

L'ETUDE DE LA CELLULE ET LA MICROSCOPIE

Ce document a été réalisé à partir du dossier «Sagascience: La cellule animale»

<http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/doscel/decouv/norm/global.htm>.

Les outils utilisés pour observer la structure cellulaire sont les microscopes.

Les microscopes utilisent la déviation des particules :

non chargées, les photons, dans les microscopes photoniques (aussi appelé microscopes optiques).

chargées, les électrons, dans les microscopes électroniques.

Ces particules traversent un système de lentilles de manière à former une image agrandie d'un objet.

Quelques dates importantes de la microscopie

1667 : Le microscopiste anglais Robert Hooke est l'inventeur d'un microscope muni de trois lentilles. Il observe avec cet appareil les alvéoles régulières et remplies d'air du liège. En leur donnant le nom de "cellules d'air", il fut le premier à employer le mot "cellule". 1834 : Talbot introduit une nouvelle technique permettant des différenciations dans l'image : la lumière polarisée. 1908 : Reichert développe la technique de la fluorescence pour l'adapter à la microscopie. Quelques années plus tard, en 1929, Bausch et Lomb créent un microscope à fluorescence adapté pour examiner des spécimens minéraux et organiques. 1934 : le chercheur allemand Zernike décrit le contraste de phase. Cette technique permet d'observer les cellules sans préparation ni coloration dans leur milieu d'origine, donc d'observer des cellules vivantes. 1939 : les premiers microscopes électroniques sont mis au point. 1955 : Le principe de microscopie confocale est décrit par Marvin Minsky, mais le premier microscope confocal utilisable en pratique n'est mis au point qu'en 1968 par Mojmir Petran.

1. Microscopie photonique

1.1. Principe de fonctionnement

Dans un microscope photonique (également appelé microscope optique) la lumière (composée de photons) passe à travers un condenseur qui concentre le flux lumineux en un rayon de lumière. La lumière ainsi focalisée traverse l'échantillon. La lentille de l'objectif permet un premier grossissement (entre x4 et x200) puis la lentille de l'oculaire apporte un deuxième grossissement (en général x4) et l'œil reçoit enfin l'image agrandie. L'agrandissement final correspond au produit des deux grossissements des deux lentilles de verre.

La qualité de l'image dépend du pouvoir de résolution du microscope qui est en grande partie liée à la qualité des lentilles grossissantes et également à la longueur d'onde de la lumière (0,4m 0,7m). La limite de résolution du microscope standard est de 0,22 m, ce qui permet au final un agrandissement possible de 1 000 fois sans perte de qualité. En dessous de cette limite de résolution le microscope optique ne permet pas d'avoir une image correcte.

Très peu de cellules sont visibles avec le microscope photonique si elles ne sont pas colorées. En effet, la plupart des tissus et des cellules renferment peu de pigments qui pourraient absorber la lumière naturelle, peu de détails sont donc visibles en transmission directe de la lumière naturelle. Des techniques de préparation ont donc été mises au point pour rendre visibles les cellules ou leurs structures internes (exemple : coloration de Gram pour visualiser les bactéries). Des techniques spéciales d'illumination ont également été élaborées.

1.2. Différentes utilisations de la lumière

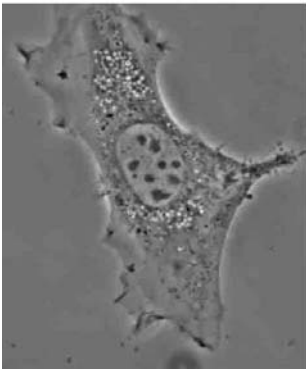
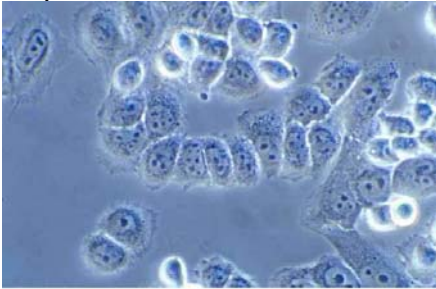
Microscopie à fond clair/fond noir

Sous le microscope, de fines coupes de tissus ou des cellules isolées sont examinées par transmission directe de la lumière à travers l'échantillon. La microscopie à fond clair permet d'observer des préparations colorées (sans coloration, on ne voit rien). Dans la microscopie à fond noir, l'image est créée par la diffraction de la lumière. La lumière diffractée par la préparation permet la formation de l'image. Sans préparation, la lumière n'arrive pas à l'objectif d'où le fond noir. La préparation donne donc une image sur fond noir.

Microscopie à contraste de phase

Le contraste de phase est utilisé pour accentuer le contraste des échantillons non colorés. La vitesse et la direction de la lumière sont modifiées quand elle passe à travers les structures intracellulaires possédant des indices de réfraction différents. Il y a un phénomène de halo, c'est-à-dire qu'on voit une ligne blanche autour des reliefs même si l'image reste plate. Il n'y a pas de réel relief mais une impression de relief dû au contraste de l'image. Le contraste de phase donne du contraste à des objets/éléments qui n'en ont pas.

Exemple 1 : cellules en culture dans une boîte



Exemple 2 : une cellule d'embryon de souris visualisée en contraste de phase. Il n'y a pas de relief mais les contours sont entourés d'une ligne blanche.

Microscopie à contraste interférentiel différentiel

Le contraste interférentiel différentiel utilise de la lumière polarisée.

Qu'est ce que la lumière polarisée ?

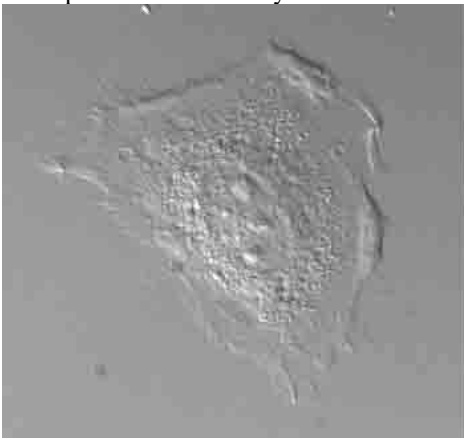
La lumière polarisée, contrairement à la lumière naturelle, est une lumière qui vibre dans une seule direction.

Pour obtenir une polarisation de la lumière, la lumière normale est filtrée par des dispositifs qui ne laissent passer qu'une seule catégorie de vibrations parmi toutes celles qui la composent. Deux lentilles sont placées sur le trajet de la lumière, l'une sur le condenseur, l'autre sur l'oculaire.

Le contraste interférentiel différentiel (DIC) est aussi appelé technique Nomarski.

Cette technique donne une vision en trois dimensions d'un objet translucide. Grâce à l'utilisation de la lumière polarisée et d'un jeu de filtres spéciaux, les images sont observées avec un relief ombré.

Exemple : cellule d'embryon de souris observée en DIC. Les contours sont visualisés avec leur relief



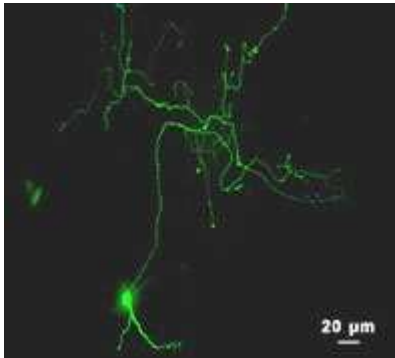
Quand les échantillons sont trop épais pour être observés en contraste de phase, c'est le cas des échantillons biologiques, la technique DIC (appelée aussi Nomarski) est utilisée.

Microscopie à fluorescence

Qu'est-ce que la fluorescence ? Quand un organisme absorbe de la lumière et la réémet presque simultanément, le phénomène est appelé fluorescence. Cette propriété est mise à profit dans la microscopie de fluorescence.

Le principe de base du microscope à fluorescence est d'envoyer une lumière excitatrice, le plus souvent de la lumière ultraviolette, sur l'échantillon puis de séparer la lumière de fluorescence émise du reste de la lumière excitatrice afin que seule la fluorescence émise puisse être perçue par l'œil ou tout autre détecteur. C'est le seul mode de microscopie dans lequel l'échantillon (fluorescent ou rendu fluorescent) réémet sa propre lumière après excitation.

De la lumière ultraviolette UV d'une longueur d'onde précise est produite à partir d'une source UV après passage à travers un filtre excitateur. Cette lumière UV filtrée est envoyée sur l'échantillon qui émet alors de la fluorescence tant qu'il est illuminé par la lumière UV à une longueur d'onde précise. Après excitation, l'échantillon émet de la lumière avec des longueurs d'onde supérieures aux longueurs d'onde d'excitation. La lumière émise rayonne dans toutes les directions, indépendamment de la direction de la lumière excitatrice. Un filtre sélecteur laisse passer seulement la lumière fluorescente émise et arrête la lumière UV réfléchie par l'échantillon. Le choix des filtres doit être fait avec précaution puisqu'il conditionne l'observation de l'élément à étudier.

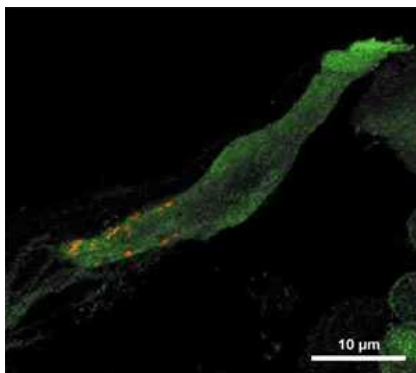


Exemple : neurone du cervelet observé en microscopie à fluorescence.

Microscopie confocale

Pour des images à fort grossissement, la microscopie de fluorescence traditionnelle souffre d'effets secondaires de fluorescence diffuse, ce qui donne des images floues et peut masquer des détails importants. La microscopie confocale, qui utilise le même principe de base que la microscopie à fluorescence, permet de corriger ces désagréments.

La microscopie confocale élimine les signaux localisés en dehors du plan de mise au point grâce à un diaphragme localisé en avant du détecteur, sur le plan de l'image. L'intérêt de la microscopie confocale, par rapport à la microscopie conventionnelle, est d'améliorer la résolution des images et de faire du découpage optique, c'est-à-dire qu'on va observer l'image « tranche par tranche » ou plutôt plan par plan. On peut ensuite rassembler les plans successifs et reconstituer une image en 3D.



Exemple : cellule de l'oreille observée en microscopie confocale à fluorescence.

1.3. Techniques de préparation

Certaines techniques permettent de visualiser un échantillon naturel, sans aucun traitement ni aucune coloration. Dans la plupart des cas, il est nécessaire de préparer les échantillons avant de pouvoir les observer. Les échantillons biologiques doivent être fixés puis colorés (ex : microscopie à fond clair classique) ou marqué (microscopie à fluorescence).

Fixation

La fixation a pour but de tuer les cellules et de les conserver dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

On réalise donc avant de les observer des frottis ou des coupes histologiques.

La fixation peut être :

- une fixation physique (congélation, fixation à la chaleur)

- une fixation chimique (fixation à l'alcool à 98%) A la fixation s'ajoute, pour les préparations histologiques des étapes de déshydratation puis d'inclusion. L'inclusion consiste à enrober l'échantillon pour pouvoir réaliser des coupes les plus fines possibles. On inclue en général les tissus dans de la paraffine ou de la résine.

Coloration

La coloration repose sur l'affinité particulière de certains tissus ou constituants cellulaires pour une substance colorée déterminée.

De nombreux colorants sont utilisés selon le contexte et la nature de ce que l'on veut observer.

Exemples :

- coloration des parois bactériennes au cristal violet.

- coloration noyaux des cellules eucaryotes à l'hématocycline.

Marquage des échantillons pour la microscopie à fluorescence

Dans la plupart des cas, l'utilisation de réactifs eux-mêmes fluorescents, les fluorochromes, rend possible l'identification des composants intracellulaires avec une grande précision et une grande spécificité. Les fluorochromes sont des marqueurs fonctionnant comme des colorants en se liant à certains éléments constitutifs de la cellule.

Il n'existe pas de réactifs spécifiques pour tous les éléments de la cellule. Les chercheurs préparent alors eux-mêmes des réactifs sous la forme d'anticorps dirigés contre l'élément qu'ils étudient plus particulièrement. Les anticorps peuvent être rendus fluorescents. On parle d'immunofluorescence.

2. Microscopie électronique

2.1. Principe de fonctionnement

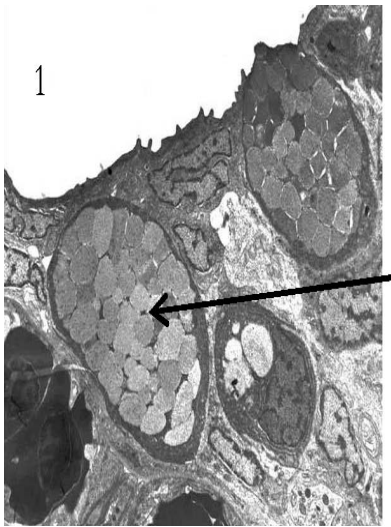
La microscopie électronique n'utilise pas les photons pour analyser les échantillons à observer mais les électrons, ce qui va permettre de révéler les plus fines structures internes de la cellule, parfois jusqu'aux molécules, puisque les grossissements possibles vont de 1000 à 500 000 fois. Les microscopes électroniques ont un pouvoir de résolution de 0,1nm (2nm usuellement en biologie).

Il existe deux techniques d'observation en microscopie électronique :

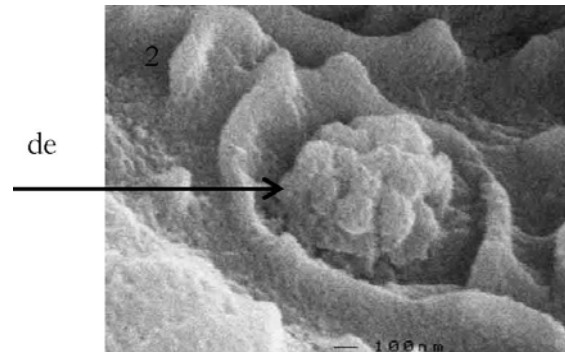
La microscopie électronique à transmission.

La microscopie électronique à balayage.

Un des nombreux avantages de ce type de microscopie est par exemple de voir la cellule dedans et dehors. Pour bien étudier un type cellulaire, l'idéal est de pouvoir obtenir des images à la fois en microscopie à transmission et à balayage. Les informations données par ces deux méthodes sont complémentaires : l'une permet de voir à l'intérieur de la cellule et l'autre donne une image de la surface extérieure.



Un grain de sécrétion de mucus prêt à être libéré



2.2. Microscopie électronique à transmission

Principe

Dans le microscope électronique à transmission (MET), les électrons traversent l'échantillon et permettent de découvrir l'intérieur de la cellule sur des coupes d'échantillon. Cette technique est très performante. Le faisceau d'électrons est émis par un canon à électrons, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse. L'échantillon disperse les électrons qui le traversent et le faisceau est focalisé par les lentilles électromagnétiques pour former une image visible agrandie de l'échantillon sur un écran fluorescent (électrons déviés). Plus la région de l'échantillon est épaisse, plus cette région de l'image est sombre puisque moins d'électrons touchent la région de l'écran fluorescent correspondante. Le vide doit être fait pour que le trajet des électrons soit linéaire.

Seul le microscope électronique à transmission est capable de révéler les détails intracellulaires. Son grossissement est de 20 000 et sa limite de résolution est de 0,1 à 1 nm.

Cependant, le MET ne permet pas d'observer les cellules vivantes. Les coupes ultrafines de l'échantillon, placées sous vide, doivent être au préalable déshydratées, fixées puis imprégnées avec des métaux lourds (cuivre, nickel ou or) pour permettre le contraste entre les éléments intracellulaires.

Techniques de préparations particulières

Il existe différents types de préparations particulières qui permettent d'avoir des images plus précises que lors d'une « simple » préparation.

Par exemple, la cryofracture permet de révéler la localisation des protéines membranaires. L'échantillon à étudier est congelé dans de l'azote liquide (170°C). Il est ensuite découpé avec une lame dans une enceinte sous vide. Un métal lourd, opaque aux électrons, est déposé sur l'échantillon et crée ainsi des ombres selon le relief de la coupe. Du carbone est vaporisé afin d'obtenir un moule de la surface, c'est-à-dire sa réplique, qui sera observée au MET.

2.3. Microscopie électronique à balayage

Le microscope électronique à balayage (MEB) a une résolution plus faible que celle du MET. Sa limite de résolution est de 1 à 7 nm.

Son intérêt est de pouvoir obtenir des images de cellules en 3D. Lorsque le faisceau d'électrons bombarde la préparation, une partie des électrons la traverse, l'autre partie est réémise et sert à construire l'image. Le résultat est une représentation de la surface de l'objet observé, les scientifiques peuvent ainsi étudier la topographie de la cellule.

Le microscope à balayage ne permet pas, non plus, d'observer les cellules vivantes. Toujours placés sous vide, les tissus ou les cellules sont fixés et déshydratés. Puis ils sont entièrement recouverts par un matériau conducteur : une fine couche de carbone ou de platine afin d'évacuer les électrons qui s'accumuleraient dans la matière et provoqueraient des distorsions d'image.

Dans le microscope électronique à balayage, les électrons ne traversent pas une coupe de l'échantillon : ils sont réfléchis par la surface de l'échantillon entier pour donner une vue en trois dimensions avec une très bonne résolution.

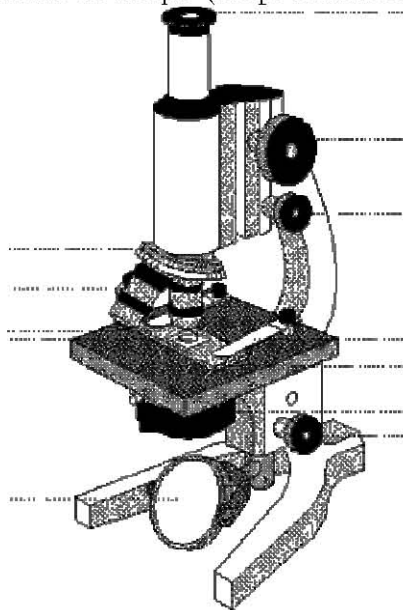
Nom :
Prénom :

TD : METHODE D'ETUDE DE LA CELLULE

Ce questionnaire est à remplir en s'aidant du document « L'ETUDE DE LA CELLULE ET LA MICROSCOPIE ».

1. A l'aide des termes donnés, légender le schéma de microscope optique suivant

Vis micrométrique (mise au point fine) - cavalier de maintien de la préparation sur la platine porte-objet - condenseur et diaphragme - vis de mouvement du condenseur - oculaire - vis macrométrique (mise au point rapide) - porte-objectifs - objectif - lame (lame porte-objet) - lamelle (couvre-objet) - miroir (face concave ou convexe) ou source lumineuse électrique (lampe à filament avec filtre).



2. Représenter en couleur le trajet de la lumière sur le schéma précédent.

3. Reproduire les tableaux suivants qui permettent de comparer les différents types de microscopies

3.1. Microscopie optique/électronique

Caractéristiques	Microscope optique	Microscope électronique
Grandissement		
Limite de résolution		
Particules de déviation		
Atmosphère de travail		
Type de lentilles		
Sous-types de techniques		
Type de préparation nécessaire		

3.2. Différentes techniques de microscopie optique

3.3. Différentes techniques de microscopie électronique

	Utilisation de la lumière	Préparation nécessaire	Intérêt de la technique	Inconvénient
Microscopie à fond clair/fond noir				
Microscopie à contraste de phase				
Microscopie à DIC				
Microscopie à fluorescence				
Microscopie confocale				

MET Inconvénient(s)

Limite de résolution

Vue de la cellule Intérieure

Extérieure

Préparation nécessaire Oui

Non

Observation de cellules Oui

vivantes Non

Intérêt(s)

MEB

Intérieure

Extérieure

Oui

Non

Oui

Non