

TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE : OBSERVATION DES CELLULES

Introduction

Un peu d'histoire des sciences : La découverte des cellules coïncide avec la mise au point des premiers microscopes au début du XVII^{ème} siècle, en **1608**, par **Jansen** (Hollande). A. **van Leeuwenhoek** mit ensuite au point des lentilles plus performantes. Le nom de "**cellule**" a été inventé par le microscopiste anglais **Robert Hooke** (chimiste, mathématicien, physicien et inventeur anglais) en 1665 alors qu'il observait les alvéoles du liège : il leur donna le nom de "cellules" en se référant aux petites chambres des moines d'un monastère. En réalité, ces structures décrites par Hooke sont les parois des cellules mortes.

Problème et objectif : L'œil ne peut distinguer que des structures de l'ordre de 100µm. Quelles techniques permettent l'étude des cellules ? Les progrès de la microscopie ont permis non seulement l'observation des structures cellulaires et intracellulaires, mais son association à des techniques de coloration / marquage permet également de rendre compte de la position de molécules précises. Petite revue des techniques d'observation.

I. Observer des cellules au microscope optique ou photonique

A) Microscopie photonique à fond clair = microscopie optique (microscopes du lycée)

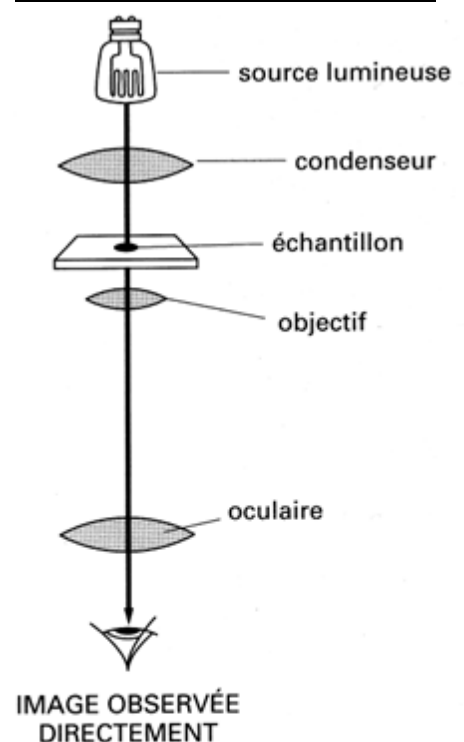
La microscopie optique repose sur le passage d'un faisceau de photons à travers un montage à observer, puis à travers des lentilles (objectif et oculaire) permettant le grossissement de l'image.

Le **pouvoir de résolution** (= capacité de l'instrument à séparer 2 points voisins) est **limité** par la longueur d'onde de la lumière traversant la préparation : en pratique il est impossible de discerner deux objets distants de **moins d'1µm** (10^{-6} m) à l'aide d'un microscope photonique.

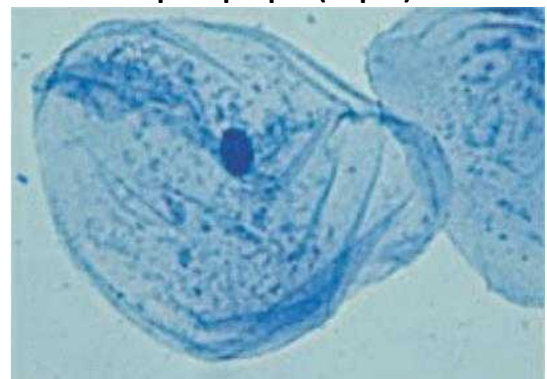
La plupart des cellules n'étant pas colorées, il est souvent nécessaire d'ajouter un **colorant** au montage pour **augmenter le contraste**.

Les coupes doivent être très fines (de 5 à 10 µm) pour que la lumière puisse les traverser.

Principe du microscope optique



Observation de cellules d'épithélium buccal en microscopie optique (10µm)



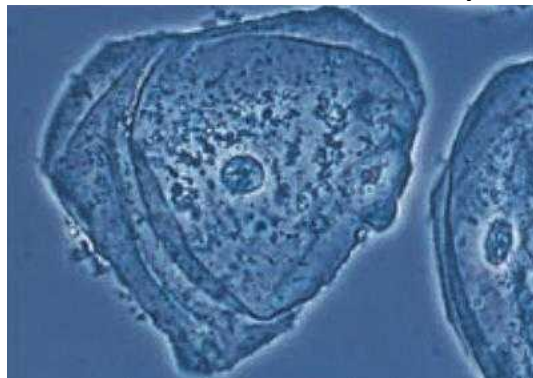
Sans coloration : très faible contraste

Avec coloration au bleu de méthylène : **amélioration du contraste****Quelques colorants classiquement utilisés en microscopie optique (à connaître pour les épreuves de TP)**

Mise en évidence de...	Coloration	Couleurs obtenues
Toutes cellules	Bleu de méthylène	Limites des cellules globalement en bleu et organites (s'ils sont présents) plus foncés
	Rouge neutre	Cellule globalement en rouge
Noyau (ADN, ARN ou chromosomes)	Vert de méthyle acétique	ADN en vert
	Rose de pyronine	ARN en rose
	Carmin acétique	ADN en rose
Paroi des cellules végétales	Carmino-vert de mirande (mélange de carmin aluné rose et de vert de mirande)	Cellulose en rose
		Lignine en vert
		Subérine en jaune
Paroi champignons (chitine)	Bleu coton lactique	Mycéliums de champignon en bleu
Vacuole	Rouge neutre	Vacuole en rouge (orange à rouge sombre en fonction du pH)
Amidon	Eau iodée ou lugol (le lugol est de l'eau iodée diluée)	Amidon en bleu-violet-noir
Glycogène		Glycogène en brun acajou
Lipides	Rouge soudan III	Gouttelettes lipidiques en rouge
Paroi des bactéries	Coloration gram (cristal violet + Lugol + safranine)	Bactérie Gram+ en violet
		Bactérie Gram- en rose

B) Des microscopes optiques plus sophistiqués

Des microscopes optiques plus complexes permettent d'observer des préparations **relativement épaisses**, et ainsi d'observer des **cellules vivantes**, sans risque de lésion des cellules lors de la réalisation d'une coupe fine et sans utilisation de colorant. Les microscopes à **contraste de phase** ou à **contraste d'interférence différentielle**, utilisent les interférences produites par la recombinaison des ondes lumineuses après la traversée du montage.

Observation de cellules d'épithélium buccal en microscopie optique spécialisée

Avec contraste de phase



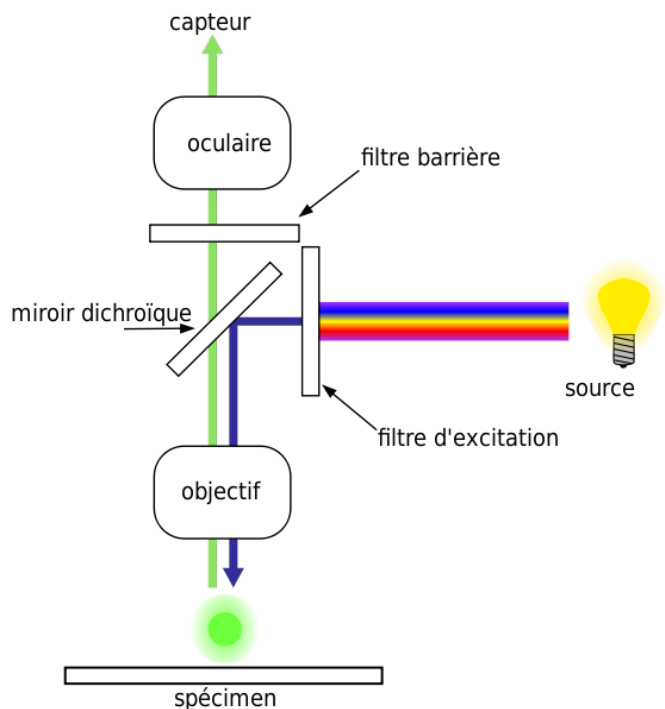
Avec contraste d'interférence différentielle

C) Le microscope à épifluorescence.

Le microscope à épifluorescence permet de visualiser des objets qui sont naturellement fluorescents ou des molécules rendues fluorescentes grâce à des marqueurs pour mieux les observer (protéines couplées à la GFP (protéine fluorescente verte issue d'une méduse, DAPI pour l'ADN, fluorochromes...). La technique du microscope à épifluorescence est la même qu'un microscope optique, sauf que la lumière utilisée n'est pas blanche, mais possède une gamme définie de longueur d'onde (utilisation de laser ou de filtre d'excitation ne laissant passer que la lumière de longueur d'onde désirée sur l'échantillon). Comme la lumière arrive sur l'échantillon par le haut et non par-dessous, on parle d'épifluorescence.

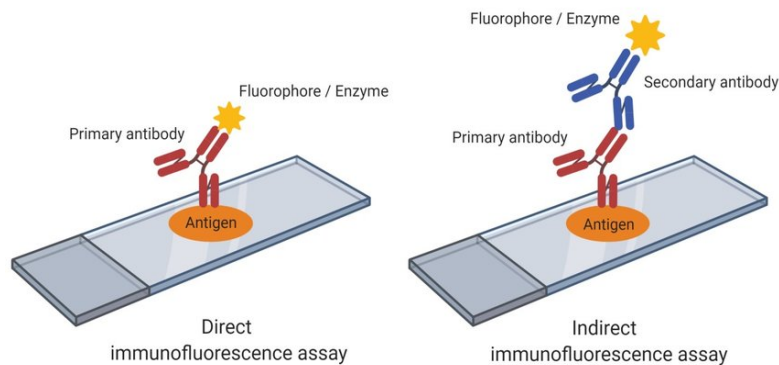
Après excitation de l'échantillon, celui-ci émet à son tour une lumière d'une longueur d'onde différente.

Principe du microscope à épifluorescence

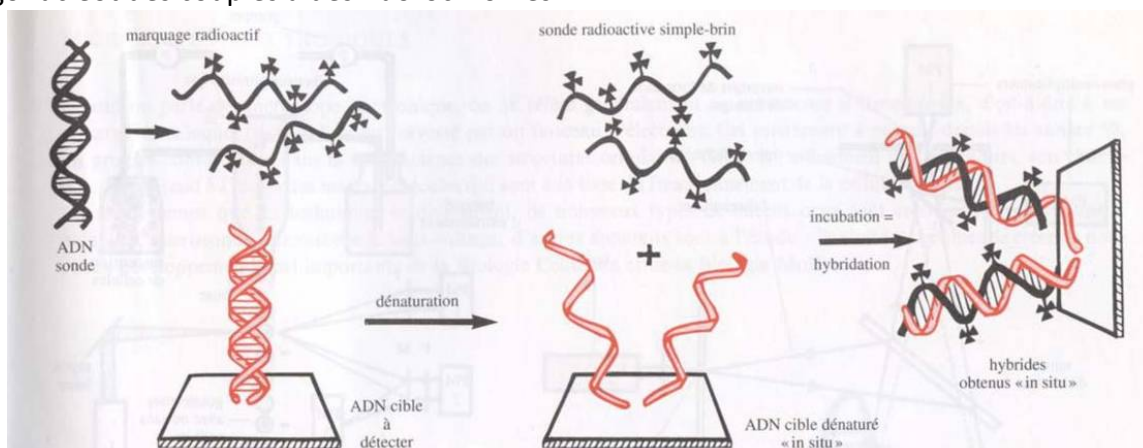


Des techniques utilisant cette microscopie ont été développées :

- **immunofluorescence** (marquage à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorochrome) : pour détecter des composants cellulaires comme des protéines (in researchGate).

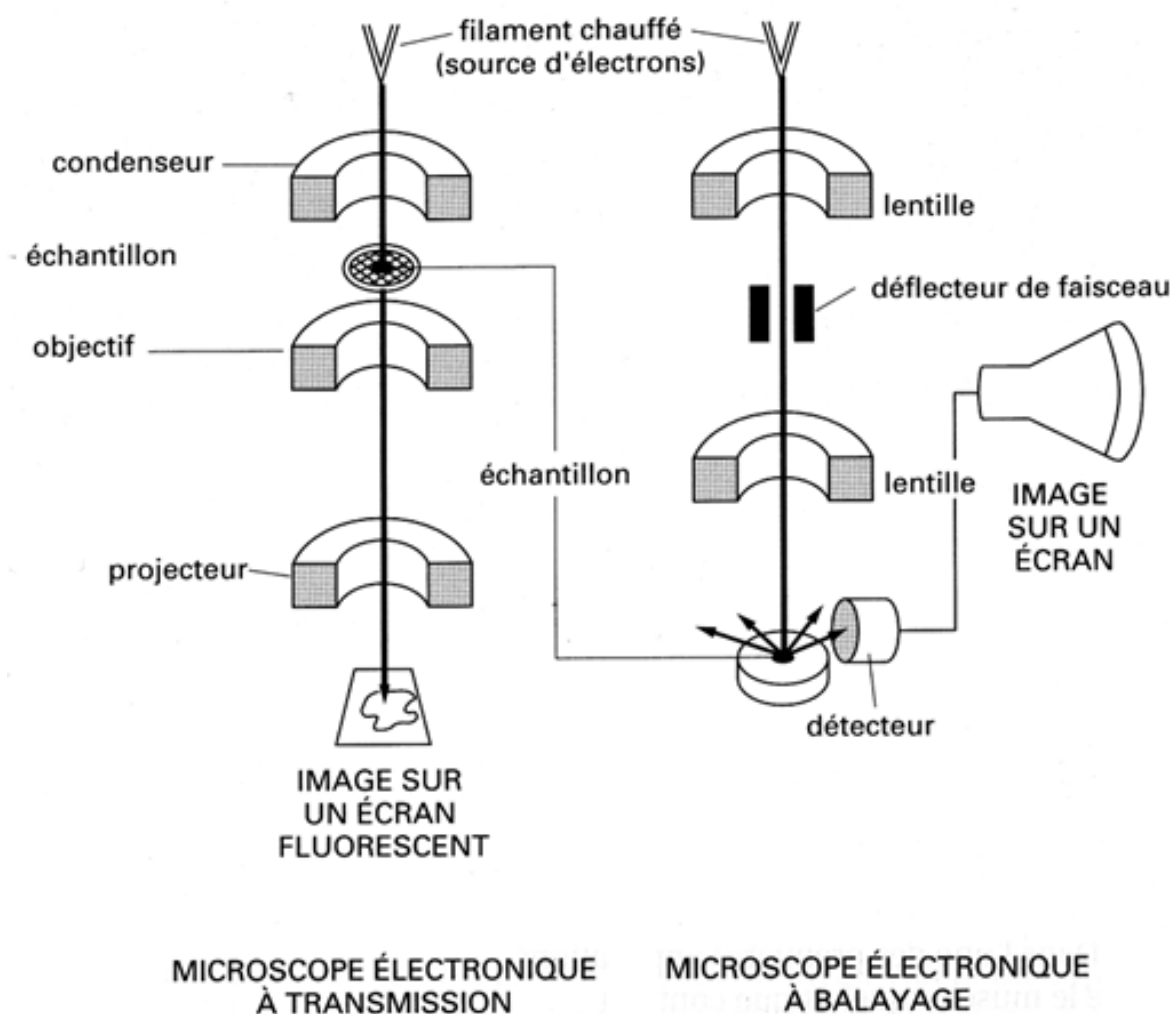


- **FISH ou hybridation fluorescente *in situ*** : pour marquer des séquences nucléotidiques grâce à des oligonucléotides couplés à des fluorochromes



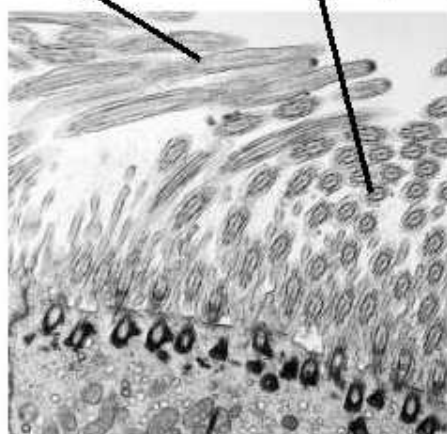
II. Observer des cellules au microscope électronique

Principes de la microscopie électronique

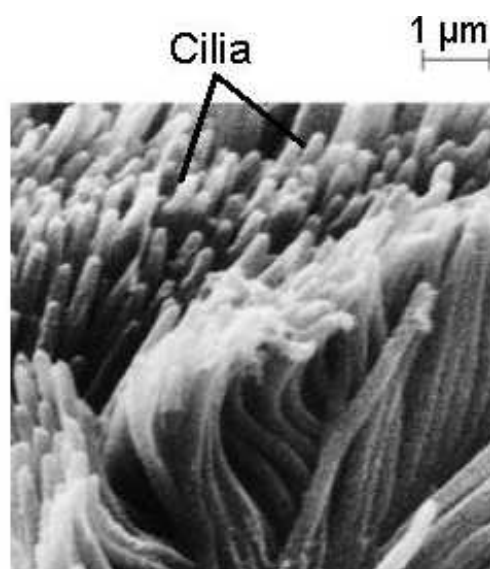


Observation de cellules d'épithélium cilié (trachée de mammifère) en microscopie électronique

Longitudinal section of cilium
Cross section of cilium
1 μm



MET



MEB

A) Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission repose sur le passage d'un faisceau d'électrons à travers un montage. La longueur d'onde d'un faisceau d'électrons étant très faible (de l'ordre de quelques pm (10^{-12}m)), le **pouvoir de résolution** est **nettement supérieur** à celui du microscope photonique : **pouvoir de résolution maximal de 0,1nm**.

Il est nécessaire de réaliser des **coupes ultrafines** (environ 50nm d'épaisseur) pour permettre le passage des électrons. Par conséquent, il faut :

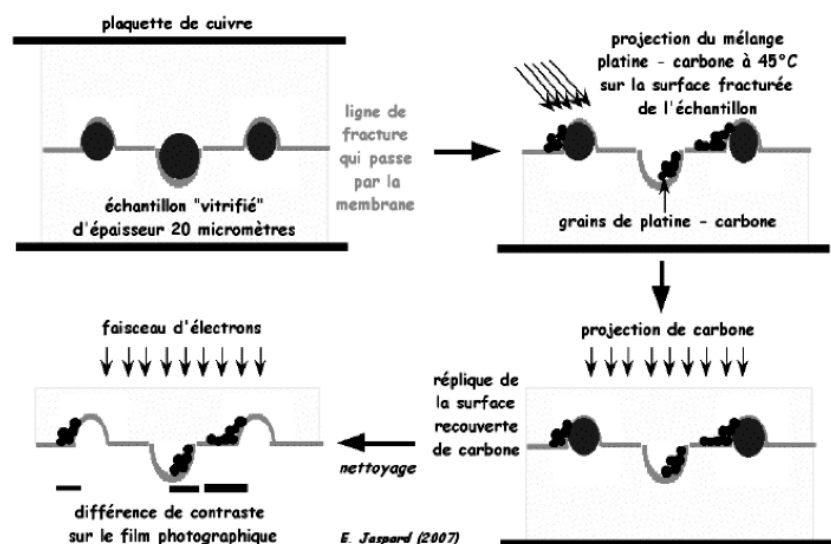
- inclure le tissu à couper dans une résine dense résistante à l'action d'un « couteau » de verre ou de diamant
- fixer au préalable le tissu pour qu'il résiste au processus d'inclusion : consolidation des édifices cellulaires en créant des liaisons intermoléculaires à l'aide de molécules chimiques variées (glutaraldéhyde, tétroxyde d'osmium...)

Il est également nécessaire de **renforcer le contraste** en vaporisant des sels de métaux lourds (uranium ou plomb) qui se fixent sur les structures biologiques et donnent une coloration positive : les métaux absorbent les électrons, ces derniers ne parviennent pas jusqu'à l'écran. On observe donc sur une électronographie des tâches sombres là où des structures dites « denses aux électrons » ont empêché la transmission du faisceau d'électrons.

La technique de **cryofracture** est une technique spécialisée de MET.

Après une congélation rapide à -150°C dans l'azote liquide, la préparation microscopique est fracturée à l'aide d'un couteau. Le plan de fracture mis à nu est ensuite exposé à un ombrage métallique, et les tissus sont dissous : on observe une réplique de la surface dégagée, suffisamment fine pour qu'elle puisse être traversée par le faisceau d'électrons. Souvent la fracture a lieu au niveau de zones de moindre résistance, par exemple entre les deux couches de lipides des membranes biologiques.

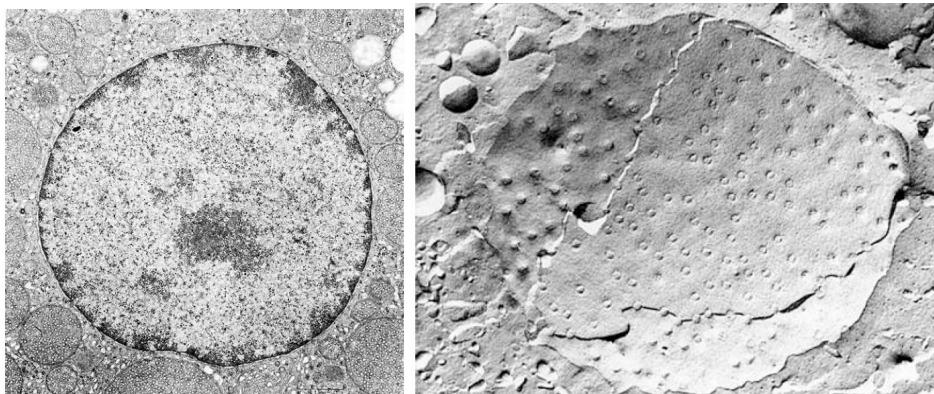
Principe de la cryofracture



Avantages :

- La cryofracture permet d'éviter une fixation chimique, et limite ainsi les risques de lésion des tissus.
- La cryofracture permet d'observer des **surfaces intracellulaires en relief**, avec une meilleure résolution que le microscope électronique à balayage.

Observation d'un noyau en MET (à gauche) et en MET après cryofracture (à droite)

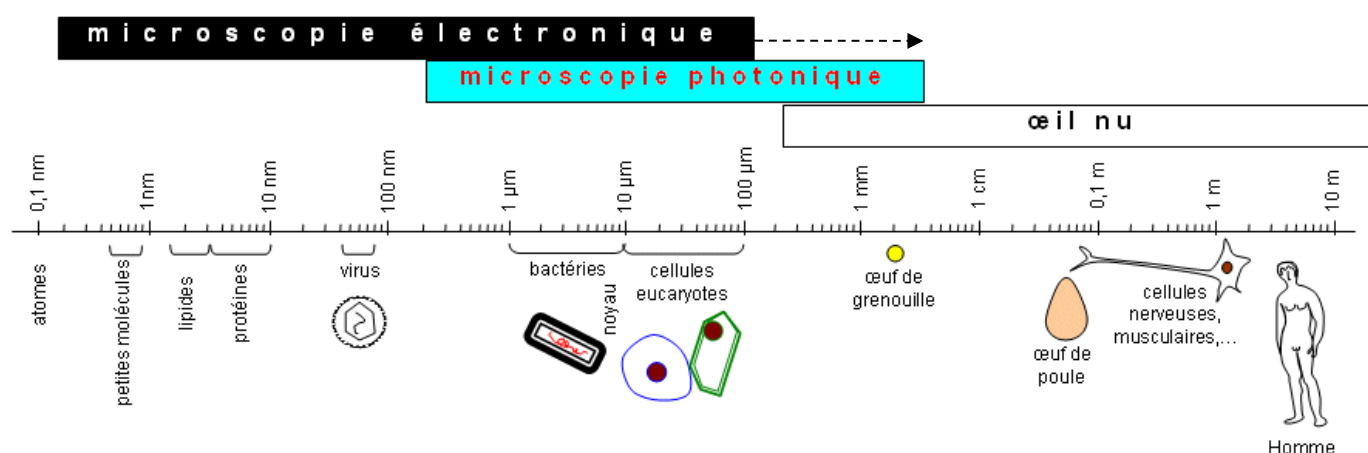


B) Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage consiste à balayer la **surface** d'un échantillon, recouvert d'une couche d'atomes lourds. Les électrons réfléchis par la surface excitée sont détectés et fournissent une image de l'objet en **relief**, dont la **résolution est limitée à 10nm**.

Rq : les techniques de prélèvement, d'inclusion, de fixation, de coupe, de coloration peuvent être responsables de l'apparition **d'artéfacts** de préparation, c'est-à-dire d'images artificielles créées par la technique : vides provoqués par une rétraction des tissus, rapprochements artificiels entre structures... Moins une technique nécessite d'étapes de transformation de l'objet à observer, meilleure sera l'observation !

Bilan : Echelle de taille des cellules et de leurs composants



A retenir : comparaison des différentes techniques de microscopie

	Microscopie optique	Microscopie optique à épifluorescence	Microscopie électronique à transmission (MET)	Microscopie électronique à balayage (MEB)
Principe général	L'objet observé est traversé par un faisceau de photons	L'objet observé est traversé par un faisceau de photons d'une longueur d'onde précise et émet une fluorescence	L'objet observé est traversé par un faisceau d'électrons	L'objet observé réfléchit un faisceau d'électrons en surface
Taille des structures observées	Quelques dizaines de µm Pouvoir de résolution de 1 µm		Quelques µm Pouvoir de résolution de 0,1 nm	Quelques µm Pouvoir de résolution de 10 nm
Type d'image obtenue et objets observés	Cliché en couleur permettant d'observer la structure des tissus et des cellules, ainsi que les organites les plus gros (noyau, vacuole, plastes, ...)		Cliché en niveaux de gris en 2 dimensions, permettant d'observer l'ultrastructure cellulaire (les organites cellulaires), voire le niveau moléculaire	Cliché en niveau de gris en relief permettant d'observer la surface des échantillons