

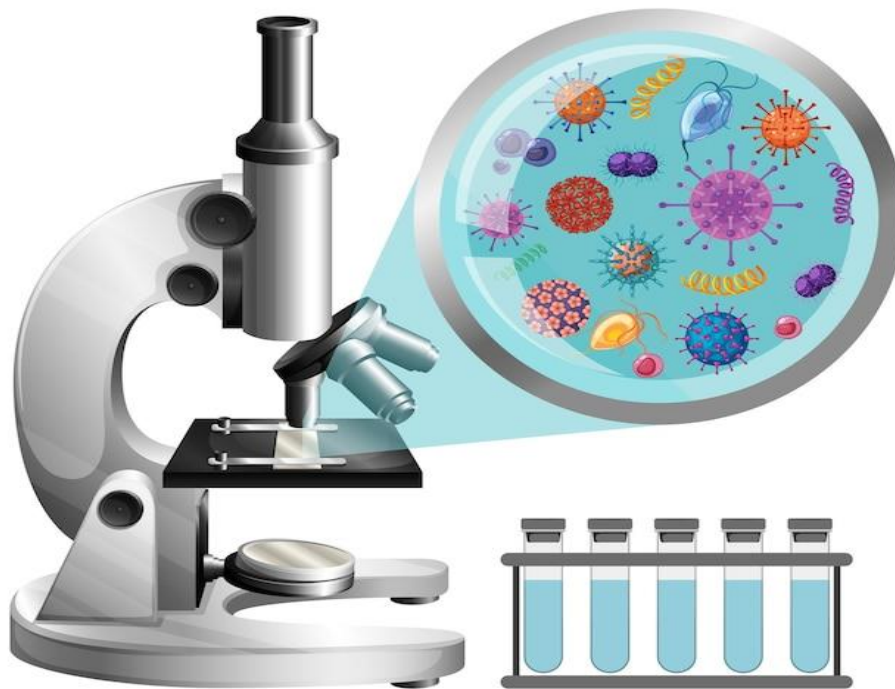
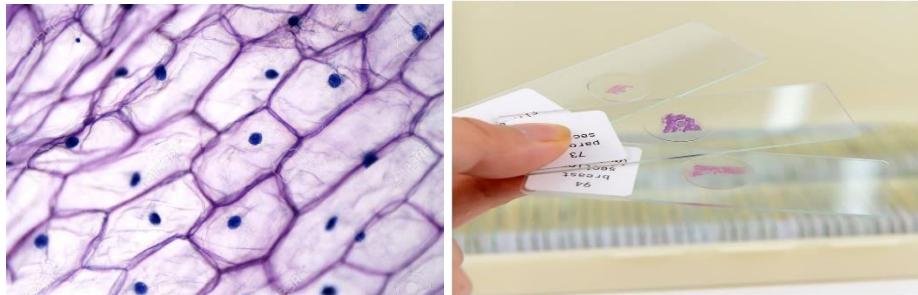
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire Abdelhafid BOUSSOUF –Mila-

Département de Biotechnologie Végétale

COURS DE MÉTHODOLOGIES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES D'ETUDE DU VIVANT (L2 BV)



I. Introduction

L'étude de la structure et du fonctionnement de la cellule a nécessité la mise au point d'outils et de techniques appropriés. Ce n'est qu'au XII siècle, avec l'intervention du microscope, que les cellules sont devenues visibles. Par la suite, pendant plusieurs années, toutes nos connaissances sur les cellules ont été découvertes grâce à cet instrument. La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques.

Première partie : Méthodes d'Etude de la Morphologie des Cellules

I. Méthodes cytologiques

Les cellules sont de très petite taille et d'organisation très complexe. Trois approches sont développées pour étudier les divers aspects de la cellule :

- * les techniques morphologiques.
- * les techniques chimiques et biochimiques.
- * les techniques physiologiques.

Ces techniques sont toutes basées sur l'emploi des microscopes **optiques** et **électroniques**.

1. LA MICROSCOPIE

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Le microscope (photonique ou électronique) permet d'observer sur une coupe très fine les détails infiniment petits d'un objet (animal, plante).

Le principe est dans tous les cas le même : **une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation**. Cette onde est captée par **un objectif** qui la concentre et passe par **un oculaire** qui crée **une image observable**. Cette image est soit observée **à l'œil nu**, soit **photographiée**, soit enregistrée par **caméra CCD** et stocké sur ordinateur pour traitement.

1.2. Les types de microscope

La microscopie est divisée en deux grands groupes :

- **le microscope optique**, aussi appelé photonique, parce qu'il utilise des **photons**.

- le **microscope électronique** qui utilise des **électrons** pour étudier l'objet.

LA MICROSCOPIE OPTIQUE (MO) OU PHOTONIQUE

➤ Définition

Le microscope optique est un instrument d'optique muni **d'un objectif** et **d'un oculaire** qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions et de séparer les détails de cette image afin qu'il soit observable par l'œil humain (Fig. 01).

Ce type des microscopes permettent l'observation de **cellules vivantes ou mortes**, grâce à des **coupes très fines** de **préparations fixées**. Les microscopes optiques utilisent de **la lumière visible** et la qualité de l'image dépend **du pouvoir séparateur** qui donne la résolution du microscope **limitée par la longueur d'onde** de la radiation lumineuse. On obtient donc un grossissement x1000.

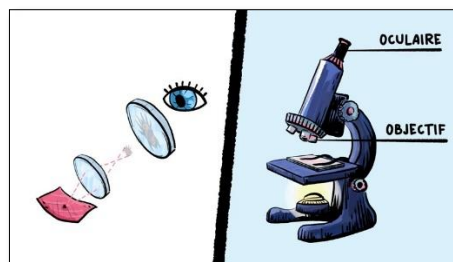


Figure 01. Principe de fonctionnement du Microscope Optique.

➤ Mode de fonctionnement :

Deux types d'observations sont réalisables en microscopie :

L'observation par **transmission** pour le **microscope optique** (MO) et pour le **microscope électronique à transmission** (MET) et l'observation par **réflexion** pour le **microscope électronique à balayage** (MEB). Donc le microscope travaille en :

- **Transmission** : l'échantillon **est traversé** par **des photons et électrons** ; les lentilles de verre (MO) ou les champs électromagnétiques (MET) permettent l'obtention d'une image qui est reprise par l'oculaire (MO) ou écran fluorescent (MET).

- **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 stéréo microscopes, au microscope à fond noir en microscopie optique et au microscope électronique à balayage (MEB) en microscopie électronique.

Remarque : Tous les microscopes sont caractérisés par leur **Pouvoir Séparateur (PS)** (**pouvoir de résolution** c'est à dire la distance limite appréciable entre 2 points et aussi limite de résolution). Un microscope photonique à transmission distingue des objets tout au plus distant de $0,2\mu\text{m}$.

➤ **Conditions d'observation en microscopie :**

Pour effectuer une observation en microscopie deux exigences s'imposent : **l'épaisseur** de l'échantillon et **le contraste**.

- **L'épaisseur de l'échantillon :** Pour une observation par transmission l'échantillon doit présenter une faible épaisseur **afin de permettre le passage du faisceau incident des photons ou d'électrons** d'où la nécessité de faire des coupes très très fines. Les coupes exigées en (MO) varient entre $2\mu\text{m}$ à $10\mu\text{m}$ et de $0,03\mu\text{m}$ à $0,05\mu\text{m}$.

- **Le contraste :** L'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de la coupe absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres (effet contraste). En règle générale, les constituants cellulaires présentent **des contrastes naturels faibles** d'où l'utilisation de certains artifices tels que les montages optiques qui **amplifient les contrastes naturels** comme le microscope à contraste de phase ou des colorants vitaux sélectifs (MO) ou encore des sels de métaux lourds comme les sels de plomb (ME).

➤ **Composants d'un Microscope Optique :**

Un microscope optique en général est composé **d'une base** (pied) qui assure la stabilité de l'appareil, **d'un tube optique** le long duquel existe un système de lentilles en verre et comportant à ses extrémités **un oculaire** permettant de recueillir l'image et **des objectifs** servant à agrandir un certain nombre de fois l'image de la préparation, **d'une platine** (porte objet) percée d'un trou et munie de **pincettes** (valet) pour immobiliser la lame et **d'une source lumineuse** éclairant la préparation. Les étapes de l'observation sont comme suite : préparation de l'échantillon, mise au point, changement de grossissement et observation. (Fig. 02)

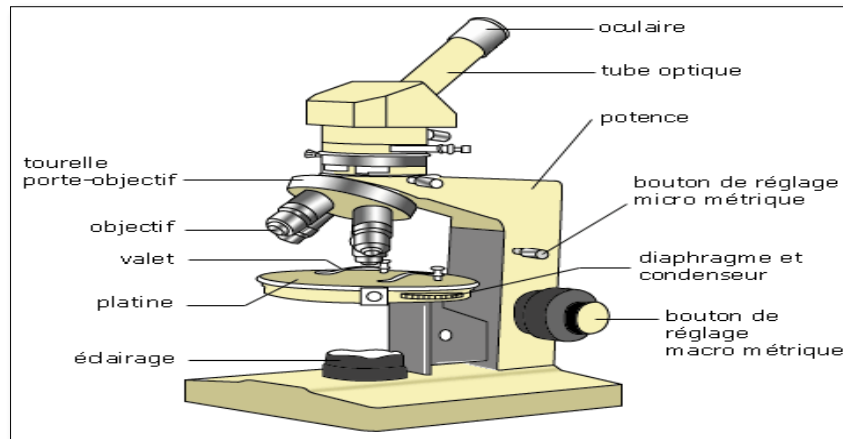


Figure 02. Les principaux composants du Microscope Optique monoculaire.

- **Types de microscopes optiques :** Le microscope optique est en outre classé en quatre catégories telles que :

- ❖ **Microscopes par transmission**

Le microscope le plus courant utilise la lumière visible qui est transmise directement sur la préparation biologique. Ces microscopes sont équipés de système de lentilles qui condensent la lumière sur la préparation à observer. Les **échantillons biologiques observés sont traversés par la lumière.**

- ❖ **Microscope à contraste de phase**

Ce type de microscope est largement utilisé pour l'observation **de cellules vivantes non fixées et sans coloration**. Son principe repose sur **l'amplification des contrastes naturels** en mettant à profit les différences **d'indices de réfraction** entre les organites ; qu'il transforme en différences d'intensités de lumières qui sont alors visibles à l'œil. Par exemple, le noyau d'une cellule apparaîtra sombre dans le cytoplasme environnant, le contraste est excellent. Les structures observées apparaissent **en relief**. (Fig.03).

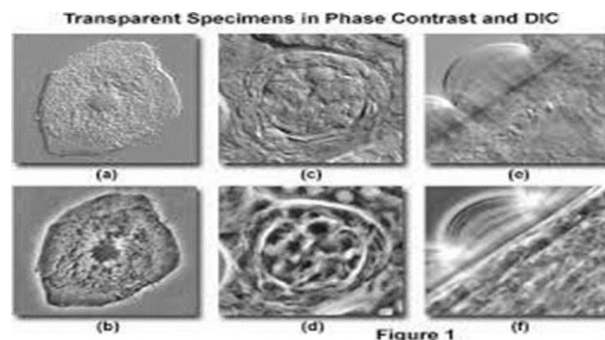


Figure 03. Exemples d'images obtenues à l'aide d'un microscope à contraste de phase.

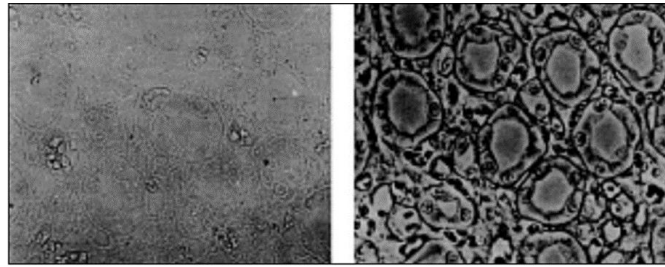


Figure. Différence entre une image obtenue par un MO à fond clair (à gauche) et par un microscope à contraste de phase (à droite).

❖ Microscope à fond noir

Il permet de révéler certains détails lors de l'observation des **cellules vivantes, et en déplacement non colorés** comme des bactéries ou des organismes unicellulaires en augmentant les contrastes naturels. Dans ce type de microscope, la source de lumière est **oblique** par rapport à la préparation cellulaire. Un condenseur spécial éclaire 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 (Fig. 04).



Figure 04. Image d'une puce d'eau observée au microscope à fond noir.

❖ Microscope à fluorescence (aux rayons UV)

Ce microscope est semblable au microscope photonique ordinaire, sauf qu'il est muni d'une **source de rayon UV** (lampe à UV) et d'un **système de filtre** qui permet de choisir la **longueur d'onde des UV appropriés pour chaque substance** (Fig. 05). Il porte deux filtres interposés entre l'échantillon coloré par des molécules fluorescentes, appelée : fluorochromes:

- ✓ Le premier filtre ne laisse passer que la lumière qui excite le fluorochrome.
- ✓ Le deuxième filtre ne laisse passer que la lumière émise par le fluorochrome (Fig.05).

Les fluorochromes absorbent une lumière spécifique, et émettent une lumière différente

(la Fluorescéine et la Rhodamine). Dans ce type de microscope les structures à étudier apparaissent très colorées sur un fond noir (Fig.06).

Il Permet de détecter :

- Les substances spontanément fluorescentes : vitamine A, chlorophylle....etc.
- Des structures qui fixent des colorants.

Intérêts :

-Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires.

-Détection, localisation, quantification de protéines cellulaires comme les hormones, les protéines du cytosquelette

- ✚ Le pouvoir séparateur de ce microscope est supérieur à celui du microscope photonique ordinaire (utilisant la lumière blanche) puisqu'il utilise, pour éclairer la préparation, les rayons UV caractérisés par une longueur d'onde plus faible (λ varie entre 200-400nm).
- ✚ Dans un microscope à fluorescence les lentilles sont en quartz (cf. le verre s'oppose au passage des UV). L'observation se fait sur un écran fluorescent où l'image obtenue peut être photographiée.

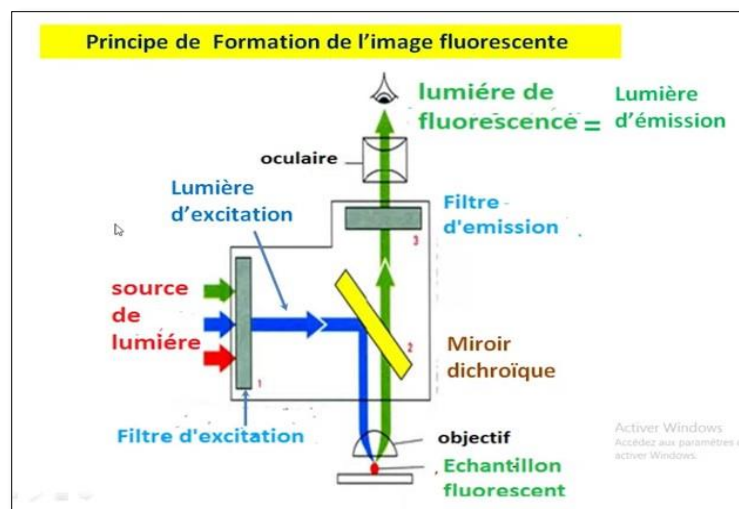


Figure 05. Principe de fonctionnement du microscope à fluorescence.

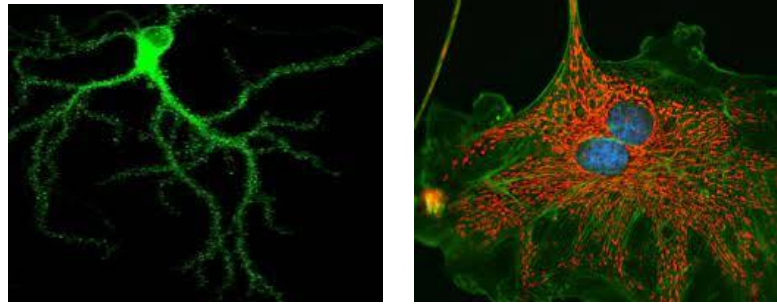


Figure 06. Image d'une cellule nerveuse (à gauche) et d'une cellule d'épithélium (à droite) en utilisant des fluochromes artificiels.

❖ Microscope confocal à balayage laser

C'est un microscope qui permet de réaliser des images de très faible profondeur de champ. En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon. On réalise une série d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle. L'objet **n'est pas directement observé par l'utilisateur, mais recomposé par un ordinateur.**

La plupart du temps, on utilise **un laser** comme source de lumière. Un rayon laser focalisé touche un point de l'échantillon (Fig. 07). Un ordinateur compile les images générées par chaque point afin de reconstruire **une image tridimensionnelle.**

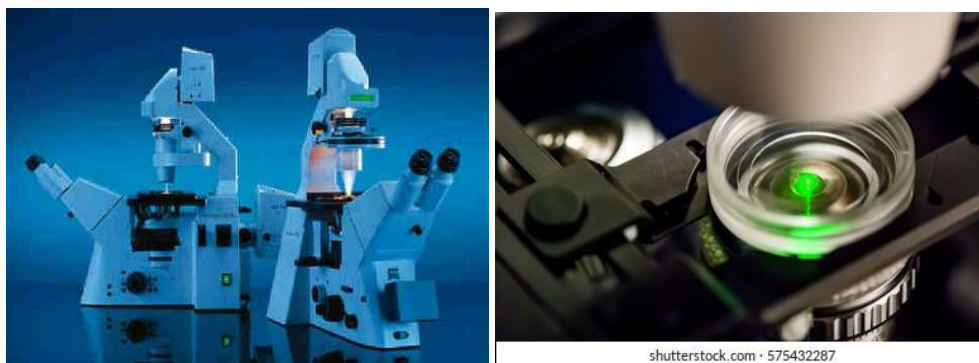


Figure 07. Exemple d'un microscope confocale (par laser).

🌈 LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (ME)

Le microscope électronique constitue un changement de paradigme dans le domaine de la microscopie, s'écartant des microscopes optiques traditionnels en utilisant des **faisceaux d'électrons** accélérés comme milieu d'éclairage, plutôt que des rayons lumineux conventionnels. La **longueur d'onde** d'un électron **diminue** quand la **vitesse** de déplacement de l'électron **augmente.**

- La source des électrons est un filament (métal) chauffé = cathode.
- Le flux de ces électrons est dévié par des champs magnétiques (l'aimant) qui le focalisent vers la préparation.
- L'image est perceptible grâce à **un écran fluorescent**.

Un faisceau d'électrons est utilisé pour produire une image. L'objet est bombardé par un **faisceau d'électrons**. Le microscope électronique utilise des **lentilles électrostatiques** et des **lentilles magnétiques** pour former l'image (Figure 08).

Le ME révèle l'**ultrastructure** des cellules eucaryotes et permet une observation plus poussée de la structure procaryote. La longueur d'onde d'un faisceau d'électrons est plus courte que celle de la lumière résultant en une meilleure résolution, allant jusqu'à **2 millions** de fois. Avec ces microscopes on ne peut examiner que des cellules tuées, mais le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques Å°. On aura donc accès à l'ultra structure des organites.



Figure 08. Photo d'un ME.

1. Types de microscope électronique

Il existe deux types de microscope électronique :

➤ La Microscopie Electronique à Transmission (MET)

Elle utilise comme rayonnement des électrons. L'observation est sous **ultravide**. Les échantillons sont sous forme **de lames extrêmement fines** (50 nanomètres). L'image obtenue peut être vue **sur un écran fluorescent**. **L'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre**. Les régions les plus épaisses de l'échantillon diffracteront plus d'électrons et apparaîtront plus sombres. Il possède un pouvoir séparateur **40 000 fois** supérieur à celui du microscope optique (Fig. 09) et **deux millions** de fois plus que l'œil humain, et qui est théoriquement de 0.2nm.

Dans son principe, elle ressemble à la MO : les électrons sont diffractés lorsqu'ils **traversent** l'échantillon. Le faisceau d'électrons est focalisé par des lentilles magnétiques pour former une image visible agrandie de l'échantillon sur un écran fluorescent (Fig.09). Les **régions denses** de l'échantillon se distinguent donc par des zones de **flux électronique réduit** c'est à dire **zones + ou - sombres** sur l'image.

Les é qui traversent l'échantillon sont, eux, focalisés pour former une image, soit sur un écran fluorescent, soit sur une plaque photo.

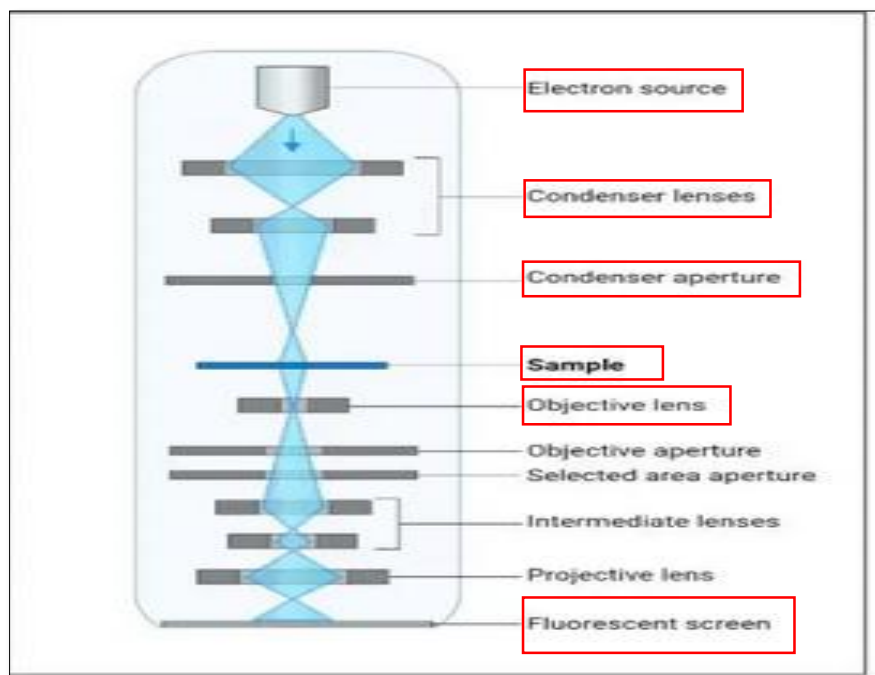


Figure 09. Principe de fonctionnement du MET.

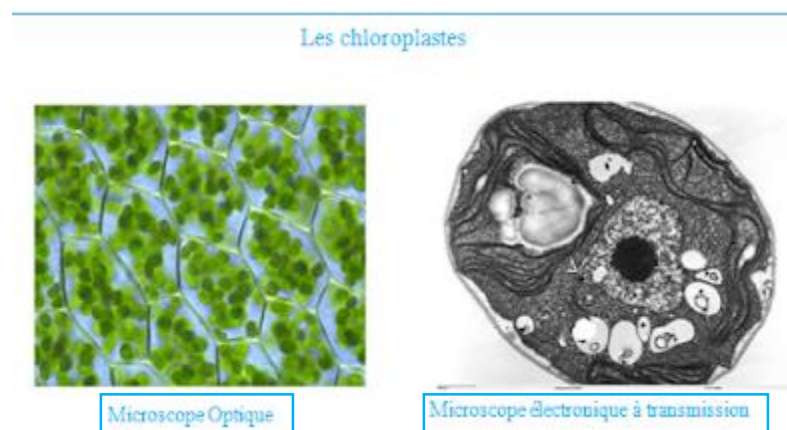


Figure 10. Différence de résolution entre une photographie (à gauche) et une micrographie (à droite).

➤ La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage consiste à **balayer** un échantillon par un faisceau **d'électrons**, la surface est préalablement recouverte d'un film de platine obtenu par ombrage métallique. L'ombrage métallique de l'échantillon à étudier consiste à vaporiser sous vide une très fine couche de métal lourd, qui recouvre l'échantillon d'une fine pellicule. L'ombrage métallique permet d'accentuer les reliefs. Le microscope électronique à balayage donne des **images tridimensionnelles** de l'échantillon, et permet d'étudier **les surfaces cellulaires**, les organites et même à l'intérieur des membranes (Les surfaces internes et externes).

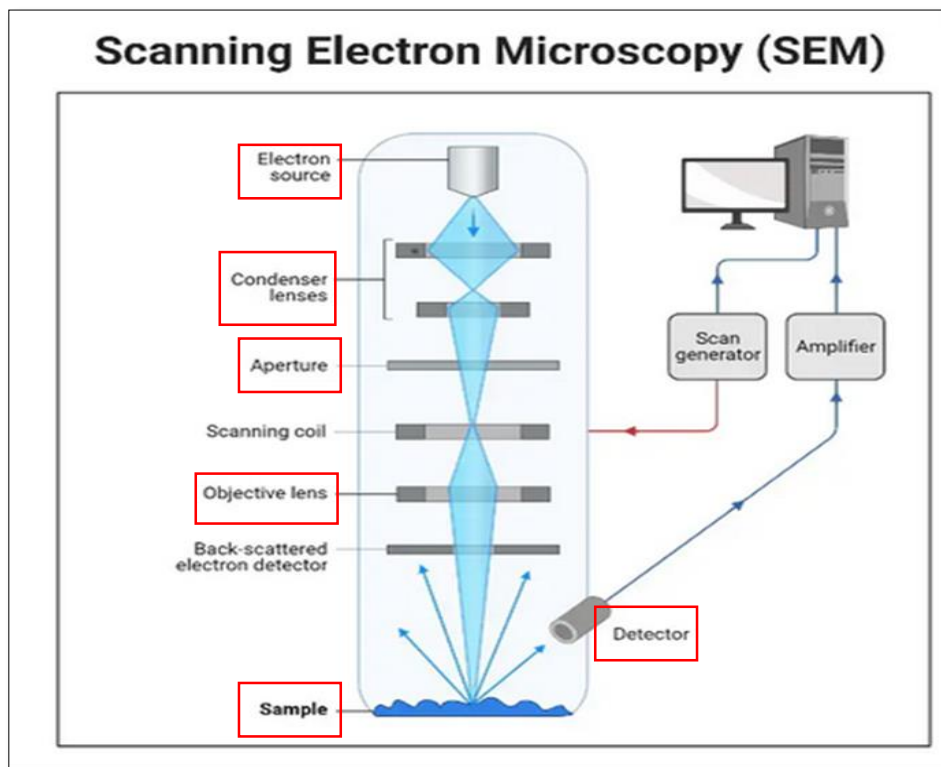
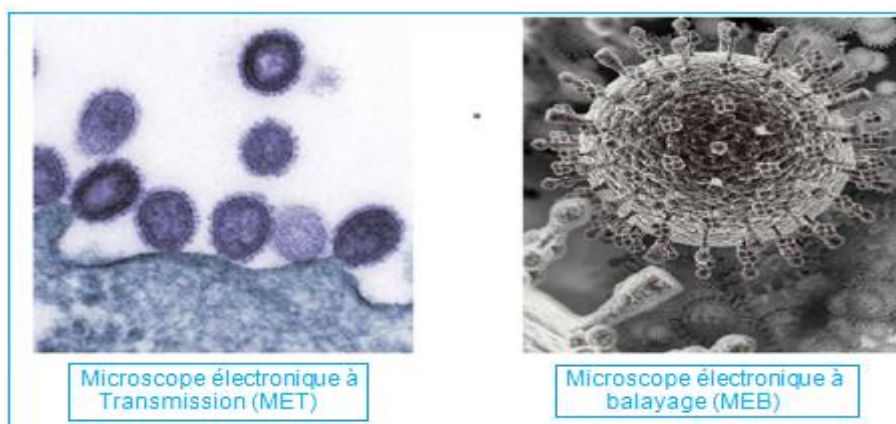


Figure 11. Principe de fonctionnement du MEB.



Références bibliographiques

1. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillat. 9ème édition, Masson 2002.
2. Biologie Cellulaire. Abrégés. Marc Maillat. 10ème édition, Masson 2006.
3. Biologie cellulaire. Des molécules aux organismes, 2ème édition. J c Callen. DUNOD. 2005.
4. Cours de Biologie Cellulaire : Pierre Cau, Raymond Seite. Edition ellipses. 1999.
5. Cytologie & Physiologie cellulaire. M. Abdelali, H. Benzine-Challam, A. Madoui Dekar. Office des Publications Universitaires 2008.
6. La cellule et sa physiologie : M Bendjelloul. Office des Publications Universitaires 2011.
7. La cellule. Geoffrey M Cooper. Edition De Boeck. 1999.