

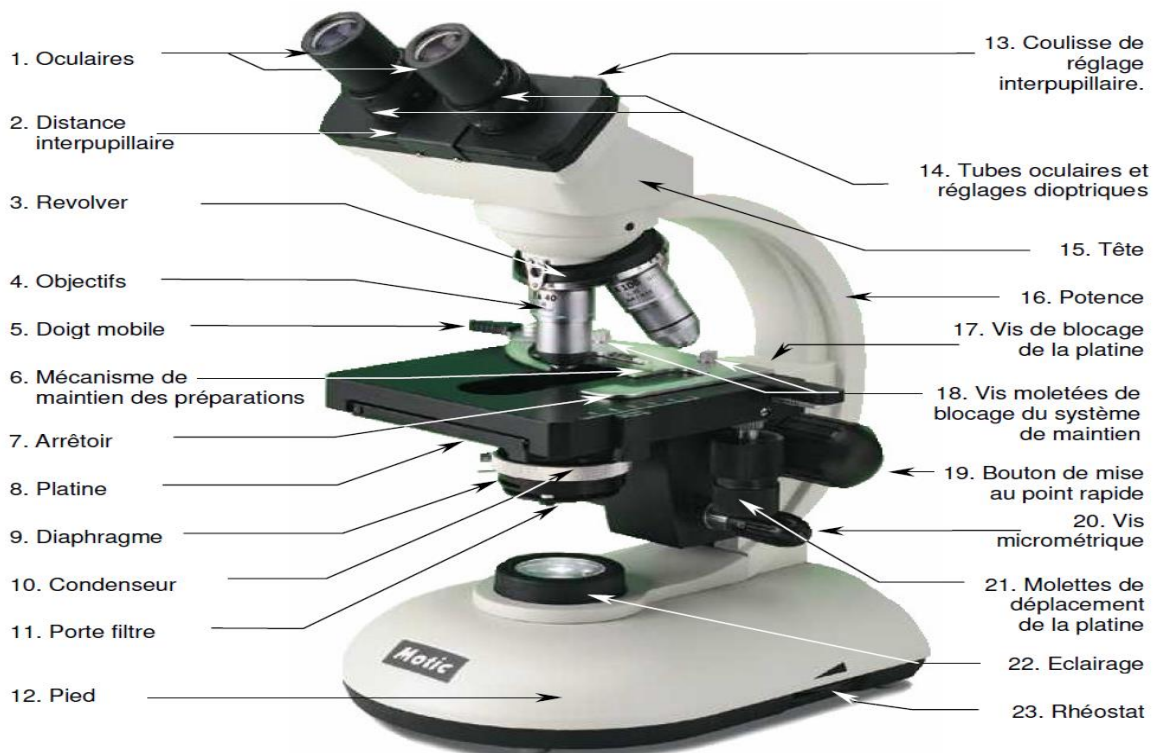
# TP n°1 : Microscope Photonique

## Microscope Photonique.

**But :** Obtenir une image agrandie d'un échantillon traversé par **un faisceau de photons condensé et dirigé**.

**Principe :** Basé sur l'utilisation **de lentilles en verre** condensatrices (pour le faisceau de photons) et grossissantes (pour l'image réelle)

## Description du Microscope Photonique



## Formation de l'image agrandie

**Grossissement du MP = Grossissement de l'objectif X Grossissement de l'oculaire.**

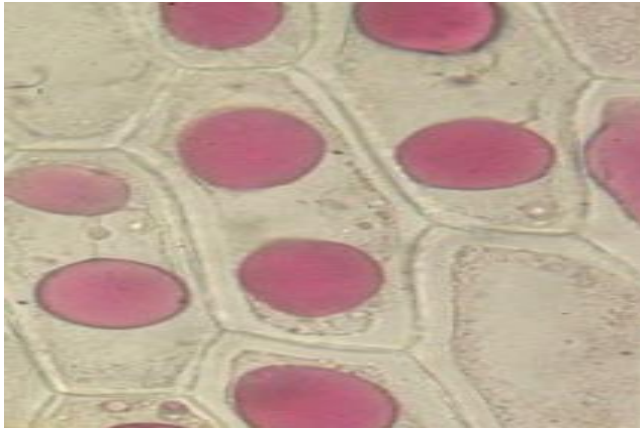
Le pouvoir séparateur (ou pouvoir de résolution) du microscope photonique

C'est la distance minimale entre deux points en dessous de laquelle ils se seront plus distincts.

Microscope photonique 0,2  $\mu\text{m}$  ou 200 nm

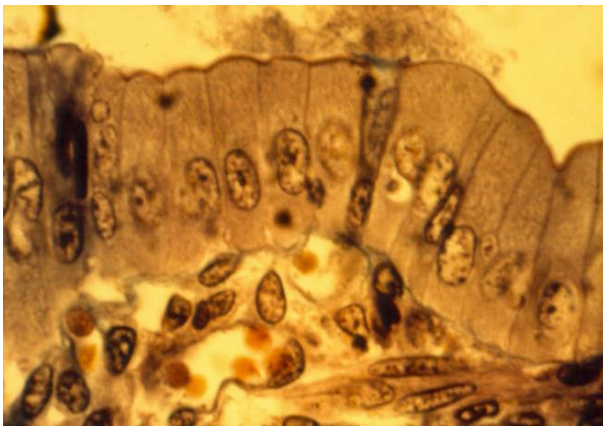
## Types d'observation au Microscope Photonique

### Observation Vitale



Observation vitale des cellules épidermiques d'écaïlle de bulbe d'oignon (*Allium cepa*) dans une goutte d'eau salée (cellules plasmolysées) observée au microscope photonique Gx 400.

### Observation Fixée technique histologique



Epithélium de revêtement prismatique unistratifié, à plateau strié et à cellule caliciforme muqueuse G x 400

À l'issu des deux observations, pensez-vous que le microscope photonique est le bon instrument pour l'étude de la cellule ?

## B. TECHNIQUES DE COUPES HISTOLOGIQUES

**1. But :** pour un examen morphologique des cellules ou d'échantillons biologiques (tissus) en microscopie photonique, des procédés préparatoires de l'échantillon sont nécessaires.

**2. Etapes :** toutes les étapes sont résumées dans la **figure1**.

**2.1. Prélèvement sur le vivant :** on distingue quatre catégories majeures de prélèvement : les frottis (ou grattage), les biopsies (fragments de tissu ou d'organe), les organes en intégralité et les liquides d'épanchement divers (pleural, sciatique, péricardique, etc.).

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

**2.1. 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. On peut fixer à l'aide de procédés chimiques (alcool, formol, acide acétique, ...) ou bien par des procédés physiques, comme la congélation brusque.

**2.2. Déshydratation :** pour déshydrater les tissus, on les plonge dans des alcools à degré croissant (70°, 80°, 90° et 100°) pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations.

**2.3. 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. Celle-ci n'est pas miscible à l'eau, la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant l'inclusion dans la paraffine.

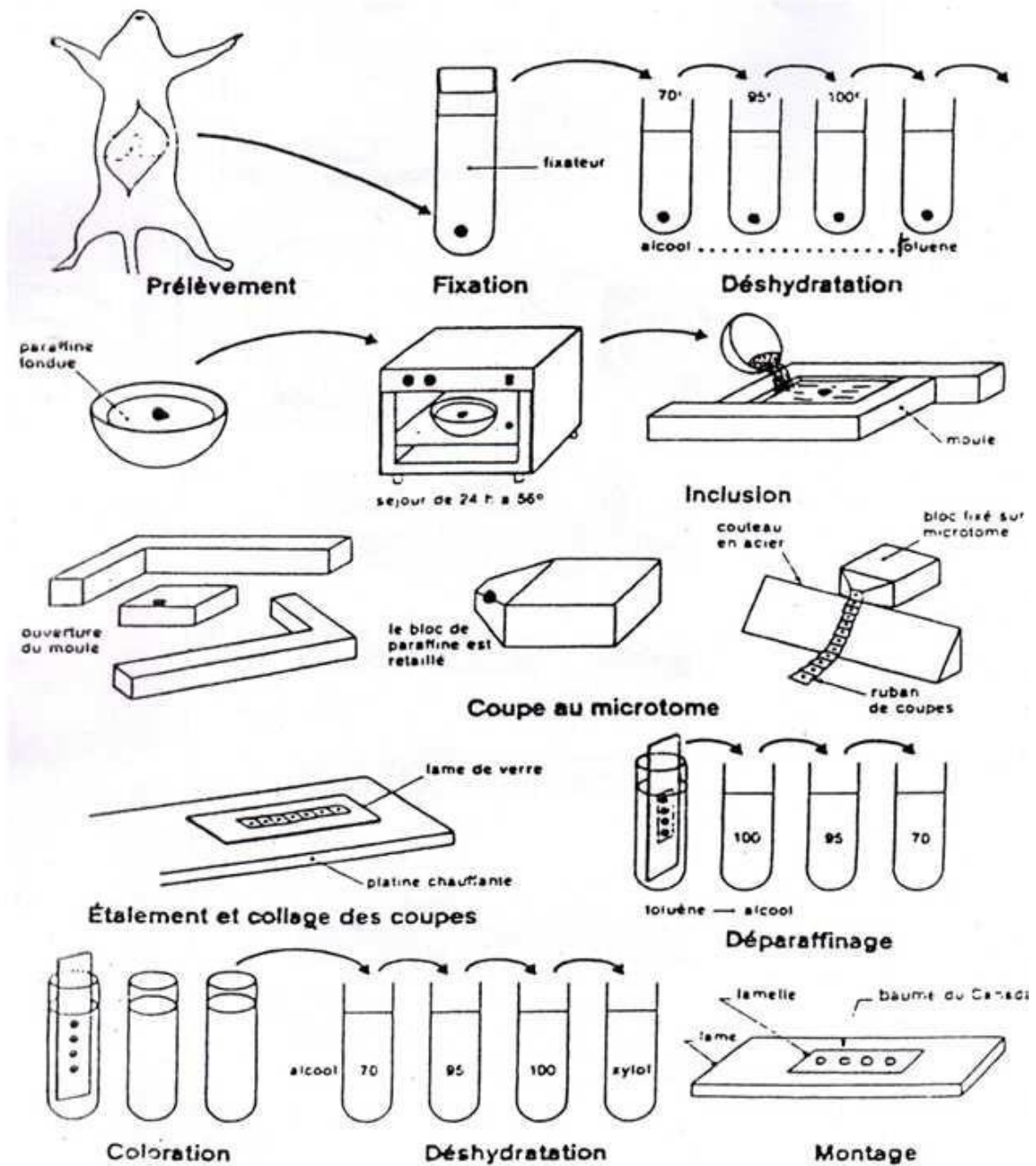
Cette dernière n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation. A la dernière étape on remplace l'alcool par du toluène (substitution), on plonge le tissu déshydraté dans la paraffine maintenue liquide à l'étuve entre 50 et 60°C. On refroidit alors et on obtient un bloc de paraffine durcie contenant le tissu à examiner.

**2.4. Réalisation de Coupes :** le bloc de paraffine est découpé en tranches minces à l'aide d'un microtome, appareil permettant de découper les blocs de paraffine en coupes de quelques microns à quelques dizaines de microns sous forme de ruban de coupes sériées. On les recueille sur des lames en verre autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement.

**2.5. Réhydratation :** les coupes collées sur la 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.

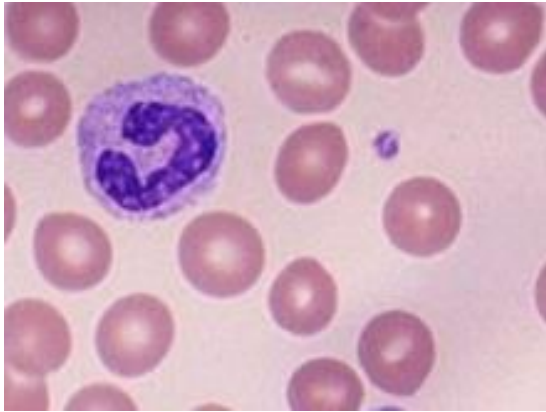
**2.6. Coloration :** les lames de verre contenant les coupes à observer sont plongées dans un colorant. On dispose de nombreux colorants naturels (ex. le vert de méthyle colore en vert la chromatine, l'hématoxyline colore les noyaux cellulaires en bleu violacé, l'éosine colore le cytoplasme en rose et autres : bleu de méthylène et bleu de toluidine).

**2.7. Observation au microscope photonique**

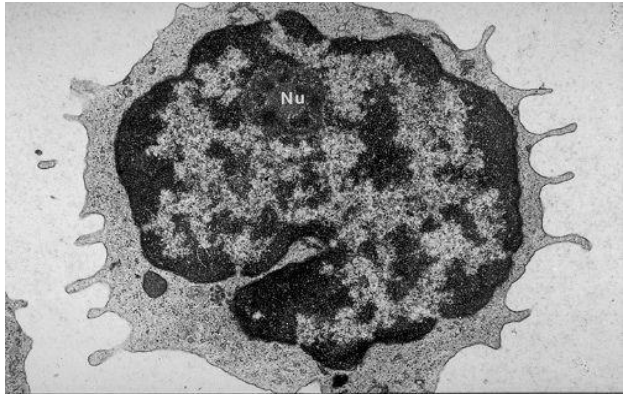




## TP 2 : Microscope électronique



Observation de cellules sanguines au microscope photonique mettant en évidence un monocyte, technique du Frottis sanguin. Gr x 400

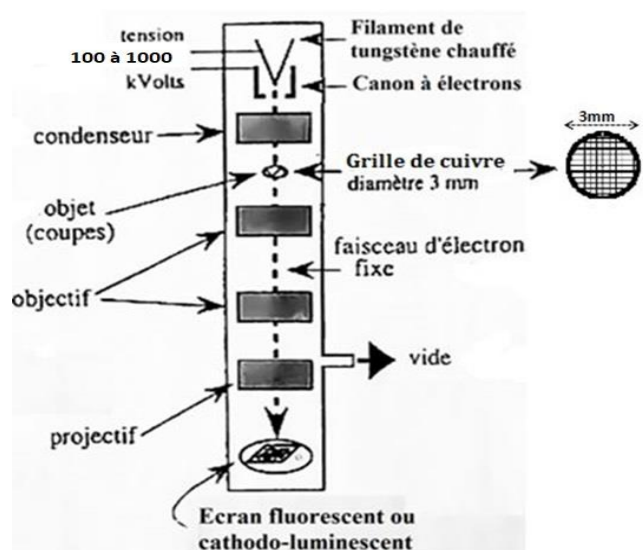


Observation de l'ultrastructure d'un monocyte au Microscope électronique à transmission, technique cytologique. Gr x 20 000

Document 1 : permet d'avoir une **vue générale du tissu = observations histologique**.

Document 2 : présente une **vue de détail de la cellule = observation Cytologique**.

### Microscope électronique à transmission (MET)



- l'échantillon est traversé par un **faisceau d'électron**
- Le **pouvoir séparateur** est de l'ordre de **0.2 nm**
- Le traitement du faisceau d'électron est assuré par différentes sortes de **systèmes électromagnétiques**
- Le **grossissement** varie de **2000 à 500 000 fois**.
- **Les coupes** doivent être **très minces (500Å°)**.
- le faisceau d'électron qui traverse la préparation génère une **image non visible** qui sera **convertie** en **image visible** sur un *écran cathodo-luminescent*.

### Formation de l'image en microscopie électronique à transmission

La densité de l'image correspond à une **zone qui a retenu les électrons** (zone opaque aux é).

- **La clarté** de l'image correspond à une **zone qui a laissé passer les électrons** (zone transparente aux é)

## C. TECHNIQUE DES COUPES MINCES OU CYTOLOGIQUES

**1. But** : obtenir à partir d'un échantillon parfaitement conservé de coupes suffisamment minces (500 à 700Å) pour être transparentes aux électrons, et suffisamment contrastées, pour donner une image nette à l'écran (ou la micrographie).

### 2. Etapes

**2.1. Fixation** : la fixation a pour but la conservation (après la mort) des ultrastructures cellulaires sans altération (c'est à dire aussi proche du vivant). On fixe les cellules *in vivo* à l'aide de produits chimiques (tetroxyde d'osmium :  $\text{OsO}_4$  ou du glutaraldéhyde :  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ) ou d'agents physiques (propane liquide à  $-196^\circ$ , l'hélium liquide à  $-272^\circ$ ). Il s'agit d'une étape critique qui conditionne le succès de l'étude cytologique.

**2.2. Rinçage**: le rinçage à l'eau permet d'éliminer le fixateur en lui substituant une solution de même pH. Il faut effectuer plusieurs rinçages successifs.

**2.3. Déshydratation** : elle permet de débarrasser les pièces de leur eau en les plongeant dans des bains d'alcool à concentration croissante ou dans de l'acétone. Le dernier bain se fait à l'oxyde de propylène.

**2.4. Inclusion** : favorise le durcissement des échantillons, en remplaçant le milieu intracellulaire aqueux par un milieu solide tel que la résine.

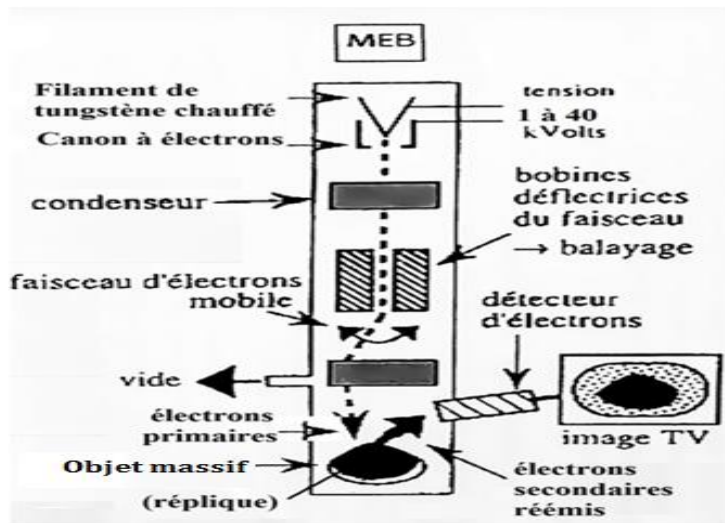
**2.5. Confection de coupes ultraminces ou ultrafines** : découper le fragment en coupes de 500 à 700Å d'épaisseur. Les blocs obtenus sont taillés, les coupes sont effectuées à l'aide d'un ultra-microtome, et recueillies sur une grille métallique couverte d'un film de collodion.

**2.6. Contraste** : Il s'agit d'une imprégnation par des sels de métaux lourds (comme les sels de plomb, d'uranyle ou de nitrate d'argent) qui augmente le contraste des structures cellulaires.

**2.7. Observation directe**

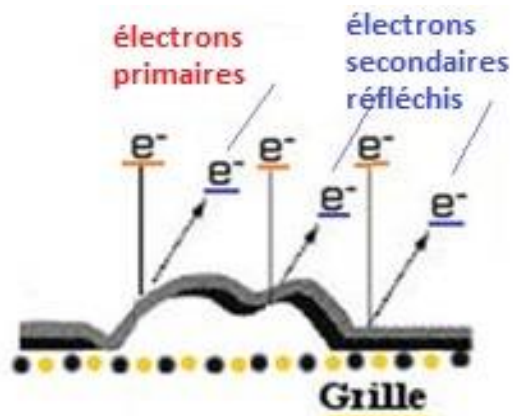
**2.8. Observation des micrographies prises au MET**

## Microscope Electronique à Balayage



- Le pouvoir séparateur de 3 à 20 nm.
- Le grossissement variant de 10 000 à 100 000 fois.
- Les électrons réfléchis par la réplique, nommés **électrons secondaires** serviront à construire l'image en 3D sur un écran TV.

## Formation de l'image en microscopie électronique à balayage



Les électrons réfléchis sont recueillis par un détecteur d'électrons, qui va les transformer en une image en 3D observée sur l'écran du microscope.



Observation de la surface d'un macrophage à proximité de deux globules blancs, au microscope électronique à balayage, technique d'ombrage métallique



## Technique de cryodécapage

**1. But :** le cryodécapage permet l'observation des surfaces intra et inter-membranaires, le plus souvent appliquée en microscopie électronique à balayage (MEB). L'observation peut se faire dans certains cas au MET (cas des répliques obtenues à partir de virus ou molécules isolées).

**2. Principe :** pour l'obtention d'une réplique de l'échantillon étudié.

### 1. Etapes

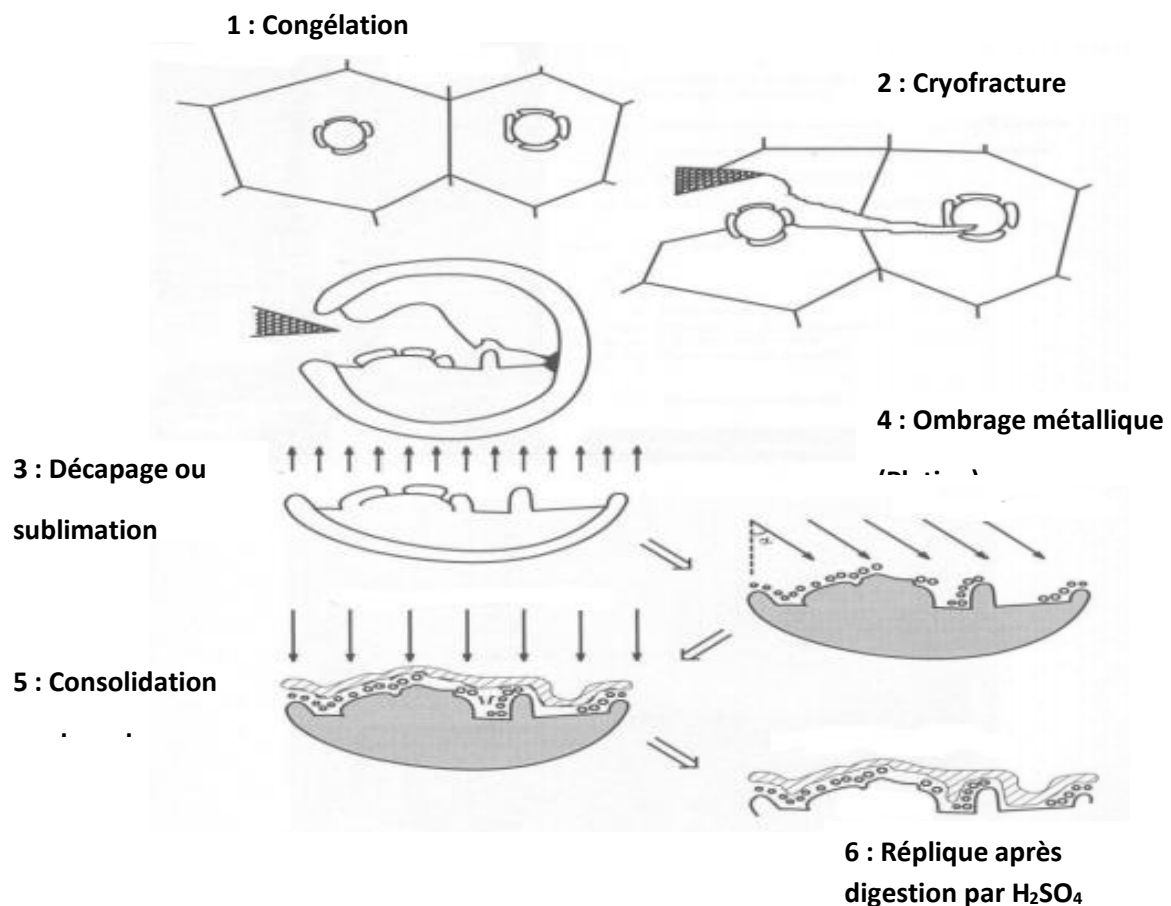
3.1. Congélation : les échantillons sont congelés à température dans l'azote liquide (à  $-196^{\circ}\text{C}$ ), on obtient un bloc de glace.

3.2. Fracture du bloc : à l'aide d'une lame refroidie, le plan de fracture passe toujours par les zones de moindre résistance qui sont en générales les espaces inter-membranaires (espace péri nucléaire de l'enveloppe nucléaire) ou bien les régions intra-membranaires qui correspondent aux parties hydrophobes (feuillet clair) de la bicouche lipidique, on obtient dans ce dernier cas une hémi-membrane.

3.4. Confection de la réplique : elle se fait en deux temps, on dépose par vaporisation en biais une couche de platine qui assure l'ombrage de la réplique. On rajoute à l'aide d'une vaporisation verticale, une couche de carbone qui servira à consolider la couche de platine.

3.5. Elimination de l'échantillon biologique qui a servi de matrice, par dissolution en utilisant un solvant approprié.

3.6. Lavage de la réplique et observation au MEB (dans le cas général)





	<i>Microscope photonique</i>	<i>Microscope électronique à transmission</i>	<i>Microscope électronique à balayage</i>
<i>Source d'énergie</i>			
<i>Lentilles</i>			
<i>Support de l'échantillon</i>			
<i>Grossissement</i>			
<i>Pouvoir séparateur</i>			
<b>Epaisseur des coupes</b>			
<i>Trajet du faisceau</i>			
<i>Contraste</i>			
<b>Image</b>			
<b>Confection des coupes</b>			
<b>Observation</b>			
<b>Technique de préparation des échantillons</b>			
<b>Fixation</b>			
<b>Inclusion</b>			