

Fiche 1 : Les méthodes d'observation

Du fait de leurs petites tailles (10 à 100 μm), l'observation des cellules nécessite l'utilisation des microscopes.

- **Les microscopes optiques** (photoniques) permettent l'observation des cellules mortes ou vivantes. Le microscope le plus courant utilise la lumière visible. Il existe plusieurs types de microscopes optiques dont les plus utilisés sont regroupés dans le tableau 1/1 qui suit.

Les types	Utilisés pour :
Optique à fond clair	L'observation des structures cellulaires internes après coloration.
Optique à fond noir	L'observation d'échantillons non colorés et des cellules vivantes et en déplacement.
Optique à fluorescence	Le marquage fluorescent de structures et de composés macromoléculaires.
Optique à contraste de phase	La mise en évidence des différences d'indices de réfraction et de contraste.
Optique confocal	La reconstitution d'images tridimensionnelles de l'objet.

Tableau1/1 : Les différents types de microscopes optiques et leur utilisation.

- **Les microscopes électroniques** utilisent des faisceaux d'électrons qui se déplacent selon une onde (comme la lumière). Lorsque le flux d'électrons est accéléré, la longueur d'onde diminue et la résolution augmente. Il existe deux types de microscope électronique regroupés dans le tableau 1/2 qui suit.

Les types	Utilisation permet :
Le microscope électronique par transmission (MET)	La transmission de l'image par des faisceaux d'électrons.
Le microscope électronique à balayage (MEB)	La formation de l'image de l'ultra-structure cellulaire en relief.

Tableau1/2 : Les différents types de microscopes électroniques et leur utilisation.

Le tableau 1/3 suivant résume **les principales différences** entre les microscopes optiques et électroniques.

Les microscopes optiques	Les microscopes électroniques
Faisceau lumineux	Faisceau d'électrons
Lentilles en verre	Lentilles électrostatiques et magnétiques
Grossissement x 2 000 fois	Grossissement x 2 000 000 fois
Résolution limite	Résolution bonne
Technique simple	Technique complexe

Tableau1/3 : Les principales différences entre les microscopes optiques et électroniques

i Les microscopes à sondes locales.

Il en existe quatre types: les microscopes à **effet tunnel**, les microscopes à force atomique, les microscopes à **conductance ionique** et les microscopes à **champ proche photonique**. Le principe est d'explorer la surface de l'objet étudié à l'aide d'une sonde (pointe) placée à proximité immédiate. L'intensité des différentes interactions qui apparaissent entre la sonde et la surface de l'objet est mesurée ce qui permet d'obtenir une cartographie de la surface de l'objet.

Fiche 2. Les conditions d'observation au microscope optique

Deux principales contraintes se posent à l'observation d'un échantillon au microscope optique :

- **l'épaisseur de l'échantillon** : en microscopie optique à transmission il est nécessaire de disposer d'échantillons de faible épaisseur afin que les rayons lumineux puissent traverser l'échantillon car ce sont eux qui permettent la formation de l'image. Si cela ne pose pas de problème avec des cellules isolées, étalées à la surface d'une lame de verre, l'utilisation d'un microtome permettant de réaliser des coupes entre 2 et 20 μm est indispensable lorsqu'il s'agit d'un tissu à étudier. La plupart des tissus animaux sont mous et leur consistance ne permet pas de les trancher aisément pour obtenir des coupes fines. Il faut donc préalablement les durcir de façon artificielle afin de pouvoir les couper au microtome. Pour cela on utilise la méthode de l'inclusion qui consiste à remplacer l'eau (environ 70% de la cellule) par un liquide qui peut être durci dans certaines conditions. Par exemple, la paraffine qui est solide à température ambiante et dont le point de fusion est bas (entre 45°C et 70°C).

Cette méthode altère l'organisation cellulaire. Pour cette raison, elle doit être précédée d'une étape dite de fixation qui permet de consolider les structures par des fixateurs chimiques ou physiques (congélation).

- **le contraste de l'échantillon** : les constituants cellulaires ont très peu de contraste les uns par rapport aux autres. Afin de pouvoir observer la structure des cellules une étape de coloration permettant l'augmentation du contraste est donc nécessaire. Des colorations spécifiques de constituants chimiques des organites cellulaires permettront la reconnaissance visuelle de ceux-ci (appréciation de taille, de forme...).

Ces deux contraintes identifiées, la préparation des coupes histologiques se fait en plusieurs étapes avant l'observation au microscope optique.

1/ La fixation est l'étape qui permet de maintenir le tissu dans un état proche de l'état natif. L'objectif est d'éviter les conséquences dues à la privation d'oxygène ainsi que la dégradation du tissu par les enzymes libérées après la mort cellulaire et sa putréfaction.

2/ Le rinçage est l'étape qui permet d'éliminer l'excédent de fixateur.

3/ La déshydratation est l'étape qui prépare le tissu à l'étape suivante de l'inclusion. Elle se réalise par immersion de l'échantillon dans des bains d'alcool de degrés croissants qui permet de remplacer l'eau par des solvants type xylène ou toluène.

4/ L'inclusion est l'étape qui permet la solidification du tissu dans la résine ou la paraffine.

5/ La microtomisation est l'étape qui permet de découper l'échantillon durci en tranches très fines (souvent 4-5 μm).

6/ La réhydratation est l'étape inverse de la déshydratation, elle permet de préparer l'échantillon à l'étape de la coloration car les colorants sont solubles dans l'eau. Cette étape se fait donc en passant les coupes dans un bain de solvant (xylène ou toluène) puis dans des bains d'alcool de degrés décroissants pour finir dans un bain d'eau.

7/ La coloration est l'étape qui permet de contraster les constituants cellulaires par immersion successive de l'échantillon dans différents colorants.

8/ La déshydratation et le montage. Le montage est l'étape qui permet de conserver la coupe colorée, il se fait avec des résines naturelles non miscibles à l'eau ce qui nécessite cette pré-étape de déshydratation (identique à l'étape numéro 3).

9/ L'observation.

Fiche 3. Les conditions d'observation au microscope électronique

Trois principales contraintes se posent avant l'observation d'un échantillon au microscope électronique :

- Les électrons se déplacent à l'intérieur d'une enceinte où règne un vide poussé (de l'ordre de 10^5 mm de mercure). Sous cette pression, seules les substances non volatiles peuvent être observées. Les cellules sont riches en eau (un composé volatil), une étape de déshydratation est donc nécessaire. Comme pour la microscopie optique la déshydratation est nécessairement précédée d'une étape de fixation pour ne pas endommager l'échantillon.

- Les échantillons sont soumis à un bombardement d'électrons ce qui induit une augmentation de la température. Il faut donc que l'échantillon supporte de fortes températures sous vide.

- Le pouvoir de pénétration des électrons est très faible, par conséquent l'échantillon doit être ultrafin, pas plus de $0,1 \mu\text{m}$.

L'observation par microscope électronique à transmission nécessite l'augmentation du contraste des objets observés grâce à l'utilisation d'éléments de numéro atomique élevé qui diffusent fortement les électrons.

Ces trois contraintes identifiées, la préparation des coupes histologiques se fait en plusieurs étapes avant l'observation au microscope électronique.

1/ La fixation est l'étape qui permet de maintenir le tissu dans un état proche de l'état natif. L'objectif est d'éviter les conséquences dues à la privation d'oxygène ainsi que la dégradation du tissu par les enzymes libérées après la mort cellulaire et sa putréfaction.

2/ La post-fixation consiste à utiliser des fixateurs (par exemple le tétr oxyde d'osmium et aldéhydes).

3/ La déshydratation est l'étape qui prépare le tissu à l'étape suivante de l'inclusion.

4/ L'inclusion est l'étape qui permet d'avoir des coupes plus minces qu'avec la paraffine. Elle se fait dans des matières plastiques qui deviennent très dures lorsqu'elles polymérisent. Les matières les plus utilisées sont les résines d'époxy (telles que l'épon ou l'araldite).

5/ L'ultramicrotomisation est l'étape qui permet de découper l'échantillon durci en tranches ultra-fines (environ 50 nm , les coupes ne peuvent dépasser les $0,1 \mu\text{m}$).

6/ L'augmentation de contraste (communément appelé **la coloration**) est l'étape qui permet de contraster les constituants cellulaires par l'utilisation d'éléments tels que l'acétate d'uranyle ou le citrate de plomb. Lorsque les cellules sont fixées au tétraoxyde d'osmium, ce fixateur agit aussi comme « colorant » mais souvent le contraste est renforcé pendant cette étape.

7/ L'observation.

Fiche 4. La culture cellulaire, quelques définitions

La culture cellulaire est généralement utilisée afin d'obtenir un grand nombre de cellules pour les études biochimiques et moléculaires.

- **Culture primaire** (ou primoculture) : culture de cellules issues de tissus ou d'organes prélevés directement sur un organisme vivant.
- **Repiquage, passage ou subculture** : transfert de cellules d'un flacon de culture à un autre flacon accompagné d'une dilution de la suspension cellulaire. Il est effectué à chaque fois que la densité des cellules atteint 65% de confluence (cellules en contact). Cette étape est indispensable pour que les cellules continuent à proliférer, elle consiste à mettre moins de cellules dans un nouveau milieu de culture.
- **Lignée cellulaire** : lignée constituée de cellules de même type issue d'une culture primaire, constituée au moment du premier repiquage. Il existe deux types de lignées cellulaires : les lignées finies et les lignées continues.
- **Les lignées finies** : lignées à durée de vie limitée entre 30 et 50 repiquages.
- **Les lignées continues** : lignées immortelles pouvant être cultivées indéfiniment. Il s'agit de lignées de cellules cancéreuses établies originellement à partir de la biopsie d'un organe atteint ou de cellules physiologiquement normales à l'origine mais qui ont été transformées artificiellement par l'introduction d'un plasmide immortalisant.

Fiche 5. La culture cellulaire : les conditions

Les conditions de la culture cellulaire doivent respecter des exigences minimales liées à la physiologie cellulaire.

Le milieu de culture doit contenir les éléments indispensables au métabolisme cellulaire :

- De l'eau.
- De l'oxygène associé à un faible pourcentage de CO₂ (5%).
- Des ions minéraux (nécessaires pour avoir la même osmolarité que celle du sérum physiologique).
- Une source de carbone et d'énergie (glucose).
- Une source d'azote (acides aminés) et d'acides gras.
- Un pH constant à 7,4 (suivi par un indicateur de pH le rouge phénol et un système de tampon CO₂/ HCO₃⁻ ou phosphate).
- Du sérum de vœu fœtal (entre 1,5 et 10%) apportant les facteurs de croissance et les facteurs de différenciation nécessaire.
- Enfin, un mélange d'antibiotiques afin d'éviter les contaminations bactériennes de l'environnement.

L'environnement doit respecter les paramètres physicochimiques nécessaires :

- La température : 37°C.
- L'hygrométrie : 84 à 85% d'humidité.
- La stérilité : du matériel, de l'environnement et du milieu de culture.