

CHAPITRE 2

METHODES D'ETUDE DE LA CELLULE

N.B. : les textes en italiques sont à lire, mais ne feront pas l'objet de QCM au concours.

I / ETUDE MORPHOLOGIQUE

A / LE MICROSCOPE OPTIQUE (ou PHOTONIQUE) (Voir Fig. 2. 2.)

La taille moyenne d'une cellule est 20 μm , inaccessible à l'œil nu. Nous avons donc besoin d'une prothèse, le microscope. L'organe permettant de décrire une forme étant l'œil, les premiers microscopes furent donc optiques ou photoniques, avant de mettre à profit d'autres rayonnements ou effets physiques.

NOTIONS THEORIQUES

Quelques notions techniques sont importantes à connaître, sans revoir les théories (optique physique, ondulatoire et quantique) du microscope qui ne sont pas du ressort de ce cours.

1 – **Indice de Réfraction « n »** : caractérise un milieu translucide. « n » est le rapport des vitesses de la lumière dans le vide (c) et dans le milieu translucide (v) : **Voir Fig. 2.1**

$$n = c/v \quad (n \geq 1).$$

En optique physique, il permet d'évaluer l'angle de réfraction d'un rayon lumineux (Loi de Descartes, cf. dioptré).

Milieu	Vide	Air	Eau	Verre	Huile de cèdre	Huile synthétique
<i>n</i>	1	1,0003	1,334	1,53	1,515	1,518

2 – **Dioptré** : interface entre 2 milieux translucides d'indices de réfraction différents. La loi de Descartes permet d'évaluer l'angle de réfraction lorsqu'un rayon lumineux franchit un dioptré

Loi de Descartes : $n_1 \sin(\alpha_1) = n_2 \sin(\alpha_2)$ (Voir Fig. 2.1)

Une lentille est un système optique centré formé de 2 dioptrés dont l'un au moins est sphérique. Elle permet d'infléchir les rayonnements et constitue l'un des moyens pour agrandir l'image d'un objet lumineux.

3 – **Pouvoir de séparation** ou de **résolution** : distance minimale qui doit exister entre 2 points contigus pour être correctement discernés au travers d'un système optique (microscope, ...).

Pouvoir de résolution = $0.61 \lambda / n \sin \alpha$ (Voir Fig. 2.1)

λ : longueur du rayonnement utilisé

n : indice de réfraction du milieu dans lequel est placé l'objet

α : demi angle du cône de vision de l'objet par le système optique (l'objectif du microscope)

Le pouvoir de séparation caractérise un « système optique grossissant » et détermine la taille minimale d'un objet discernable, quel que soit l'agrandissement de l'image (à rapprocher de la « pixelisation » d'une image numérique aux forts agrandissements). *L'œil humain ne peut percevoir*



nettement 2 points de 0,1 mm (100 μm) que s'ils sont distants d'au moins 5 μm . Les meilleurs microscopes optiques ont un pouvoir de résolution de 0,2 μm !

4- Microscope : système optique (initialement) grossissant, composé d'au moins 2 lentilles convergentes appelées objectif (lentille proche de l'objet) et oculaire (lentille proche de l'œil). Le microscope est caractérisé par **(Voir Fig. 2.2)**

- son **grossissement ou puissance** : égal au produit du grossissement (ou puissance) de l'objectif et de l'oculaire

- son **pouvoir de résolution**, fonction de la longueur d'onde du rayon utilisé

Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer. Cela explique les limitations de certains microscopes.

La distance de travail (distance objectif – objet) varie de 30mm pour un objectif (de grossissement) 5 à 0,2mm pour un objectif 100 à immersion !

Un microscope peut travailler en :

Transmission : la lumière traverse l'objet à visualiser (qui doit être translucide !). Les photons interagissent avec la matière de l'objet, ce qui génère 2 types d'effet mis à profit en microscopie optique :

Absorption (ou atténuation) ce qui donne une image colorée en « lumière blanche » ou en nuance d'intensité en lumière monochromatique.

Contraste de phase : application de la théorie ondulatoire et du mécanisme de diffraction de la lumière par tout point de l'objet. **(Voir Fig. 2.3)**

Les rayons lumineux diffractés par 2 points proches s'additionnent pour donner un rayon dont l'intensité dépend de la différence de phase (imperceptible par l'œil) entre les 2 rayons lumineux se recombinant. Ce retard dépend de l'indice de réfraction (vitesse de la lumière dans l'objet) et de la hauteur de l'objet au niveau de chacun des 2 points de l'objet. Cette différence de trajet parcouru par les rayons initialement en phase, à une vitesse caractérisée par l'indice de réfraction, « retarde » un rayon par rapport à l'autre, engendrant une différence de phase et donc d'intensité lumineuse, seule perceptible par l'œil. Comme les objets biologiques ont des indices de réfraction proches, le décalage de phase dépend essentiellement de la longueur du trajet optique dans la préparation, c'est à dire de sa hauteur. Un dispositif optique simple (anneaux de phase) permet de ne sélectionner que les rayons diffractés, en éliminant les rayons réfractés.

Les techniques utilisant le contraste de phase ne s'appliquent qu'à des **préparations « ayant un relief »** : étalement de cellules, cultures de cellules, ... Elles ne sont pas adaptées à des préparations d'épaisseur constante comme les coupes de tissus !

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. L'intensité étant fonction de l'orientation des parois par rapport au système optique, cela donne une image « en relief » de l'objet. Elles ne sont donc pas applicables à des objets sans relief comme les coupes de tissus ! Elles nécessitent « un éclairage latéral » de l'objet.

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.

Réémission : cela correspond essentiellement à la microscopie en fluorescence. Les photons illuminant les molécules fluorescentes de l'objet sont captés par ces molécules instables qui les réémettent à une longueur d'onde différentes. **(Voir Fig. 2.4)**

Un photon d'énergie E ($E = h c/\lambda$) peut être capté par un atome (d'un fluorochrome) si son énergie correspond à un saut quantique : un électron périphérique passe alors de son niveau énergétique de base, sur son orbitale, à un niveau supérieur (sur la même orbitale). Cet état est instable : l'électron va revenir à son niveau de base soit immédiatement (fluorescence), soit ultérieurement



(phosphorescence). Le retour au niveau de base comporte généralement l'émission d'une partie de l'énergie (e) sous forme de vibrations ou d'échauffement (non radiative) puis retours au niveau de base par émission d'un photon d'énergie E' :

$$E' = E - e \Rightarrow E' < E \Leftrightarrow \lambda' > \lambda \text{ (} E = h c/\lambda \text{ !)} : \text{Fluorescence de Stockes}$$

Dans certains cas, il n'y a pas d'émission non radiative. Les microscopes utilisant ces photons sont les microscopes en seconde (ou troisième) harmonique : non-vus dans ce cours.

L'absorption simultanée de 2 ou plusieurs photons se traduit par un saut quantique de 2 ou nE :

$E' = nE - e \Rightarrow E' \gg E \Leftrightarrow \lambda' \ll \lambda$: **Fluorescence anti-Stockes** : microscopes bi et multiphotoniques

Un atome qui absorbe un photon dans l'ultraviolet ($\lambda < 400 \text{ nm}$) et qui réémet dans le visible ($400 < \lambda < 800 \text{ nm}$) est appelé un fluorochrome, car capable de faire de la fluorescence.

Ces photons sont réémis dans toutes les directions, seule la faible fraction réémise en direction de l'objectif « sera vue », ce qui nécessite des puissances d'illumination importantes.

Les microscopes à fluorescence sont dits à épifluorescence : le faisceau incident illumine la préparation par l'objectif grâce à des miroirs particuliers, les miroirs dichroïques. Des jeux de filtres permettent de sélectionner les rayons incidents et réémis pour les adapter à chaque fluorochrome.

UTILISATION DU MICROSCOPE OPTIQUE

Le microscope permet d'observer les cellules d'un tissu, mais dans des conditions très strictes : il faut que l'objet à examiner soit transparent à la lumière. Les objets biologiques ne le sont que rarement, à l'exception des objets naturellement très minces : suspensions (sang, ..) ou cultures cellulaires.

Il faut donc les découper en tranches très minces (= **coupes**) de l'ordre de 5 à 10 microns. Pour cela, il faut « durcir » l'objet par différentes techniques physiques ou chimiques.

Mais la coupe causerait des dommages irréparables aux tissus et aux cellules et l'observation ne correspondrait pas à la réalité des cellules vivantes : séparation physique de structures proches plus ou moins entraînées par l'outil de coupe, libération d'enzymes lytiques (protéases essentiellement) contenues dans des compartiments spécifiques (lysosomes, péroxysomes, ...)

il faut donc au préalable "immobiliser" les structures dans un état aussi proche que possible de l'état vivant et inactiver ces enzymes : c'est le but de toute une série de manipulations qui amèneront les objets biologiques à l'examen convenable au microscope.

1°) Examen de tissus fixés en coupes : (Voir Fig. 2. 5)

a) - Fixation : pour immobiliser les structures vivantes on les plonge dans des solutions appelées **fixateurs** qui sont des solutions très diluées (de 1 à 10%) d'aldéhydes en général - formol, glutaraldéhyde - ou de sels oxygénés de métaux lourds - bichromates, tétroxyde d'osmium Os O_4 - . Dans ces conditions les cellules sont tuées certes, mais dans un état très proche du vivant, les différentes structures subcellulaires sont reliées entre elles et les enzymes inactivées.

Les objets fixés, il faut les durcir ce qui permettra une très faible épaisseur de coupe compatible avec l'observation par transparence (sinon on « mâche » la préparation !). On peut utiliser des procédés physiques (changement d'état physique en fonction de la température) ou chimiques (réaction de polymérisation permettant de passer d'un monomère liquide à un polymère solide). En microscopie optique, les techniques physiques réversibles sont amplement suffisantes.

L'eau est le composant le plus abondant (75%). Il est aisé de la faire passer à l'état solide en baissant la température en dessous de 0°C (**congélation**). Cette technique est réservée à certaines applications très spécifiques (cf. extemporanée).



La technique la plus courante consiste à les imprégner et les enrober dans la **paraffine** qui est solide à température ambiante et liquide à 50°C, une température peu élevée n'altérant pas les structures cellulaires.

Or la paraffine est une substance hydrophobe, incompatible avec l'eau intracellulaire. Il faudra une étape supplémentaire de déshydratation.

b) - Déshydratation :

Pour déshydrater les tissus, on les plonge dans des alcools de degrés croissants, 50°, 70°, 80°, 90°, 100°, pendant le temps nécessaire à l'équilibre des concentrations. L'alcool se substitue à l'eau dans tous les compartiments tissulaires et cellulaires.

c) - Enrobage (ou inclusion) : l'alcool n'étant pas parfaitement miscible avec la paraffine, on plonge le tissu déshydraté dans un solvant organique intermédiaire miscible à l'alcool et la paraffine, le xylène, puis 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.

d) - Coupe : (Voir Fig. 2. 6)

on utilise des **microtomes** qui sont des appareils permettant de débiter les blocs de paraffine en coupes de quelques microns à quelques dizaines de microns. Les forces de frictions entre couteau et bloc échauffent la paraffine et la mettent en surfusion, ce qui permet de coller les coupes les unes à la suite de l'autre : ruban de **coupes sériées**. On les recueille sur des lames de verre (**porte-objets**) autrefois enduites d'une solution d'ovalbumine qui les colle sur la lame en séchant. Actuellement on utilise des verres traités chimiquement (*présence de groupement silanols*).

e) - Ré hydratation : les coupes collées sur 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.

f) - Coloration : les objets biologiques coupés et examinés par transparence ne sont pas ou peu colorés: ils offrent très peu de contraste, donc de visibilité, et aucun détail ne peut être perçu. Il faut renforcer le contraste de couleur des différents organites ou mieux les colorer. On utilise deux catégories de colorants :

- **les colorants signalétiques**, ou topographiques, permettant de repérer la forme précise des cellules et de leurs organites les plus volumineux.

Les plus courants sont :

l'hématoxyline, qui colore les noyaux cellulaires en bleu violacé

l'éosine, qui colore les cytoplasmes en rose

Les bleus (Bleu de méthylène, de toluidine) sont également employés en routine.

L'emploi d'un seul colorant est peu informatif, ils sont donc généralement utilisés en association, à 2 (H. E.), 3 (trichrome) ou exceptionnellement plus (4 : tétrachrome de Herlant).

Hématoxyline et éosine sont très souvent associés sur la même lame. C'est la technique de coloration la plus courante (H. E.).

Trichrome de Masson : hématoxyline-éosine-vert de méthyle.

le May-Grümwald-Giemsa : mélange de bleus et d'éosinates de bleu de méthylène, est la coloration de référence en hématologie (M. G. G.)

La plupart des colorants classiques mettent à profit des affinités physico-chimiques (acide, base) avec les molécules composant les structures subcellulaires :



Les colorants basiques vont se fixer préférentiellement sur les parties acides de la cellule (essentiellement les acides nucléiques - noyau, REG - ou les lysosomes). Ces structures présentent une affinité pour les substances basiques ce qui définit (étymologiquement) une région **basophile**.

Les colorants acides cibleront les régions basiques. Au pH intracellulaire, la plupart des protéines se comportent comme des bases (appareil contractile des cellules musculaires, vésicules de sécrétion protéique). De la même façon, on parlera de région **acidophile ou éosinophile** (éosine = colorant acide)

- **les colorants cytochimiques ou histochimiques** qui colorent les différentes substances chimiques contenues dans les cellules de façon spécifique (cf. méthodes cytochimiques, II.B).

g) - Observation : après la coloration, on ajoute sur la **lame porte-objets** une goutte d'un milieu de montage, une substance de même indice de réfraction que le verre, (baume du Canada ou résine synthétique) et on recouvre d'une lamelle de très fine épaisseur (**couvre-objet**). On laisse sécher et la préparation est examinée au microscope. L'observation peut s'effectuer avec un objectif « à sec » (air entre lamelle et objectif créant 2 dioptries air - verre) ou « à immersion » avec de l'huile de cèdre dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre pour atténuer l'effet des dioptries (tout comme l'emploi du baume du Canada comme colle).

L'observation visuelle ne laisse qu'une trace, parfois éphémère, dans la mémoire. Pour transmettre ces observations, on peut utiliser le dessin (dispositif optique de projection sur feuille de dessin), la photographie (cliché, cinématographie), la numérisation d'image (cliché, vidéo) complétées par un traitement d'images. Le traitement informatique permet d'améliorer la qualité des images : détermination des structures fixes du nucléopore par compilation orientée de multiples images et analyse statistique de la pertinence de chaque pixel (images de microscopie électronique en transmission)

2°) Extemporaneé et coupe à congélation

Les techniques habituelles qui conduisent à l'observation au microscope des objets biologiques sont trop longues dans certaines circonstances où un diagnostic immédiat est nécessaire. Au cours d'une intervention chirurgicale, par exemple, le chirurgien a besoin d'avoir, en quelques minutes, l'avis d'un anatomopathologiste avant de poursuivre son geste. Pour cela on utilise les « coupes à congélation » qui sont pratiquement instantanées (pas de fixation, d'inclusion en paraffine, ...).

L'échantillon est directement congelé par du CO₂ sur la platine porte-objet amovible d'un microtome enfermé dans une enceinte réfrigérée ou cryotome. Malgré cela, les forces de frictions entraînent un échauffement qui pourrait décongeler la coupe et léser la préparation (coupe « mâchée » par le rasoir). Pour éviter cela on est obligé de réaliser des coupes épaisses (>15 µm). Les coupes n'étant pas fixées devront être conservées congelées. Elles ont 2 utilisations principales :

- Les **extemporanées**, en peropératoire, dans le cadre d'un diagnostic : les coupes sont recueillies congelées sur des lames, immédiatement colorées et observées au microscope.

- La **cyto-** ou l'**histo-enzymologie** : les coupes n'étant pas fixées, les enzymes sont actives. On peut analyser leur activité et leur localisation.

Les coupes obtenues au moyen des cryostats n'ont pas la qualité de celles obtenues par les techniques classiques, mais elles apportent un complément quelquefois indispensable.

3°) Examens de cellules sur frottis : (Voir Fig. 2. 7)



Lorsque les objets à examiner sont des cellules en suspension dans un liquide, la procédure est simplifiée car les objets sont directement translucides par leur faible épaisseur. : liquides tels que le sang, liquides d'aspiration, exsudats, ou frottis vaginaux, buccaux, etc.

Il suffit de déposer une goutte de suspension sur une lame et d'étaler avec une autre lame pour obtenir une couche unicellulaire qui sèche instantanément (voir schéma).

La fixation n'est pas systématique : une dessiccation rapide peut suffire. L'absence de coupe ne dissocie pas les structures subcellulaires et les enzymes ne fonctionnant qu'en solution se trouvent ipso facto inactivées.

On peut alors colorer par des colorants signalétiques ou cytochimiques. Certaines colorations comme le MGG incluent des fixateurs de faible efficacité (méthanol) dans leur procédure.

4°) Examens de cellules vivantes :

Une cellule animale dépourvue d'exosquelette se déshydrate très rapidement dans l'air. Son observation ne peut s'effectuer qu'en milieu liquide. L'observation en milieu de culture permet de maintenir la physiologie cellulaire. Mais les boîtes de culture interdisent des objectifs de grossissement utile (maximum X5). L'astuce consiste à inverser le montage du système optique : on illumine la boîte par le haut (les condenseurs actuels permettent de focaliser la lumière sur le fond de la boîte de culture) et l'on observe à travers le fond : **microscope inversé (Voir Fig. 2.8)**.

L'épaisseur des boîtes de cultures (Pétri, flasques, ...) étant d'environ 0,5 mm, la puissance maximale des objectifs utilisables est de X40. Toutes les techniques microscopiques sont applicables au microscope inversé, mais les plus utilisées sont le fond clair (microscopie en transmission simple), les contrastes de phase et la fluorescence. Actuellement on utilise parfois des microscopes à platine chauffante (37°C) surmontée d'une enceinte maintenant une atmosphère enrichie en CO₂ (*maintien du pH du milieu de culture*), ce qui autorise la vidéomicroscopie sur de longues périodes (>1h.).

Comment observer correctement les cellules vivantes ?

Il faut utiliser des techniques qui augmentent les contrastes sans toxicité pour la cellule.

a) les méthodes chimiques, les colorants vitaux : la quasi totalité des colorants sont très toxiques pour les cellules, quelques rares colorants n'ont pas cet inconvénient. Ils augmentent le contraste d'absorption de certaines longueurs d'onde, conférant une couleur aux structures qui les retiennent. On peut citer :

Le Vert Janus B spécifique des mitochondries

Le bleu de Trypan, qui ne peut pénétrer dans des cellules vivantes, mais qui colore les cellules mortes (test d'exclusion du bleu trypan) : il est très utilisé pour évaluer la vitalité des cellules. *Les colorants d'exclusion dérivent d'une technique utilisée par les microbiologistes qui visualisaient des levures par contraste en les dispersant dans l'encre de Chine.*

b) les méthodes physiques, le microscope à contraste de phase : (Voir Fig. 2. 3)

5°) Les différents microscopes optiques

Le développement de ces microscopes répond principalement à 2 objectifs :

- augmenter les contrastes pour mieux visualiser les structures subcellulaires
- améliorer le pouvoir de résolution (i. e. voir des détails de plus en plus petits !)

Microscope en fond clair.

Il s'agit d'un microscope normal (microscope droit) utilisé en transmission.

N.B. : on appelle **technique histologique usuelle** l'observation de coupes histologiques colorées en fond clair. Par opposition toutes les autres techniques sont dites **techniques spéciales** : fluorescence,

...



Stéréo microscopes ou loupes binoculaires ou microscopes chirurgicaux.

Ils utilisent les rayons réfléchis et permettent d'observer la surface des objets, dans les trois dimensions de l'espace. La lumière ne traverse pas l'objet et la vision binoculaire restitue son relief. On peut ainsi observer des objets vivants ou fixés de très petite taille (pollens, petits insectes) ou s'en servir pour pratiquer des interventions chirurgicales sur des structures très fines. Le grossissement utile n'est que de 80 au lieu de 1250 pour les microscopes habituels cités plus haut (nécessité d'utiliser un rayonnement réfléchi et de disposer d'une distance de travail utile pour le chirurgien).

Microscope à contraste de phase. Cf. microscopie en transmission**Microscopes à contraste interférentiel différentiel** (CID ou effet Nomarski).

Application particulière du contraste de phase qui donne des images contrastées, en relief (il s'agit en fait d'une impression).

A fond noir.

Un condenseur spécial illumine la préparation sous une incidence rasante, seul les rayons réfléchis sont captés par l'objectif : le fond du champ d'observation est noir, et le moindre objet apparaît brillamment éclairé. Cela permet d'observer des objets dont la dimension est à la limite extrême du pouvoir séparateur, et qui passeraient inaperçus avec les techniques ordinaires. Mais ces objets devenant des sources lumineuses, leur forme et leur dimension ne peuvent pas être correctement appréciées.

A lumière polarisée. (très peu utilisé en biologie)

Les photons lumineux passant à travers certains matériaux tels que les filtres Polaroid ou certains cristaux (Nicol) en ressortent "polarisés" : ils ne vibrent plus que dans un seul plan. Si un second filtre Polaroid ou un second Nicol est disposé sur leur trajet on peut par rotation de ce second filtre les arrêter complètement et obtenir l'extinction totale du faisceau. (Nicol "croisés")

Si on place entre les deux filtres croisés un objet actif sur la lumière polarisée, tel qu'une substance organique possédant un carbone asymétrique ou un arrangement moléculaire ordonné, le plan de polarisation est dévié et l'extinction est levée, la lumière issue de l'objet traverse le second filtre. Il faudra opérer une rotation du second filtre pour obtenir à nouveau l'extinction.

Un microscope à lumière polarisée est équipé d'un premier filtre au niveau du condenseur et un second filtre en position croisée dans le tube optique

Microscopie en fluorescence

L'amélioration du pouvoir de résolution exige des longueurs d'onde les plus petites possibles, notamment les rayons ultraviolets (UV, < 400 nm). Or ces longueurs d'onde ne font pas partie du spectre visible (= longueur d'onde décelable par la rétine). On est donc restreint à visualiser une substance naturellement fluorescente ou rendue telle par fixation d'un **fluorochrome** qui va transformer les UV invisibles en lumière visible. Les structures fluorescentes étant des sources lumineuses, cela annule le gain en pouvoir de résolution (impossibilité de discerner avec précision la forme et les dimensions d'une source lumineuse). Néanmoins, ce type de microscopie est très utilisé car il permet de localiser spécifiquement certaines substances dans une cellule ou un tissu (voir plus loin immunofluorescence et GFP).

Microscopie confocale et déconvolution (Voir Fig. 2. 9)

La profondeur de champs d'un microscope correspond à « l'épaisseur » de la préparation ou tout objet donnera une image nette par un microscope. Cette profondeur de champs diminue avec la puissance des objectifs. Cela ne pose pas de problème majeur en microscopie en lumière visible, mais devient une source de nuisance détériorant la netteté des images en fluorescence : tous les fluorochromes présents dans la zone de netteté et les zones voisines émettent de la lumière qui se



superpose sur l'image, générant un flou. Aux forts grossissements, les images sont polluées par la fluorescence émise par les plans contigus au plan focal (plan focal = plan de mise au point, profondeur = ensemble des plans focaux pour un grossissement donné).

Deux techniques ont été développées pour résoudre ce problème :

- Une technique mathématique : la **déconvolution**
- Une technique d'optique physique : le **microscope confocal**

Ces techniques permettent d'enregistrer des images nettes de chaque plan focal (à grossissement élevé) et en faisant varier la position de l'échantillon par rapport au plan focal, d'accéder à la troisième dimension (*en fait tout se passe comme si l'on modifiait la hauteur du plan focal par rapport à l'échantillon : en réalité, le plan focal est fixe, mais la position en Z de l'échantillon est variable en modifiant la hauteur de l'objectif, problème de relativité !*). La numérisation de chaque plan focal et leur traitement informatique permet de générer une vue 3D d'un échantillon épais (de réaliser un scanner ou tomographie cellulaire !). Le pouvoir de résolution en X, Y est celui de tout bon microscope, soit $0,2 \mu\text{m}$, en Z il est nettement moins bon, $0,6 \mu\text{m}$.

Comment cela marche ? Très simple (en résumé !)

Déconvolution : on numérise l'image d'une bille calibrée par le microscope, l'image obtenue est floue. On calcule la fonction mathématique qui permet de passer de l'image observée floue à l'image théorique nette. Cette fonction mathématique, appliquée à l'image numérisée, permet de générer une image nette du plan focal.

La déconvolution reste peu développée car elle nécessite une puissance informatique importante et présente encore certaines limites.

Confocal (Voir Fig. 2.9) peut être utilisé en transmission (visible) et en épifluorescence. Nous ne verrons que cette dernière qui est plus simple et la plus utilisée.

L'image d'un point lumineux par un système optique parfait (cela n'existe pas) est un point, l'image de points lumineux situés sur des plans voisins du plan focal sont des disques (des tâches !) sur le plan image (la focalisation en un point se faisant avant ou après le plan image). Pour ne sélectionner que le point « focal », il suffit de placer un écran opaque percé d'un minuscule orifice (un sténopé ou pinhole – tête d'épingle - en anglais) sur le plan image : toute l'intensité lumineuse provenant du point sera perçue par le détecteur situé derrière le sténopé (photomultiplicateur – PMT - ou caméra CCD à haute sensibilité), alors que seule une infime partie de l'intensité provenant de points voisins du plan focal sera détectée.

Il est donc indispensable que ce sténopé soit correctement positionné sur le plan image du plan focal de l'objectif, c'est à dire que ces **2 plans soient confocaux**.

D'un point de vue pratique, ce type de microscope nécessite une forte intensité lumineuse excitatrice, donc un laser, dont les rayons sont focalisés sur le plan focal par les lentilles de l'objectif. 2 miroirs placés dans l'optique permettent un balayage du plan focal en X, Y. La dimension Z est obtenue en contrôlant la hauteur de l'objectif du microscope. L'acquisition de l'image s'effectue point par point (pixel par pixel) et seule l'informatique permet de reconstituer une image en 2D puis en 3D (équivalent d'une tomographie cellulaire).

N.B. : les optiques n'étant pas parfaites, le faisceau laser n'est pas focalisé en un point mais en un petit volume (on parle de voxel) où l'intensité est telle que l'on va détruire les fluorochromes (voir plus loin, photobleaching). Si ce volume est trop important, l'acquisition du plan focal suivant sera déficiente, par absence de fluorochromes. La résolution de ce problème ne peut plus passer par une amélioration technique de la taille des lentilles optiques. La réponse à ce problème a permis la mise au point des microscopes bi et multiphotoniques, dont les applications vont bien au-delà de ce problème et ouvrent une dimension supplémentaire : la microscopie sur métazoaire vivant !

Microscopie à 2 photons et multiphotoniques. (Voir Fig. 2.10)



Ces techniques dérivent de la fluorescence.

Un fluorochrome peut exceptionnellement capter 2 (ou n) photons simultanément (*en moins de 10^{-16} s. !*). Le rayonnement de fluorescence aura une longueur d'onde beaucoup plus petite que le rayonnement excitateur (*Fluorescence anti Stokes : 2 fois plus petite en microscopie dite en seconde harmonique, SHG*). Pour augmenter la probabilité d'un tel événement, on est obligé d'utiliser des lasers très spécifiques (lasers femtoseconde). L'intensité de fluorescence réémise est proportionnelle au carré de l'intensité excitatrice (optique non linéaire) ce qui permet d'obtenir une intensité de fluorescence décelable pour une intensité excitatrice faible. Assez de théorie, à quoi cela sert-il ?

On peut exciter les fluorochromes avec des infra rouges (> 800nm) : ces IR sont beaucoup moins absorbés par les tissus que le visible ou les UV, donc vont pouvoir pénétrer des objets très épais. Comme la fluorescence ne s'effectue qu'au point de focalisation (probabilité d'absorption simultanée de 2 photons), il n'y a pas de fluorescence hors zone de focalisation, donc moins de destruction des fluorochromes et moins de fluorescence polluante. Enfin l'intensité délivrée par ces lasers est tellement brève qu'elle ne lèse pas les tissus (on ne « brûle » pas les tissus traversés).

On peut donc faire de la microscopie 3D sur des objets de 0,5 mm d'épaisseur et même sur des animaux vivants (microscopie de cortex cérébral sur rat trépanné !) Mais les qualités optiques de ces nouveaux microscopes restent pour l'instant en deçà de celles des microscopes plus conventionnels.

B/ LE MICROSCOPE ELECTRONIQUE :

L'utilisation de rayonnement à très courte longueur d'onde permet théoriquement d'augmenter le pouvoir de résolution. Mais nombre d'entre eux sont inexploitable car nous ne disposons pas de moyen d'infléchir leurs trajectoires pour réaliser des dispositifs convergents équivalent des lentilles optiques.

Seuls les faisceaux d'électron sont incurvables lorsqu'ils traversent un champ électromagnétique. Leur emploi fut proposé par Ruska dès 1929. Les électrons interagissent beaucoup avec la matière. Ils sont d'autant plus absorbés par des atomes que leur masse atomique est élevée. Ceci aura de nombreuses conséquences :

- nécessité de travailler dans le vide, d'où des contraintes d'appareillage et de préparation des échantillons
- préparation excessivement fine (50 nm) : contraintes techniques
- impossibilité d'utiliser des lames de verre comme support, remplacées par des grilles (observation restreinte aux mailles de la grille)
- mise au point de « colorants » spécifiques

Le faisceau lumineux, composé de photons, est remplacé par un faisceau d'électrons.

On y gagne ainsi en pouvoir séparateur (de 0,1 μm à 2 à 3 \AA , pour mémoire 1 \AA = 0,1 nm).

La longueur d'onde moyenne des électrons (faisceau non « monochromatique ») varie suivant la tension accélératrice V du canon à électron :

V (volt)	10 000	50 000	100 000	1 000 000
λ (nm)	0,0123	0,0055	0,0039	0,0012

Il existe deux types d'appareils : le microscope électronique à transmission et le microscope électronique à balayage.

1°) Le microscope électronique à transmission (MET) : (Voir Fig. 2. 11)

Structure similaire à celle des microscopes photoniques (inversés) !

Le faisceau d'électrons 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. Comme la



puissance de ces lentilles dépend du courant électrique appliqué aux bobines électromagnétiques, les ME présentent une variation continue de puissance (différence avec le MO).

Un premier jeu de bobines -condensateur- focalise le faisceau sur l'échantillon, puis un deuxième jeu de bobines -objectif- fait une image de l'objet, enfin une troisième bobine projette l'image agrandie sur un écran fluorescent afin de rendre l'image visible. Cette image est observée directement au travers de hublots en verre très épais traité au plomb, pour arrêter les rayons X nocifs ou fixées sur un cliché photographique (électronographie). Les appareils de nouvelle génération sont pourvus d'un équipement informatique qui permet de numériser les images obtenues et de les traiter (cf. détermination de la structure du nucléopore).

Préparations à observer

Compte tenu de la finesse des détails observables, les fixations doivent être plus stringentes : on emploie le **glutaraldéhyde**, puis on réalise une post fixation à l'**acide osmique OsO4**.

L'obtention de coupes ultra-minces (50 nm) nécessite d'enrober les objets dans un matériau plus dur que la paraffine (méthode chimique). On utilise les **résines époxy** (polymérisation irréversible) : **araldite, cyanolite ou métacrylate**. Toutes les préparations doivent donc être réalisées avant l'inclusion, hormis l'imprégnation par les sels de métaux lourds.

Les coupes (**Voir Fig. 2. 12**) sont réalisées avec un **ultra microtome** et sont recueillies sur **grilles** et non sur lames. Dans cet appareil d'une très grande précision, l'avance mécanique est remplacée par une avance thermique réglée par un dispositif électronique, le couteau d'acier est remplacé par un couteau de verre ou de diamant et les opérations se font sous le contrôle d'une loupe binoculaire.

En MET, le contraste résulte uniquement d'une différence d'absorption des électrons sur une coupe d'épaisseur constante (par nature). Or la matière organique est composée principalement de ^1H , ^{12}C , ^{14}N et ^{16}O , générant peu de contraste (masses atomiques proches). On « colore » artificiellement en utilisant des atomes de masse élevée, en général des métaux lourds comme ^{55}Fe (sous forme de ferritine), ^{196}Au , ^{207}Pb et ^{238}U . Ils s'emploient comme :

- Colorants signalétiques : imprégnation des coupes (après inclusion) par du **Citrate de Plomb** ou de l'**Acétate d'Uranyle**. Ces sels s'adsorbent différemment sur la coupe, générant des contrastes.
- Colorants spécifiques : par fixation des métaux sur des sondes spécifiques d'une molécule (et donc d'une structure), en général ces sondes sont des **anticorps** (cf.méthodes immunocytochimiques). Il est alors indispensable de « colorer la préparation avant l'inclusion !

A l'observation, il est nécessaire de travailler rapidement car les coupes souffrent sous le faisceau d'électrons très énergétiques (60 à 80 KV voire même plus).

Microscope à très haut voltage:

Ces microscopes travaillent avec des tensions accélératrices d'un million de volts et plus. Les électrons ont alors une énergie d'au moins un Méga Electron Volt et peuvent traverser des préparations de quelques microns d'épaisseur, ce qui permet d'observer, **en entier**, des objets biologiques : des mitochondries (voir plus loin les mitochondries des entérocytes) ou encore des chromosomes etc...

2°) Le microscope électronique à balayage (MEB) : ou Scanning electron microscope (SEM)

Son but est l'observation de la surface d'un objet et son principe est le balayage de la surface de cet objet par les électrons qui sont réfléchis puis analysés par un collecteur. On peut ainsi obtenir soit une courbe sur un oscilloscope soit une image sur un moniteur.

Schéma de principe (Voir Fig. 2. 13)



Le microscope électronique à balayage est composé, tout comme le microscope électronique à transmission, d'un canon à électrons, de "lentilles", d'une colonne etc...

Mais ici, l'objet n'a pas besoin d'être inclus dans la résine, ni coupé. Par contre, cela nécessite une fixation, une déshydratation (alcool, acétone) qui malheureusement rétracte beaucoup les échantillons. D'où la nécessité de redonner leur volume initial aux cellules par le CO₂ liquide.

3°) Comparaison entre ces différentes techniques :

Le grossissement utile est de 500.000 pour le microscope électronique à transmission et 100.000 au plus pour le microscope électronique à balayage.

Le pouvoir séparateur du microscope électronique à transmission est meilleur que celui du microscope électronique à balayage.

Pour une étude complète, il faut utiliser les deux systèmes qui sont complémentaires.

4°) Cryofracture et cryodécapage : techniques spécifiques de préparation d'objets

Ces techniques **permettent d'observer des surfaces en MET**, avec le grossissement et la très haute résolution spécifique de la MET.

On refroidit un échantillon biologique jusqu'à -196°C, température de l'azote liquide, en présence d'un cryoprotecteur, puis on le fracture. Suivant la technique utilisée, l'étape ultérieure est différente. In fine, on réalise un ombrage métallique (vaporisation de Pt sous un angle oblique : ombrage). L'objet ainsi traité pourrait être observé en MEB, mais avec une faible résolution. Pour l'observation en MET, la substance organique est éliminée et la réplique est renforcée par un film de carbone (peu opaque aux électrons). La notion de relief est rendue par l'épaisseur de métal déposée (dépôt oblique = principe de cartographie !).

a) Cryofracture. (Voir Fig. 2. 14)

Il n'y a pas d'étape intermédiaire entre la fracture et l'ombrage. Le plan de clivage lors de la cryofracture passe préférentiellement par les zones de moindre résistance comme la région hydrophobe entre les 2 couches des membranes biologiques. Cette technique est donc particulièrement adaptée à l'observation des membranes

b) Cryodécapage.

Après fracture, on élimine l'eau dans laquelle baignent les structures subcellulaires par sublimation (*transition solide – gaz : cf. diagramme d'état*). Les structures ainsi dégagées de leur gangue de glace sont ombrées puis traitées comme ci-dessus. Cela permet d'observer différentes structures comme le cytosquelette cortical, ...

C/ MICROSCOPIES EN CHAMP PROCHE : (Voir Fig. 2. 15)

Ces microscopes n'ont rien de commun avec les précédents.

Ils sont désignés sous le vocable champ proche car le détecteur, une nanopointe (pointe très fine : un seul atome en bout), est approchée très près de la surface de l'objet à étudier (de l'ordre du nm ; pour mémoire 1 Å = 0,1 nm – est l'unité de mesure des rayons atomiques). Il est donc impensable d'observer des cellules beaucoup trop épaisses (> 1 µm), seules des structures subcellulaires très minces comme des complexes macromoléculaires sont analysables. Ces techniques, développées par des physiciens (industrie des semi-conducteurs, métallurgistes, chimistes) commencent à être appliquées à la biologie.



Microscope à effet tunnel (STM = Scanning Tunneling Microscope) : dans le vide, la nanopointe balaie la surface de l'objet à une distance constante du support entre lesquels on maintient une DDP constante. Il se crée entre eux un tunnel quantique. En résumé, un courant (des électrons) passe. L'intensité de ce courant est inversement proportionnelle à la résistance qui dépend de la distance nanopointe – objet (application de la loi d'Ohm : $U = R I$, tout simplement !). L'enregistrement des variations de ce courant correspond à un relevé topographique de la surface de l'objet à analyser. Le STM nécessite des objets conducteurs ou semi-conducteurs, donc ne s'applique pas aux objets biologiques (**Voir Fig. 2. 15**)

Microscope à force atomique (AFM): La pointe est rapprochée plus près de l'échantillon et mesure les forces qui s'exercent entre les atomes (van der Waals, magnétiques, électrostatiques...). En résumé, elle « rebondie » sur les surfaces atomiques. Un dispositif optique (réflexion d'un laser sur un miroir solidaire de la pointe) permet d'enregistrer les variations de hauteur de la pointe balayant la surface de l'objet, donnant, là aussi, un relevé topographique de la surface de l'objet.

Ceci s'applique à tout objet, conducteur ou isolant, placé dans n'importe quel type de milieu (air, liquide, vide, ...). L'AFM est donc applicable aux objets biologiques !

II / DETERMINATION DE LA NATURE CHIMIQUE DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

A / ANALYSE CHIMIQUE GLOBALE : cf. biochimie

Après prélèvement d'un tissu (ou de cellules), on pratique un broyage puis une séparation des éléments par les techniques classiques de biochimie :

- centrifugation, ultracentrifugation
- chromatographie sur gel, sur colonne, ou gazeuse
- éventuellement électrophorèse

On analyse alors les différentes fractions obtenues, en vue de caractériser les ou la substance recherchée.

B / METHODES CYTOCHIMIQUES :

Il s'agit de véritables réactions chimiques applicables à l'échelle de la cellule, pratiquées sur coupes, entre lame et lamelle, ou lorsque c'est possible, sur l'échantillon entier avant les opérations de déshydratation, inclusion, etc (= "sur bloc").

La démarche vise à caractériser dans une cellule ou un groupe de cellules, une substance, avec des réactions de spécificité croissante. Un exemple de chaque type de spécificité sera donné :

1/ Mise en évidence des polysaccharides par la réaction au P.A.S. ou A.P.S. (acide per-iodique Schiff) : (Voir Fig. 2. 16)

Le réactif de Schiff (*fuschine basique*), incolore, se colore en rouge en présence de fonctions aldéhydes. Dans les polysaccharides, ces fonctions sont masquées par les structures cycliques des oses, et inaccessibles au réactif. Dans un premier temps, on ouvre les cycles par oxydation à l'acide per-iodique IO_4H qui génère 2 aldéhydes (*1 sur chaque carbone dissocié*). Dans un second temps, on applique le réactif de Schiff qui colore en rouge la ou les cellules qui contiennent des polysaccharides ainsi modifiés.



2/Mise en évidence de l'ADN : réaction de Feulgen (Voir Fig. 2.16 et 2.17)

La réaction de Feulgen, comme le P.A.S., utilise le **réactif de Schiff** pour mettre en évidence des fonctions réductrices (aldéhydes HC=O). Elle est très spécifique de l'ADN et quantitative (utilisée autrefois pour évaluer la quantité d'ADN).

L'ADN est un polymère de nucléotides comportant un ose spécifique, le désoxyribose sous forme cyclique (sa fonction réductrice est donc masquée). Le désoxyribose, par sa structure chimique spécifique, ne peut pas réagir à l'hydrolyse par l'acide periodique, donc ne réagit pas au P.A.S.. L'astuce consiste à changer « l'hydrolyse ».

Une hydrolyse par l'acide chlorhydrique **HCl à chaud** (60°C) dépurine l'ADN (enlève les bases puriques A et G) et ce qui permet l'ouverture spontanée du cycle et la restitution de sa fonction réductrice.

3/ Recherche du Fe⁺⁺ : réaction de Perls

La réaction de Perls, au ferrocyanure de potassium, permet de révéler la présence de stock de fer. Elle est très utilisée en hématologie, sur prélèvement médullaire pour le diagnostic des anémies.

4/ Cyto- ou Histo-enzymologie : (Voir Fig. 2. 18)

On peut rendre la réaction plus spécifique en la couplant avec une réaction enzymatique. Par exemple, dans les cellules colorées précédemment par le P.A.S., on veut savoir s'il s'agit de glycogène plutôt que d'un autre polysaccharide.

- sur une partie de coupes sériées, on fait agir au préalable de l' α amylase salivaire, éliminant le glycogène

- puis on applique la réaction au P.A.S sur toutes les coupes

- si la lame entière est colorée, il ne s'agit pas de glycogène

- si la partie de la lame soumise à l'action de l'enzyme reste incolore, il s'agit bien de glycogène : l'enzyme, spécifique du glycogène a dégradé ce sucre et le P.A.S. n'a pas agi.

5/ Utilisation d'une molécule d'affinité spécifique de la substance à mettre en évidence

Exemple : la phalloïdine, poison extrait de l'amanite phalloïde est spécifique de l'actine. Purifiée et couplée à un fluorochrome, elle devient un outil pour détecter l'actine dans des cellules en microscopie en fluorescence.

Tout type de liaison d'affinité peut être mis à profit (vous les verrez progressivement au cours de vos études : les couples Enzyme – Substrat, Lectines - Sucres, Protéine – Protéine, Vitamine – molécules utilisant des vitamines (Biotine – Streptavidine), acides nucléiques entre eux (cf. sondes d'hybridation), molécules diverses (en général des toxines) comme la phalloïdine, Antigène et Anticorps.... La réaction antigène - anticorps est tellement développée que cela fait l'objet d'un paragraphe spécifique.

6/ Immunocytochimie :

On peut aller plus loin dans la spécificité en employant des anticorps spécifiques de la substance dont on veut prouver la présence. Ces anticorps seront au préalable marqués par des substances facilement détectables à l'observation. La réaction s'effectue sur la lame histologique, après réhydratation.

a) en microscopie optique :(Voir Fig. 2. 19)

Il existe 2 types de marquage des anticorps :

- marquage par une enzyme : **Immuno-Enzymologie.**

Les enzymes utilisées sont la **peroxydase** du Raifort ou la **phosphatase alcaline** qui donnent des produits colorés insolubles précipitant là où se trouve l'anticorps et donc la substance (l'antigène) à localiser.



N.B. : l'emploi de substrat donnant des produits solubles a conduit à une technique très utilisée pour doser, la technique ELISA que vous verrez par ailleurs.

- Marquage par un fluorochrome : **Immunofluorescence**

Les fluorochromes permettent l'observation au microscope à UV. Les substances recherchées sont localisées par la présence d'une zone de fluorescence.

Exemple: *quelles sont les cellules de l'hypophyse du Rat qui sécrètent de la prolactine ?*

Dans un premier temps, on isole de la prolactine de Rat.

On l'injecte à un lapin dont l'organisme réagit en élaborant des anticorps anti prolactine de Rat. On prélève du sérum de ce lapin, on isole les anticorps anti prolactine de Rat, on les purifie, et pour les rendre visibles, on les couple à une substance fluorescente aux rayons ultraviolets (= fluorochrome).

On obtient ainsi des anticorps anti prolactine de Rat fluorescents qui vont servir de réactif. Il suffit alors, sur des coupes d'hypophyse de Rat, de faire agir ces anticorps fluorescents et de rincer. Là où il y a de la prolactine, il se forme des complexes antigène-anticorps fluorescents qui restent accrochés aux structures biologiques où ils sont localisés.

On colore très légèrement les lames et on les examine au microscope à U.V. Seules les cellules contenant de la prolactine sont illuminées, le reste de la préparation est invisible. On prend deux séries de clichés du même champ, l'une éclairée par les U.V., l'autre à "fond clair", éclairée par la lumière ordinaire. En comparant les deux séries de clichés, on caractérise très précisément les cellules contenant de la prolactine.

b) en microscopie électronique : (Voir Fig. 2. 20)

Cette technique est transposable au microscope électronique. Il suffit de "marquer" l'anticorps avec une molécule opaque aux électrons :

- **Ferritine** : protéine de stockage du fer intracellulaire (4500 atomes de fer / molécule !), elles forment des grosses particules opaques aux électrons

- **Billes d'or colloïdal** de différents calibres (plus faible que la ferritine), permettant le marquage simultané de différents anticorps

- **Peroxydase** : on utilise la peroxydase du raifort, très résistante aux manipulations nécessaires à la microscopie électronique. L'enzyme donne un produit insoluble dense aux électrons qui révèle la localisation de la substance recherchée.

Méthode indirecte (Voir Fig. 2. 21)

L'emploi d'un anticorps directement marqué par le « révélateur » (fluorochrome, enzyme ou particule) constitue la méthode directe. Mais on ne fixe qu'un révélateur par antigène, donc le signal visualisable reste faible.

Pour augmenter la sensibilité (intensité du signal par antigène), on peut utiliser des systèmes à 2, voire 3 étages : ce sont les méthodes indirectes, comme l'**immunofluorescence indirecte** (technique la plus utilisée). On se sert d'anticorps anti-anticorps : anticorps "marqués" de chèvre anti-lapin qui se fixent en grand nombre sur un anticorps de lapin, réalisant un marquage beaucoup plus prononcé. Ainsi, on gagne en sensibilité tout en gardant la même spécificité. En fait, lorsqu'on augmente le nombre d'étage, on perd un petit peu de spécificité ! (*Vous verrez plus tard en immunologie pourquoi*).

7/ Green Fluorescent Protein (GFP) : (Voir Fig. 2. 22)

Découverte en 1962 chez certaines méduses, la Green Fluorescent Protein (GFP) a été clonée en 1992. Il est aisé de placer ce gène en 3' du gène d'une protéine pour obtenir une protéine chimère (protéine d'intérêt – GFP) fluorescente.

Placé dans une cellule ou un animal, on peut suivre ainsi le devenir de la protéine « étiquetée » depuis sa synthèse jusqu'à sa destination finale en microscopie en fluorescence.



Par modification, la GFP a donné naissance à toute une série de protéines fluorescentes : jaune (YFP), bleue (BFP), cyan (CFP), rouge (DsRed), etc...

8/ Méthode de Biologie Moléculaire : voir cours de Biologie Moléculaire

Largement prépondérantes, elles seront vues dans le cours spécifique (les applications GFPn'en sont qu'une infime partie)

III / DETERMINATION QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS CHIMIQUES DE LA CELLULE

A / ANALYSE CHIMIQUE QUANTITATIVE :

Techniques utilisées lorsqu'on veut mesurer la quantité d'une substance dans une cellule.

Sur une prise d'essai de N cellules, on procède après broyage et séparation, à des dosages de la substance recherchée : soit Q la quantité trouvée. La quantité par cellule de substance recherchée sera :

$$q = k (Q/N)$$

k : coefficient correcteur intégrant le % de cellules sécrétrices parmi les N, de la différence de sécrétion entre cellules sécrétrices, ...

B / HISTOPHOTOMETRIE :

Avec cette méthode, on peut directement doser une substance dans une cellule en quantifiant une coloration spécifique de cette substance. Il suffit de définir la couleur en la sélectionnant dans le spectre à l'aide d'un filtre et de mesurer la densité optique à la longueur d'onde sélectionnée (D_0/nm).

L'appareil utilisé, l'histophotomètre, est un microscope fonctionnant à la manière d'un spectrophotomètre.

Cette technique n'est pratiquement plus utilisée.

IV / DETERMINATION DU CHEMINEMENT D'UNE SUBSTANCE : AUTORADIOGRAPHIE et FRAP (Voir Fig. 2. 23)

1/ Autoradiographie

Le principe de la méthode est basé sur la propriété des substances radioactives d'impressionner les plaques photographiques dans l'obscurité.

Intérêts : suivant la nature du précurseur radioactif utilisé, on pourra marquer :

- des protéines, si le précurseur est un acide aminé
- des acides nucléiques (ADN ou ARN), si le précurseur est un nucléotide

N.B. : le métabolisme des glucides et les lipides (métabolisme énergétique) interdit leur marquage direct.

Inconvénients :

- le marquage n'est pas sélectif de la molécule à étudier (on marque toutes les protéines ou tous les acides nucléiques). Il faut donc se placer dans des conditions physiologiques particulières pour améliorer le marquage de la molécule à étudier
- utilisation de substances radioactives (règles de protection spécifiques)



Il suffit de fournir à un organisme ou à des cellules en culture un précurseur radioactif (= précurseur marqué ou "chaud") pendant un temps très court (**pulse**). Le pulse correspond à l'incorporation du précurseur « chaud » à la substance étudiée au cours de sa synthèse par les cellules.

Puis on administre le même précurseur, mais non marqué (ou "froid") pendant un temps variable ou **chasse (chase)**. On fixe immédiatement alors les cellules et on procède à la série d'opérations déjà étudiées plus haut : déshydratation, inclusion, et les coupes mises sur lames sont transportées à l'obscurité, dans une chambre noire. Là, elles sont recouvertes d'une fine émulsion photographique constituée d'une solution d'halogénures d'argent (BrAg en général) dans de la gélatine.

Les coupes sont conservées dans des boîtes étanches à la lumière le temps nécessaire à l'impression de l'émulsion photographique, ou temps d'exposition. Lorsque ce temps est estimé suffisant, on procède, toujours dans l'obscurité, au développement. Les lames recouvertes de leur émulsion sont traitées comme des plaques photographiques et soumises à des bains successifs de révélateur, fixateur, etc...

Après une très légère coloration de fond destinée à rendre les cellules visibles, les coupes sont examinées au microscope : des grains noirs d'argent se sont déposés aux endroits précis des lieux de synthèse de la substance étudiée.

En recommençant l'expérience plusieurs fois et en augmentant chaque fois la durée des "chasses" on peut savoir où se trouve la substance étudiée à des temps t_1 , t_2 , t_3 , etc... Les "traceurs" radioactifs ont permis ainsi de connaître la destinée des principales substances synthétisées par les cellules : lieu de synthèse (temps très court), cheminement et lieu de destruction.

Exemple : on veut savoir où est synthétisé l'ARN dans une cellule.

On utilise un précurseur de l'ARN et de lui seul, l'uridine "marquée" au tritium, l'uridine tritiée, $^3\text{H Ur}$. Après incorporation, les ARN radioactifs apparaissent dans le noyau, et en particulier dans le nucléole.

Remarque :

La méthode est transposable au microscope électronique. La technique est plus délicate car on dispose une émulsion très fine sur les grilles.

2/ FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching):

Application dérivée de l'utilisation des GFP.

Intérêts :

- marquage spécifique d'une protéine
- pas de manipulation de radioactivité

Inconvénient :

- applicable uniquement aux protéines

La fluorescence de la protéine chimère (GFP) est détruite par une illumination très forte d'un point focal (bleaching = éblouissement) ou de la cellule entière, suivant l'objectif souhaité. Le retour à la fluorescence en ce point se fait par la synthèse de nouvelles protéines fluorescentes.

On peut ainsi suivre le cheminement de la protéine dans la cellule et mesurer alors sa vitesse de déplacement.

V / AUTRES TECHNIQUES

A / LES CULTURES



Dans des milieux quelquefois très complexes qui permettent la survie et le développement des cellules, on peut étudier *in vitro* un grand nombre de phénomènes à l'échelle des cellules. Ce sont des techniques très délicates qui réclament des conditions strictes de composition de milieux, de température, de pH, etc..

Un grand nombre de découvertes ont pu être ainsi réalisées. Avant l'avènement de techniques applicables à l'animal, c'était la seule manière d'étudier la cellule vivante. Les cultures de cellules, de tissus et organotypiques tiennent une grande place dans l'expérimentation médicale. Toutefois certains résultats sont difficilement transposables *in vivo*.

B / LES MICRO MANIPULATIONS

Ce sont des techniques très employées en cytologie et embryologie expérimentales. Sous le microscope, à l'aide de micro-instruments guidés par une mécanique de haute précision (micromanipulateurs), on peut par exemple ôter le noyau d'une cellule pour le remplacer par un autre, ou intervenir dans le déroulement d'un phénomène cellulaire tel que la mitose.

C / MORPHOMETRIE

1°) Mesures de surface et de volume

Elles peuvent s'effectuer manuellement à l'aide de micromètres oculaires réticulés et en appliquant des formules simples. Toutefois, ces techniques sont longues, fastidieuses et non dénuées de sources d'erreurs.

Elles peuvent avantageusement être effectuées par des microscopes de nouvelle génération équipés de dispositifs de traitement d'images et de logiciels appropriés.

2°) Comptage

a) Manuel :

Longues et fastidieuses, les méthodes manuelles s'effectuent en diluants des suspensions cellulaires à une concentration donnée, et en plaçant des aliquotes de ces suspensions sur des lames spéciales, creusées d'un réservoir calibré comportant un réseau de carrés où les éléments peuvent être comptés. Une formule permet de rapporter le nombre de cellules comptées par carré à une concentration par millimètre cube.

b) Automates: 2 types

Plusieurs générations d'automates se sont succédées apportant chaque fois des gains de rapidité et de fiabilité par rapport aux méthodes manuelles.

« **Compte globule** » : système basé sur la mesure d'impédance (résistance)

On mesure la résistance engendrée par un petit orifice faisant communiquer 2 compartiments contenant une solution saline conductrice. Lorsqu'une cellule passe à travers cet orifice, elle modifie la résistance. L'intensité du courant est proportionnelle au rapport surface de la cellule / surface de l'orifice, donc à la taille de la cellule. L'enregistrement de ces variations de courant permet de compter les cellules et d'évaluer leur taille. **(Voir Fig. 2.24)**

Ce dispositif est utilisé pour réaliser les numérations sanguines.

Cytomètre de flux :

Les **cytomètres en flux**, sont les appareils les plus performants à l'heure actuelle. Leur principe de fonctionnement est le suivant : **(Voir Fig. 2. 25)**

- une suspension cellulaire est incubée avec différents fluorochromes qui marquent de façon spécifique chaque population cellulaire

- la suspension « marquée » est introduite dans le cytomètre où elle passe dans un tube capillaire où les cellules défilent l'une après l'autre mais très rapidement.



- ce flux est "éclairé" par des faisceaux laser de différentes longueurs d'onde et la lumière transmise, réfléchiée ou diffractée est analysée par de multiples capteurs qui la transforment en autant de signaux numérisés qui sont traités par un ordinateur. Les différentes populations cellulaires sont ainsi comptées et font l'objet de représentations graphiques au gré de l'utilisateur.

- ce flux est calculé pour n'enfermer qu'une cellule par goutte se détachant de l'extrémité du capillaire. La goutte se détachant passe au centre d'une bobine électromagnétique ou anneau de charge qui ajoute une charge électrique sur certaines en fonction du fluorochrome porté par la cellule.

- en passant dans un champs magnétique, les gouttes sont déviées en fonction de leur charge et se répartissent par populations, dans des récipients différents. C'est la fonction "trieur de cellules" de l'appareil. (voir le schéma)

- ces appareils sont capables d'effectuer aussi des réactions enzymatiques (peroxydases).

Les cytomètres de flux permettent donc de :

- 1 – **Dénombrer** différentes populations cellulaires (identifiées chacune par un fluorochrome)
- 2 – **Trier** des cellules
- 3 – **Quantifier** le nombre de marqueur exprimé par une cellule, en comparant l'intensité de fluorescence de chaque cellule avec celles obtenues avec des billes portant un nombre déterminé de fluorochromes (courbe de calibration).

D / HYBRIDATION IN SITU (HIS)

C'est une technique de biologie moléculaire basée sur la complémentarité des chaînes d'ADN ou entre molécule monocaténaire d'ADN et l'ARN.

Une sonde constituée d'une molécule monocaténaire d'ADN, ou d'ARN dont la séquence est connue, est marquée par un atome radioactif ou un fluorochrome. Introduite dans une cellule, cette sonde se lie à une séquence complémentaire d'ADN ou d'ARN (hybridation), qui est ainsi visualisée par des techniques microscopiques : autoradiographie ou fluorescence (FISH : Fluorescence In Situ Hybridation). On peut ainsi localiser un gène dans un chromosome ou un ARN messager dans le cytoplasme d'une cellule.

