

Méthodes d'étude des cellules

I. 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 traitement. 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, cryodécoupage etc...

1. Microscopie optique ou photonique

1. 1. Définition

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 de 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.

1.2. Principe du fonctionnement du microscope :

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. 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.

1.3. 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 fines. Les coupes exigées en (MO) varient entre 2 μm à 10 μm et de 0,03 μm à 0,05 μm pour le (ME)
- **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).

2. Microscope électronique

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf qu'au lieu des photons, ce microscope fonctionne 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 $\text{\AA}$. On aura donc accès à l'ultra structure des organites.

2.1. 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

- Il est similaire au microscope optique mais, il utilise une source d'électrons et des lentilles électromagnétiques.
- Les électrons sont accélérés dans un tube entre une anode située dans la partie basse et la cathode située dans la partie haute.
- L'observation se fait sur photos ou sur écran.
- Le pouvoir de résolution théorique est de 0,1 nm, le grossissement possible est de 10 000 à 200 000 fois.
- L'objet à étudier doit être très fin, de l'ordre de 50 à 100 nm.

B. Microscopie à balayage

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.

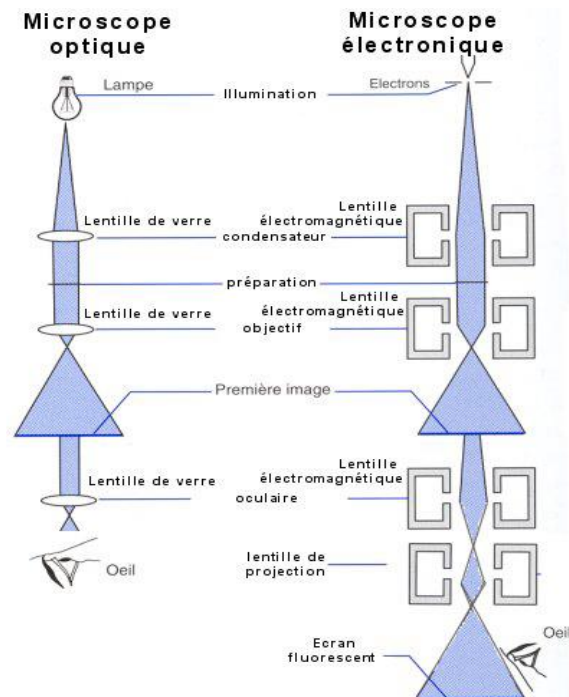


Figure 1. Comparaison entre le microscope photonique et électronique

M. OPTIQUE	Caractéristiques	M. ELECTRONIQUE
*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		* grossissement : 1500à 200000 fois * pouvoir séparateur : 10Å° * Préparation traversée par les électrons * longueur d'onde : variable de l'ordre de 0,05 Å° * les lentilles sont des champs magnétiques * image : est reçue sur écran fluorescent * les coupes à l'ultramicrotome : 0,05µm
Avantages		
* on peut voir la cellule en entier * on peut observer une cellule vivante * on peut utiliser des colorants et voire des couleurs réelles		* 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		
* on ne peut pas pousser l'analyse assez loin		* la cellule est morte * on a pas une vue d'ensemble - des structures artificielles (artefacts) apparaissent
Unités		
*l'unité est le micromètre ou micron (µm) 1µm = 10⁻³ mm		* l'unité est le nanomètre (nm) 1nm = 1 millimicron = 10⁻⁶ mm ou 10⁻⁹ m