

Chapitre II. Technique de microscopie

1. Introduction

Si on rencontre des biologistes cellulaires et qu'on leur demande ce qu'ils préfèrent dans leur travail, ils ont tous une chose en commun : ce sont des mordus de microscopie. Ce qu'ils préfèrent à la fin de la journée, c'est s'asseoir dans une petite pièce sombre pendant des heures en communiant avec leur type de cellule préféré à travers la lentille d'un microscope. Cela paraît bizarre, mais il faut reconnaître que les cellules peuvent être aussi belles que du vitrail vivant. Par exemple, la photo ci-dessous montre les cellules d'une très jeune feuille de cresson sauvage, une petite plante apparentée à la moutarde.

Image au microscope confocal d'une jeune feuille de cresson sauvage, traitée à l'aide d'un marqueur qui délimite le bord des cellules et d'autres marqueurs caractéristiques des jeunes cellules de la lignée stomatique (cellules qui donneront naissance aux stomates, valves cellulaires par lesquelles se font les échanges gazeux).

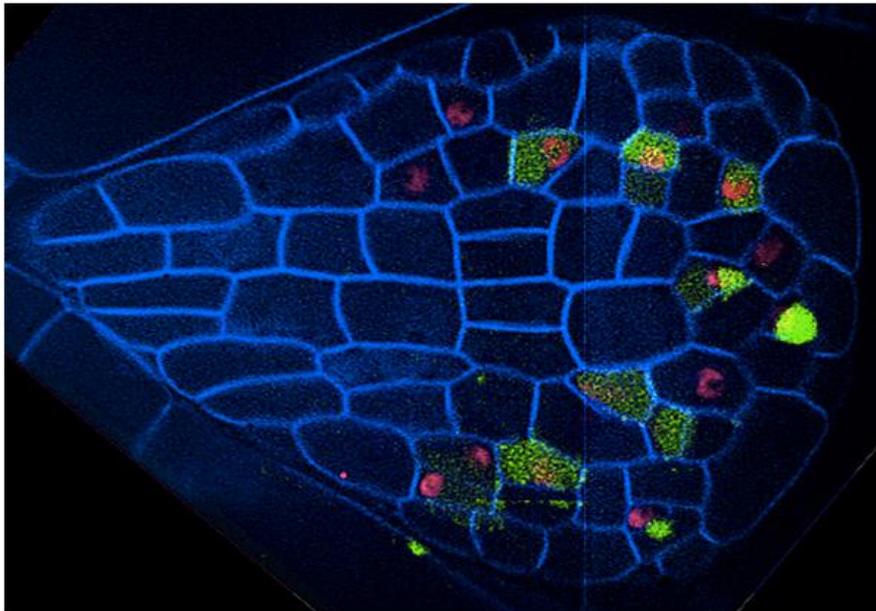


Image credit: Carrie Metzinger Northover, Bergmann Lab, Stanford University

Cette image n'a pas été photographiée en microscopie à lumière ordinaire ; il s'agit de lumière fluorescente, c'est-à-dire que la plante a subi un traitement. Plusieurs parties de ses cellules ont été marquées avec des réactifs luminescents. Qu'on puisse la voir ou non, cette complexité et cette beauté des cellules sont tout autour de nous.

On peut trouver des cellules aux motifs complexes et aussi joliment formés dans n'importe quelle plante en fait (depuis la rose du jardin, en passant par l'herbe des plates-bandes, jusqu'à la carotte du potager). Il ne faut pas non plus limiter cela aux plantes : on trouve des couches de cellules superbes dans la peau humaine,

dans les ailes des insectes et dans n'importe quel tissu vivant qu'on choisit d'examiner de près. L'homme et le monde qui l'entoure sont des cathédrales de cellules. C'est avec un microscope qu'on peut les apprécier.

2. Microscopes et lentilles

Bien que les cellules ont des tailles qui varient, elles sont généralement assez petites. Par exemple, le diamètre d'un globule rouge est d'environ huit micromètres (0,008 millimètre). Pour vous donner une idée, la tête d'une épingle est d'environ un millimètre de diamètre, alors on pourrait aligner environ 125 globules rouges sur la tête d'une épingle. À quelques exceptions près, les cellules individuelles ne peuvent pas être vues à l'œil nu. Les scientifiques doivent donc utiliser des microscopes (*micro-* = "petit"; *-scope* = « pour regarder ») pour les étudier. Un **microscope** est un instrument qui agrandit des objets trop petits pour être vus, produisant une image dans laquelle l'objet apparaît plus grand. La plupart des photographies de cellules sont prises à l'aide d'un microscope. On peut appeler ces photos des **micrographies**.

À partir de la définition ci-dessus, on pourrait croire qu'un microscope n'est qu'une loupe grossissante. En fait, on classe les loupes dans la catégorie des microscopes et puisqu'ils n'ont qu'une lentille, on les appelle des **microscopes simples**. Les instruments plus sophistiqués que nous considérons comme des microscopes sont des **microscopes composés**, ce qui veut dire qu'ils ont plusieurs lentilles. Selon la manière dont elles sont disposées, les lentilles permettent de tordre la lumière pour obtenir une image beaucoup plus grosse que celle d'une loupe.

Dans un microscope composé à deux lentilles, la disposition des lentilles a une conséquence intéressante : l'image qu'on voit est retournée par rapport à l'objet qu'on examine. Par exemple, si on regarde du papier journal avec la lettre "e" imprimée dessus, l'image que l'on verra à travers le microscope sera "ə." 11start superscript, 1, end superscript Des microscopes composés plus complexes ne présentent pas une image inversée, parce qu'ils ont une lentille additionnelle qui "re-inverse" l'image en la remettant dans sa position normale.

Qu'est-ce qui différencie un microscope élémentaire d'une machine puissante utilisée dans un laboratoire de recherche ? Deux paramètres sont essentiels en microscopie : le grossissement et la résolution.

- Le **grossissement** mesure combien un objet est agrandi dans un microscope (ou dans un ensemble de lentilles). Le microscope optique typiquement utilisé dans les écoles du secondaire ou à l'université, grossit

jusqu'à 400 fois la taille réelle. Ainsi un objet qui mesure 1 mm dans la vie réelle, mesurera 400 mm dans l'image produite par le microscope.

- La **résolution** d'un microscope ou d'une lentille est la plus petite distance à partir de laquelle deux points peuvent être séparés et distingués comme des objets différents. Plus cette valeur est petite, plus le **pouvoir de résolution** du microscope est grand, et meilleurs sont la clarté et le détail de l'image. Si deux bactéries sont très proches sur une lame de microscope, elles peuvent apparaître comme un unique point flou si le pouvoir de résolution du microscope est faible, mais elles pourront être observées séparément grâce à un microscope à haut pouvoir résolutif.

Le grossissement et le pouvoir de résolution d'un microscope sont tous les deux importants si on veut une image précise d'un objet très petit. Par exemple, si on a un microscope à fort grossissement, mais à résolution faible, on n'obtiendra que des agrandissements d'une image floue. Les différents types de microscopes varient selon leur pouvoir de résolution et leur grossissement.

3. Microscopes optiques

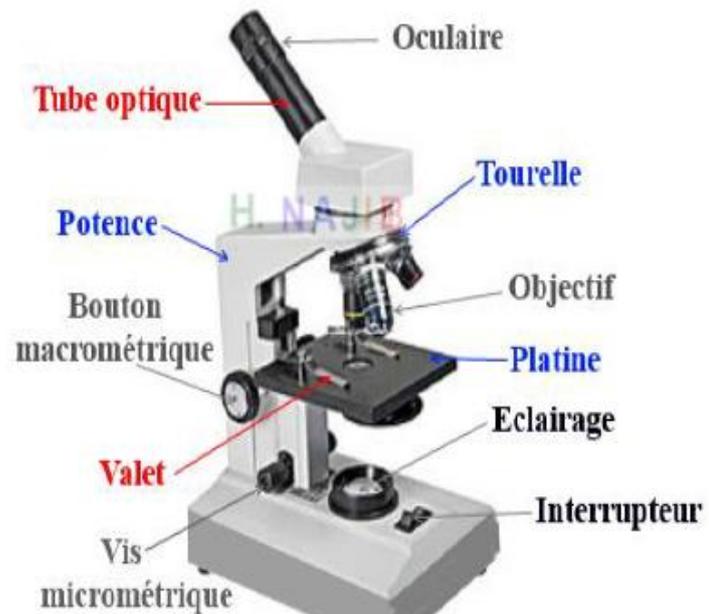
La plupart des microscopes utilisés par les étudiants sont des **microscopes optiques**. Dans un microscope optique, le rayon de lumière visible passe à travers l'échantillon (le matériel biologique qu'on observe) et est dévié à travers le système de lentilles, permettant à l'utilisateur de voir une image grossie. Un avantage de la microscopie optique est qu'elle est souvent pratiquée sur des cellules vivantes, donc on peut voir le comportement normal des cellules (i.e, migrer, se diviser) sous le microscope.

Un microscope optique tel que ceux qu'on trouve communément dans les collèges et les laboratoires universitaires de premier cycle de biologie.

Les microscopes utilisés par les élèves dans les laboratoires sont pour la plupart des microscopes à **fond clair** : la lumière visible traverse l'échantillon et forme habituellement une image directe, sans modifications. Alors que d'autres formes de microscopes optiques, légèrement plus sophistiquées, utilisent des astuces optiques pour améliorer le contraste et rendre les détails des cellules et des tissus plus faciles à voir.

La **microscopie à fluorescence** est un autre type de microscopie optique qui est utilisée pour visualiser des échantillons fluorescents (qui absorbent une longueur d'onde de lumière donnée et en émettent une autre).

La lumière d'une longueur d'onde donnée sert à exciter les molécules fluorescentes; et la lumière d'une longueur d'onde différente qu'elles émettent est collectée et forme une image. Dans la plupart des cas, la cellule ou le tissu qu'on veut observer n'est pas naturellement fluorescent, alors à la place on le colore avec des colorants ou des marqueurs fluorescents avant de le placer sous le microscope.



Crédit photo : OpenStax Biology. Modification du document par "GcG"/Wikimedia Commons.

La photo de feuille qu'on voit en début d'article a été prise avec un microscope à fluorescence particulier appelé **microscope confocal**. Le microscope confocal utilise un laser pour exciter une couche superficielle de l'échantillon et collecte uniquement la lumière provenant de la couche ciblée, cela donne une image précise sans interférence de fluorescence générée par les molécules des couches alentour 44 start super script, 4, end superscript.

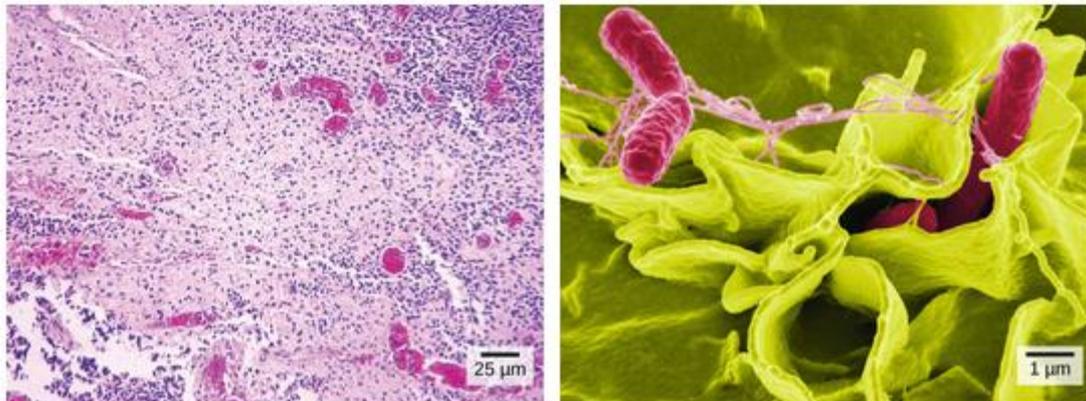
3. Microscopes électroniques

Certains microscopes optiques dits de pointe (au-delà des techniques évoquées ci-dessus) produisent des images de très haute résolution. Cependant si on veut observer quelque chose de très petit à une très haute résolution, on choisit d'utiliser une technique différente et éprouvée : la **microscopie électronique**.

Les microscopes électroniques diffèrent des microscopes optiques car ils produisent l'image d'un spécimen en utilisant un faisceau d'électrons et non pas un faisceau de lumière. Les électrons ont une longueur d'onde beaucoup plus courte que la lumière visible, ce qui permet aux microscopes électroniques de produire des images de résolution supérieure à celles des microscopes optiques classiques. La microscopie électronique est utilisée pour examiner non seulement des cellules entières; mais aussi des structures subcellulaires et leurs compartiments internes.

Il existe cependant une limite à la microscopie électronique : les échantillons doivent être placés sous vide (et généralement préparés via un procédé de fixation complexe). Donc on ne peut pas observer de cellules vivantes en microscopie électronique.

Deux images d'une bactérie *Salmonelle* prises avec un microscope optique et avec un microscope électronique à balayage. Dans la micrographie électronique à balayage, on voit beaucoup plus de détails de la bactérie.



Crédit photo : OpenStax Biology. Credit a: travail modifié par CDC/Armed Forces Institute of Pathology, Charles N. Farmer, Rocky Mountain Laboratories; credit b: travail modifié par NIAID, NIH; données d'échelle par Matt Russell.

Dans l'image ci-dessus, on compare l'aspect de la bactérie *salmonelle* prise en photo au microscope optique (à gauche) avec l'image de la même bactérie prise en photo au microscope électronique (à droite). Avec le microscope optique, on voit les bactéries sous forme de petits points violets, alors qu'avec le microscope électronique on peut apprécier clairement la forme et la texture de la surface des bactéries; ainsi que les détails des cellules humaines qu'elles essayent d'envahir.

Photo d'un microscope électronique : il est très grand et fait à peu près la taille d'un four industriel.



Crédit photo : OpenStax Biology. Modification du travail par Evan Bench.

Il existe deux grands types de microscopie électronique. Dans la **microscopie électronique à balayage (MEB)**, un faisceau d'électrons se déplace d'avant en arrière à la surface d'une cellule ou d'un tissu, créant ainsi une image 3D détaillée de sa surface. C'est ce type de microscopie qui a été utilisé pour prendre la photo de la bactérie *Salmonelle* ci-dessus à droite.

Dans la **microscopie électronique à transmission (MET)**, au contraire, l'échantillon est coupé en tranches extrêmement fines (par exemple grâce à la pointe d'un diamant) avant d'être observé, et le faisceau d'électrons passe à travers la tranche plutôt que de raser la surface. La MET est souvent utilisée pour obtenir des images des structures à l'intérieur des cellules.

Les microscopes électroniques, comme ci-dessus, sont significativement plus encombrants et plus chers que des microscopes optiques classiques, et ce n'est pas étonnant vu la taille des particules subatomiques qu'ils mettent en jeu !