe divers types de microscopes à lumière :

- les uns permettent l'**observation directe de structures** dont les dimensions sont de l'ordre de $0,2 \mu\text{m}$ ce sont les **microscopes par transmission** ;
- les autres microscopes donnent des **informations indirectes** sur l'ultrastructure des cellules = **microscope à lumière polarisée, microscope à fond noir et microscope à contraste de phase.**
- le microscope confocal à balayage

1.1.1. Microscopes par transmission

Le microscope le plus courant utilise la lumière visible (lumière blanche constituée de plusieurs longueurs d'onde) qui est transmise directement sur la prépa biologique.

Ces microscopes sont équipés de système de lentilles qui condensent la lumière sur la préparation à observer.

Les échantillons biologiques observés sont traversés par la lumière.

Tous les microscopes sont caractérisés par leur **pouvoir séparateur = pouvoir de résolution** c'est à dire la **distance limite appréciable entre 2 points = aussi limite de résolution**. Pour l'oeil humain, cette distance limite appréciable est de **100 à 200 µm**. Un **microscope photonique** à transmission distingue des objets tout au plus distant de **0,2 µm**.

Le pouvoir séparateur d'un microscope est donné par la formule d'Abbe :

$$e = (0,61 \cdot \lambda) / (n \cdot \sin u)$$

e = distance limite appréciable = limite de résolution

λ = longueur d'onde de la lumière utilisée (400 nm = violet ---> 800 nm = rouge)

n = indice de réfraction du milieu transparent

u = moitié de l'angle d'ouverture du cône lumineux entrant dans l'objectif

0,61 = constante

Pouvoir séparateur élevé <-----> distance limite appréciable petite

D'après cette formule on voit que le pouvoir séparateur est d'autant plus grand c'est à dire la distance limite appréciable plus petite que la longueur d'onde des radiations utilisées est petite ou que u et n sont plus grands.

La limite extrême de résolution d'un microscope photonique est donc fixée par la longueur d'onde de la lumière, qui varie d'environ 0,4 µm à 0,7 µm selon sa couleur.

Concrètement, une bactérie ou une mitochondrie qui mesurent environ 0,5 µm de largeur sont les plus petits objets clairement observables au microscope photonique.

Des détails plus fins sont masqués par des effets de diffraction optique.

1.1.2. Les autres microscopes photoniques

L'observation d'échantillons biologiques en microscopie photonique par transmission nécessite des étapes de préparation. Elles ont pour but de rendre l'échantillon :

- mince pour que la lumière puisse le traverser (confection de coupes) ;
- et contrasté pour qu'il puisse absorber la lumière davantage que le milieu ambiant (coloration).

Les traitements utilisés ne permettent pas de conserver vivantes les cellules.

*** Le microscope à contraste de phase = microscope à interférence différentielle**

Le microscope à contraste de phase est équipé d'un système optique, appelé **plaques de phase** qui **permet d'exploiter les propriétés de diffraction des cellules.**

Quand la lumière passe à travers une cellule vivante, si les structures sont peu épaisses l'onde n'est pas arrêtée (= absorbée) mais la phase de l'onde est modifiée, elle est retardée et changera donc de phase par rapport à la lumière ayant traversé une région voisine plus mince.

L'intérêt de ce microscope = Ce microscope amplifie de faibles différences d'indice de réfraction, il **permet d'observer des cellules vivantes sans coloration donc sans qu'il y ait eu de formation d'artéfacts** (= structure artificielle apparue suite aux traitements imposés aux cellules lors de leur préparation pour l'observation).

*** Le microscope à fond noir**

Un façon plus simple de voir les détails d'une cellule non colorée, que l'utilisation du microscope à contraste de phases, **consiste à utiliser la lumière dispersée par les divers constituants cellulaires** (= lumière diffractée).

Les rayons incidents qui traversent la préparation ne pénètrent pas dans l'objectif, seuls pénètrent dans l'objectif les rayons diffractés.

On peut ainsi observer les régions des cellules qui diffractent fortement la lumière. Elles apparaissent très brillantes sur un fond obscur donné par les régions très peu diffractantes. Il est donc possible de voir des structures de taille inférieure au pouvoir séparateur du microscope mais sans en discerner la forme ; on met juste en évidence leur existence ----> donne information indirecte sur les structures.

*** Le microscope à lumière polarisée**

La source lumineuse est constituée par un faisceau dont les vibrations sont situées toutes dans un même plan appelé plan de polarisation.

En éclairant un échantillon avec de la lumière polarisée, il est possible de mettre en évidence les régions biréfringentes de la cellule.

La biréfringence = propriété que possède une structure de dédoubler un rayon lumineux polarisé en deux nouveaux rayons, tous deux polarisés suivant des plans de vibration perpendiculaire et se propageant à la même vitesse. Ces deux rayons sont donc caractérisés par des indices de réfraction distincts ; la biréfringence représente exactement la différence entre les deux indices.

La biréfringence est liée à la présence de structures ou de molécules asymétriques rangées régulièrement, mais que l'on ne peut pas distinguer avec un microscope à lumière par transmission puisque leur taille est bien inférieure à son pouvoir séparateur.

*** Le microscope à rayons UV (= à fluorescence)**

Le pouvoir séparateur de ce microscope est supérieur à celui du microscope photonique ordinaire (utilisant la lumière blanche) puisqu'il utilise, **pour éclairer la préparation, les rayons UV** caractérisés par une longueur d'onde plus faible.

UV usuels = 390 à 200 nm

UV courts = 200 à 100 nm

La distance limite appréciable avec ce microscope peut descendre jusqu'à 0,06 μm (60 nm = 6000 Å).

Dans un microscope à fluorescence les lentilles sont en quartz (le verre s'oppose au passage des UV).

L'observation se fait sur un écran fluorescent où l'image obtenue peut être photographiée.

NB : Le microscope à fluorescence peut aussi exploiter la propriété de fluorescer de certaines préparations :

Fluorescence = propriété d'émettre une lumière de fluorescence qui se caractérise par une longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde de la lumière d'éclairement.

- Fluorescence primaire : mise en évidence de constituants naturels ayant la propriété de fluorescence. C'est surtout le cas pour des préparations botaniques et minéralogiques.

- Fluorescence secondaire : c'est une fluorescence artificielle créée par imprégnation des éléments à observer par des fluorochromes qui ne se fixent que sélectivement sur certains constituants ou qui se fixent spécifiquement sur des constituants car ils ont été greffés sur des molécules d'anticorps dotées d'une spécificité de reconnaissance. Ces techniques sont illustrées par les tests immunologiques d'immunofluorescence que l'on étudiera plus tard.

* Le microscope confocal à balayage

- observation **d'échantillons massifs**
- marquage = coloration par sondes **fluorescentes**
- source lumineuse = **rayon laser**
- éclairage en un point de la préparation = foyer d'excitation = **point focal**
- déplacement du point focal d'éclairage à l'intérieur de l'échantillon
- **émission de fluorescence** suite à l'éclairage au point observé
- seule la fluorescence du point focal est recueillie = focalisation de la lumière d'émission dans le détecteur = **foyer d'émission = point confocal** (qui va avec le point focal)
- balayage du faisceau lumineux dans le plan = analyse du plan
- observation sur plusieurs plans focaux = analyse épaisseur
- **traitement informatique des images séquentielles**
- résultat = **image en trois dimensions** de l'échantillon.

1.2. Les microscopes électroniques

1.2.1. Généralités

* Principe :

- L'échantillon à observer est bombardé par un flux d'électrons (ë).
- Emploi d'ë en mouvement à la place de la lumière. Comme pour la lumière, (= flux de particules énergétiques = photons en mouvement), les ë se déplacent selon une onde = onde de matière. **La longueur d'onde du flux d'ë dépend de la tension à laquelle sont soumis les « ë ».**

La longueur d'onde d'un ë diminue quand la vitesse de déplacement de l' « ë » augmente.

- La source d'ë est un filament chauffé = cathode.
- Le flux d'ë est dévié par des champs magnétiques qui le focalisent comme les lentilles de verre le font pour la lumière dans le microscope photonique.
- L'image est perceptible grâce à un écran fluorescent.
- Ces images peuvent être photographiées et sont souvent agrandies ensuite.

* Performances :

La limite de résolution imposée par la longueur d'onde de la lumière visible peut être abaissée car **les « ë » en mouvement créent une onde de longueur d'onde plus courte que celle de la lumière.**

La limite de résolution d'un microscope électronique sera donc plus petite et le pouvoir séparateur plus élevé que celui d'un microscope photonique.

Dans un microscope électronique possédant une **tension d'accélération de 100 000 volts**, la **longueur d'onde de l' « ë » est de 0,002 nm** c'est à dire 200 000 fois plus petite que la plus petite longueur d'onde de la lumière (400 nm = 200 000 x 0,002).

En théorie la résolution d'un tel microscope devrait être d'environ 0,002 nm.

- Toutefois du fait que les aberrations des lentilles électroniques sont considérablement supérieures aux lentilles de verre, le pouvoir séparateur de la plupart des microscopes électroniques est bien moins élevé, la limite de résolution est donc nettement supérieure à la longueur d'onde de l' « ë » en déplacement (*au mieux, elle serait de 0,1 nm*).

- De plus, les altérations causées lors de la préparation de l'échantillon (coupes, obtention de contrastes) et les dégâts causés par l'irradiation limitent la résolution des objets biologiques à environ **2 nm. (20 Åm)**. **C'est 100 fois mieux que la résolution du microscope photonique.**

(Rappel : avec l'objectif à immersion d'un microscope photonique par transmission on a $\lambda = 0,2 \mu\text{m} = 200 \text{ nm}$).

Lorsque les préparations sont observées sous des tensions très élevées, **microscope haute tension**, le pouvoir séparateur peut atteindre **5Åm**.

- **Les grossissements obtenus sont très élevés 500 000 fois le diamètre pour 1000 fois en microscopie photonique.**

* Inconvénients :

- Les \ddot{e} ne se propagent que dans le **vide très poussé** ce qui **empêche toute observation sur le vivant** ;
- La **pénétration des \ddot{e} dans la matière est très faible**, donc les **coupes doivent être très minces** (de l'ordre de 0,06 à 0,09 $\mu\text{m} \sim 0,1 \mu\text{m}$ pour 2 à 5 μm en microscopie photonique) ;

* Il existe deux types de microscope électronique.

- Le microscope électronique par transmission ;

- Le microscope électronique à balayage.

1.2.1 Le microscope électronique par transmission

L'objet à observer est placé sur le trajet du faisceau d' \ddot{e} .

Selon la densité locale du matériel, certains \ddot{e} qui traversent l'échantillon sont déviés, ils ne figurent pas sur l'image. Les régions denses de l'échantillon se distinguent donc par des zones de flux électronique réduit c'est à dire zones + ou - sombres sur l'image.

Les \ddot{e} qui traversent l'échantillon sont, eux, focalisés pour former une image, soit sur un écran fluorescent, soit sur une plaque photo.

Ce sont donc les \ddot{e} qui traversent l'échantillon qui contribuent directement à la formation de l'image. On ne peut qu'observer des objets très minces, généralement **on s'adresse à des coupes.**

1.2.2. Le microscope électronique à balayage

Les échantillons sont bombardés par un faisceau d' \ddot{e} , mais seuls sont utilisés pour la **formation de l'image, les \ddot{e} qui sont réémis par la surface de l'échantillon.**

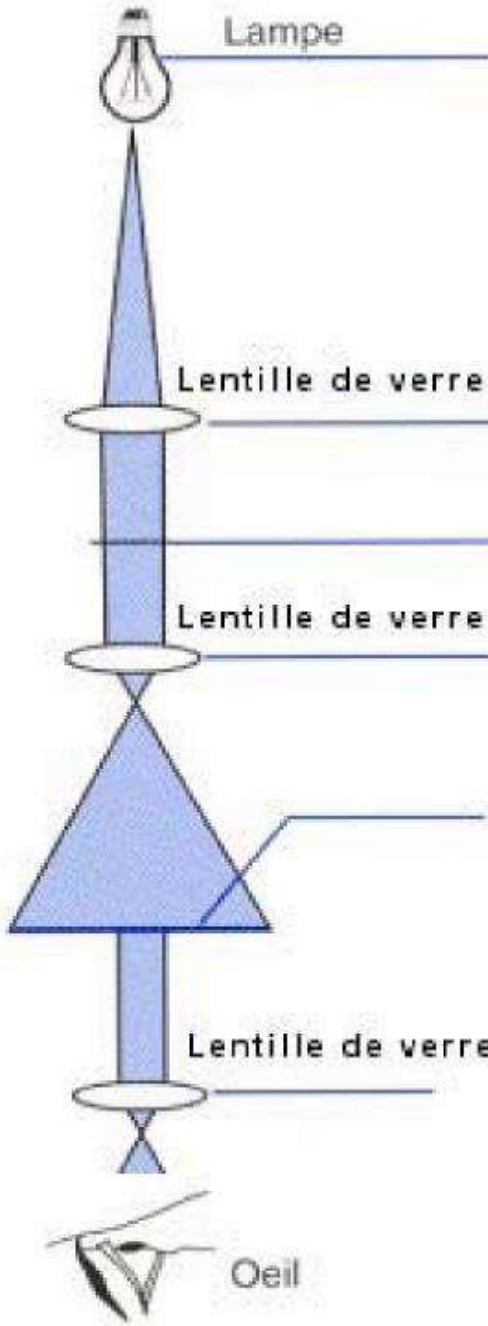
A la différence du microscope électronique par transmission, il est donc possible d'étudier des **échantillons massifs** dont seule la surface est observée.

Pratiquement, la surface de l'objet est balayée par un faisceau très fin d' \ddot{e} , d'où le nom donné à l'instrument.

Un récepteur recueille les \ddot{e} réémis par la surface de l'objet et donne un signal qui, après amplification, module l'intensité d'un faisceau qui balaie un écran de télévision en synchronisme avec le balayage du faisceau d' \ddot{e} .

L'image obtenue sur l'écran de télévision donne avec une très grande profondeur de champ une **vue tridimensionnelle de la surface de l'échantillon** avec une **résolution de l'ordre de 250Åm**.

Microscope optique



Microscope électronique

