



Méthodes d'études de la cellule

**Aurore Perrin, MCU-PH**

([aurore.perrin@chu-brest.fr](mailto:aurore.perrin@chu-brest.fr))

Service de Génétique Médicale et Biologie de la Reproduction  
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, UBO, Brest

# I- Introduction

Cellule : unité trop petite pour être observée par l'œil humain

Besoin d'outils pour grossir les éléments d'une cellule

Gamme importante de microscopes

Microscopes à lumière ou microscopes photoniques

-> divers types de microscopes à lumière :

- microscopes par transmission : observation directe des structures dont les dimensions vont jusqu'à environ  $0,2 \mu\text{m}$

- microscope à lumière polarisée, microscope à fond noir et microscope à contraste de phase : donnent des informations indirectes sur l'ultrastructure des cellules

- le microscope confocal à balayage

Utilise la lumière visible (390 à 760 nm)

< 390 nm : *Ultraviolet*

> 760 nm : *Infrarouge*

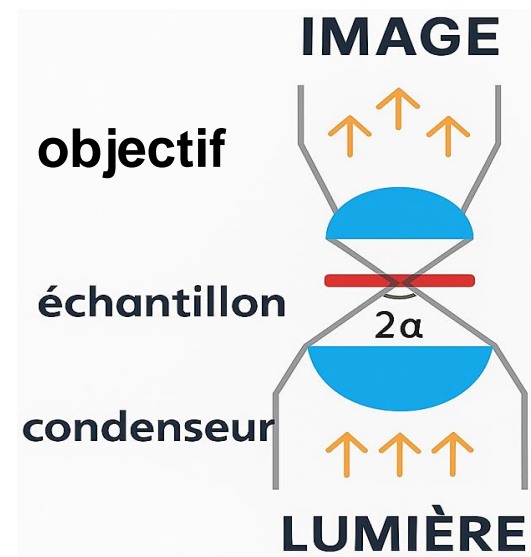
résolution (=pouvoir de résolution) microscope photonique :

$$R = 0,61 \left( \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} \right)$$

$\lambda$  = longueur d'onde

$n$  = plus petit indice de réfraction du trajet optique

$\alpha$  = demi-angle d'ouverture de la lentille



œil humain : env 75  $\mu\text{m}$  (pour des objets observés à une distance de 25 cm)  
-> Varie selon contraste objet, conditions éclairément, âge observateur...



## Ne pas confondre "limite de résolution" et "résolution"

Résolution (= pouvoir de résolution) : distance la plus petite entre 2 objets pour qu'ils puissent être distingués

Limite de résolution : distance la plus petite entre 2 objets pour qu'ils puissent être distingués dans les meilleures conditions d'observation possibles

Plus la longueur d'onde est courte, plus la limite de résolution est faible donc meilleure est la résolution

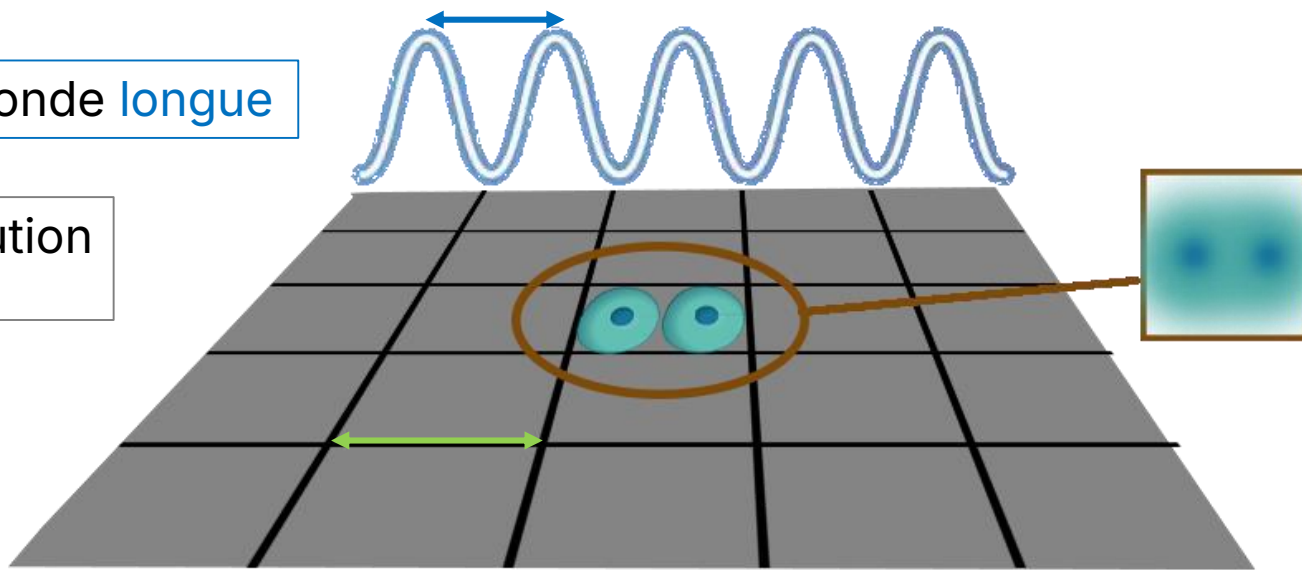
Plus la limite de résolution tend vers l'infiniment petit = plus la distance minimale pour distinguer 2 objets est faible, meilleure est la résolution

Microscope électronique : résolution meilleure que celle d'un microscope photonique (longueur d'onde d'un électron plus courte que celle d'un photon)

Longueur d'onde **longue**

Faible résolution  
(25 cases)

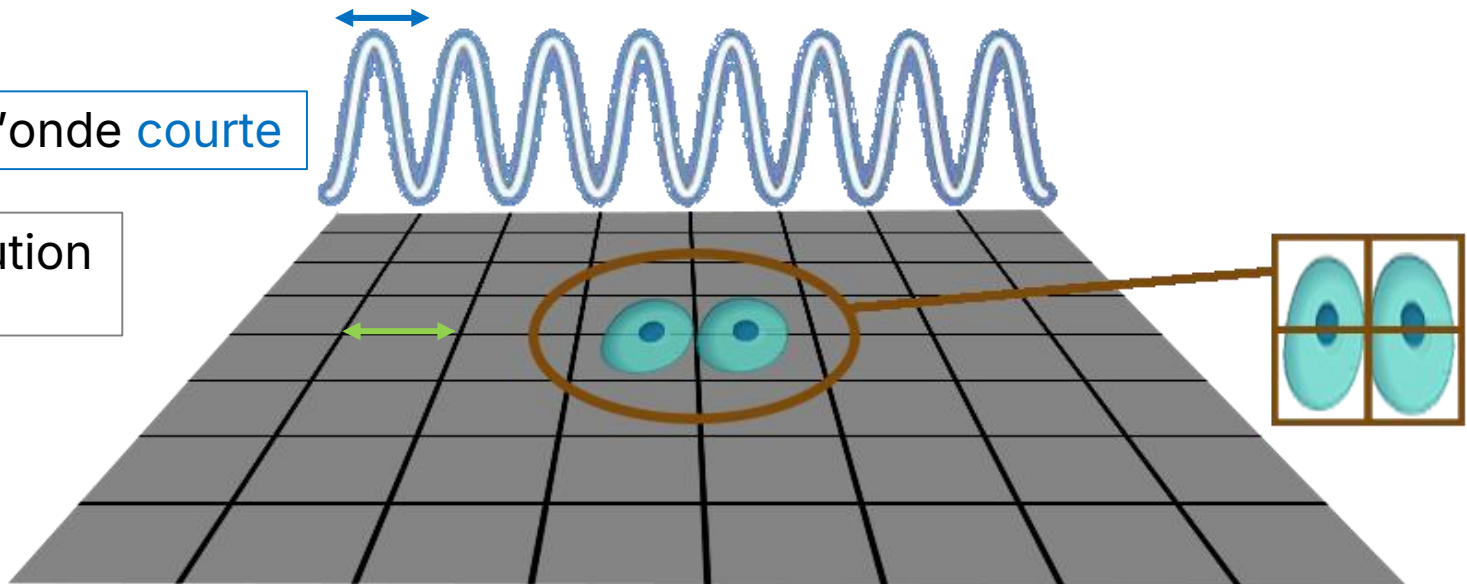
Limite de  
résolution



Longueur d'onde **courte**

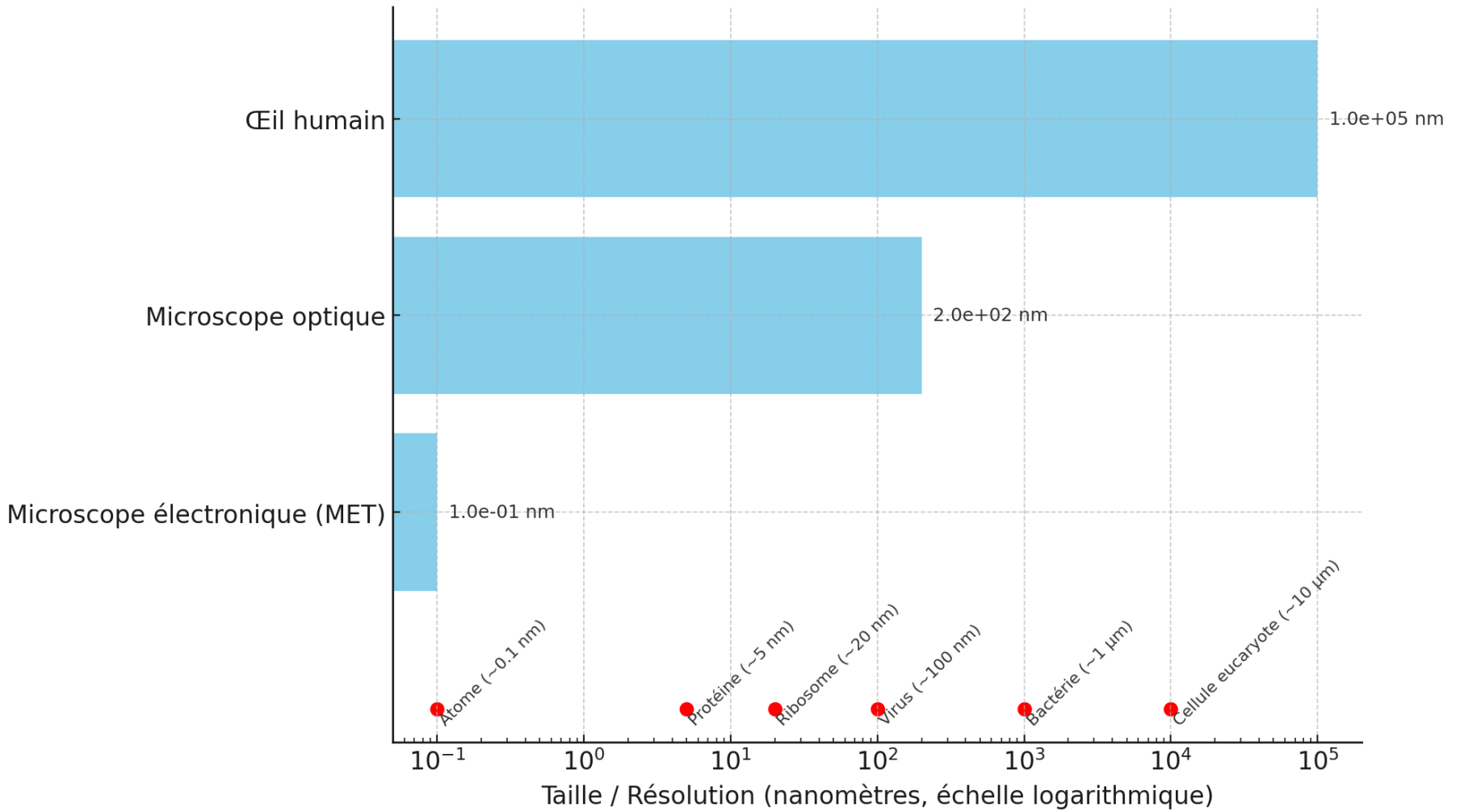
Forte résolution  
(64 cases)

Limite de  
résolution



Plus de cases = plus d'informations spatiales = meilleure capacité à discriminer des structures proches

# Résolution de différents systèmes d'observation et tailles d'objets biologiques



# II- Matériels d'observation

## A- Loupe binoculaire

Observation | en lumière réfléchie (objets opaques)  
| en transparence

Limite de résolution : env 2  $\mu\text{m}$

Grossissement utile : env 200x



Complexe cumulus-oophorus ~ 1 mm – Diamètre ovocyte ~0,1 mm

# B- Microscope photonique classique (microscope droit)

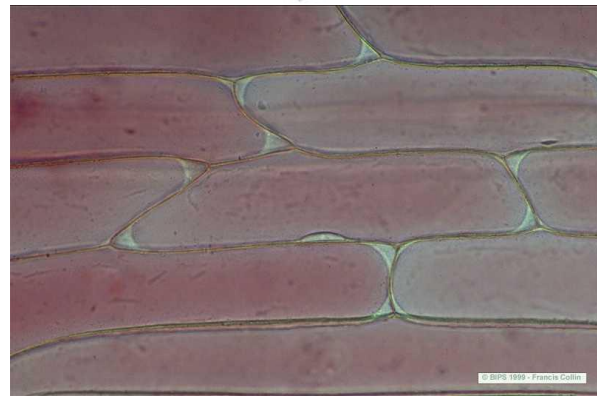
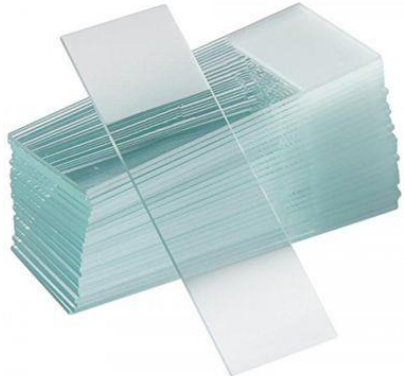
Limite de résolution : env jusqu'à 0,2  $\mu\text{m}$

-> Cellules, noyaux, bactéries visibles ; ribosomes, virus, protéines ... non visibles

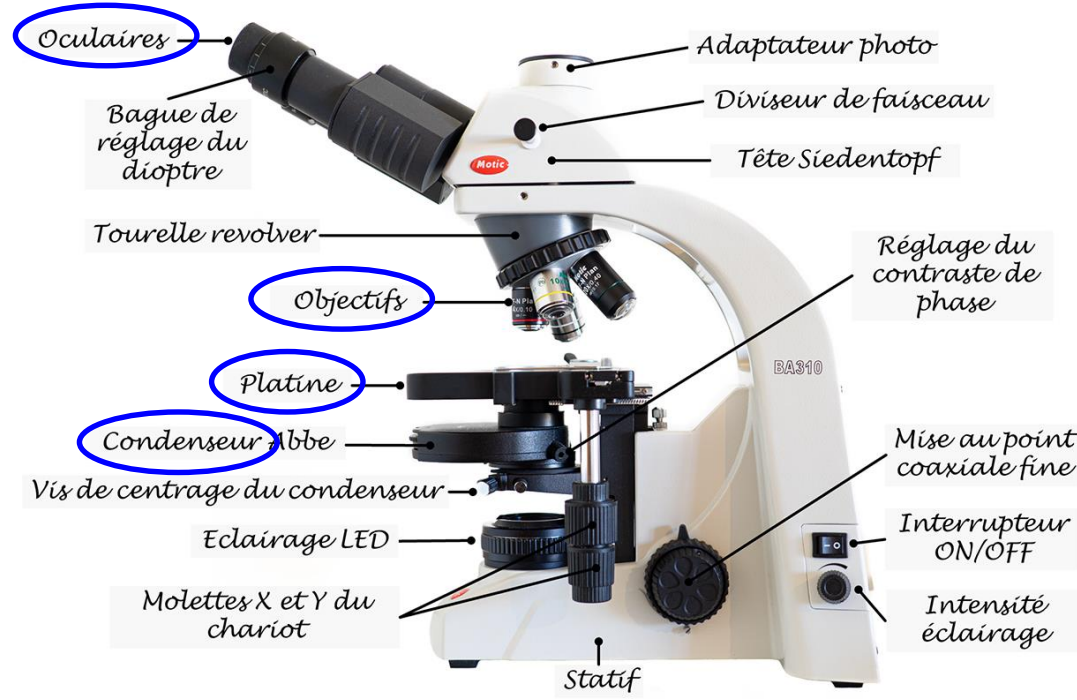
Observation en transparence

Faible épaisseur (< 10  $\mu\text{m}$ )

Grossissement utile : env 40 à 1250 x (objectif : 4 à 100 x, oculaire : 10 à 12,5)



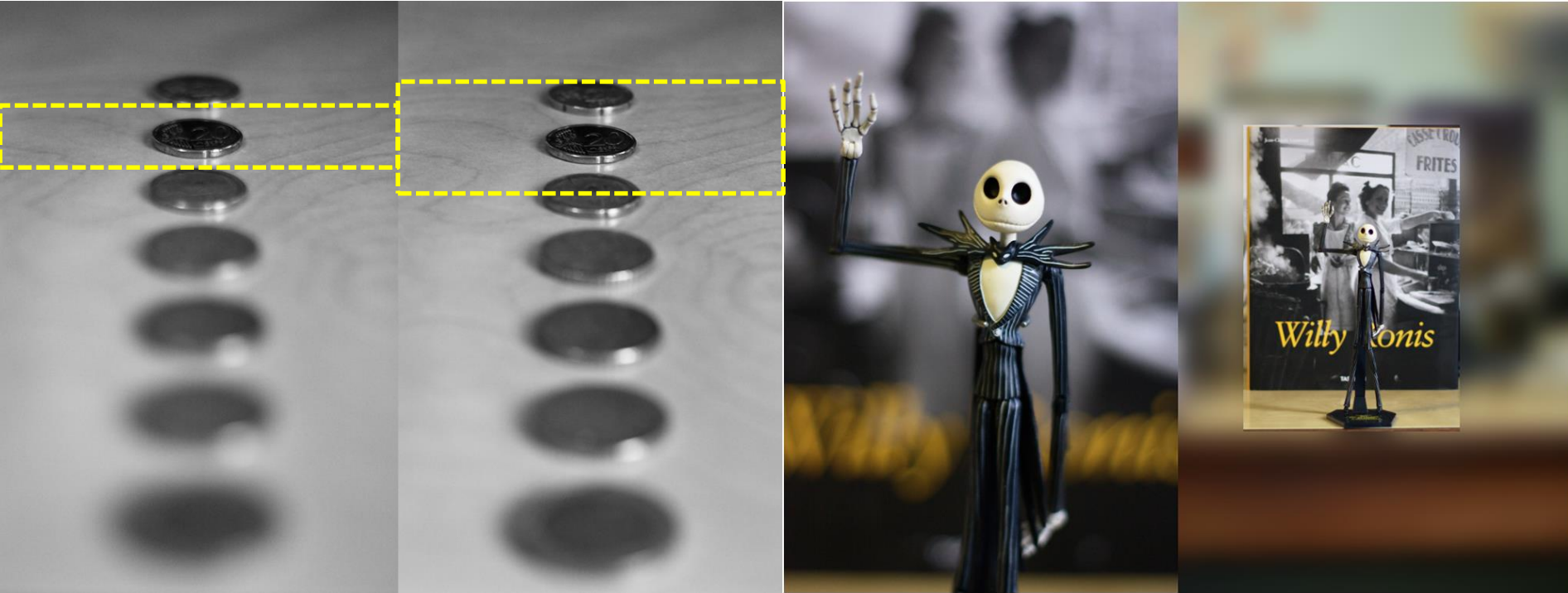
Cellule d'épiderme de bulbe d'oignon rouge



[https://www.nirgal.net/microscopie/sub\\_description\\_fonction\\_microscope.html](https://www.nirgal.net/microscopie/sub_description_fonction_microscope.html)

# Profondeur de champ

= Zone comprise entre le premier et le dernier plan net de l'image



A 50 cm du personnage    A 1,50 m du personnage

Proximité de l'échantillon = profondeur de champ faible  
-> Fort grossissement = profondeur de champ faible

+ ↓    G : x25 -> Profondeur de champ : 25  $\mu$ m    ↓ -  
G : x1000 -> Profondeur de champ : 0,6  $\mu$ m



Surplatine

Chariot  
=  
platine

Condenseur



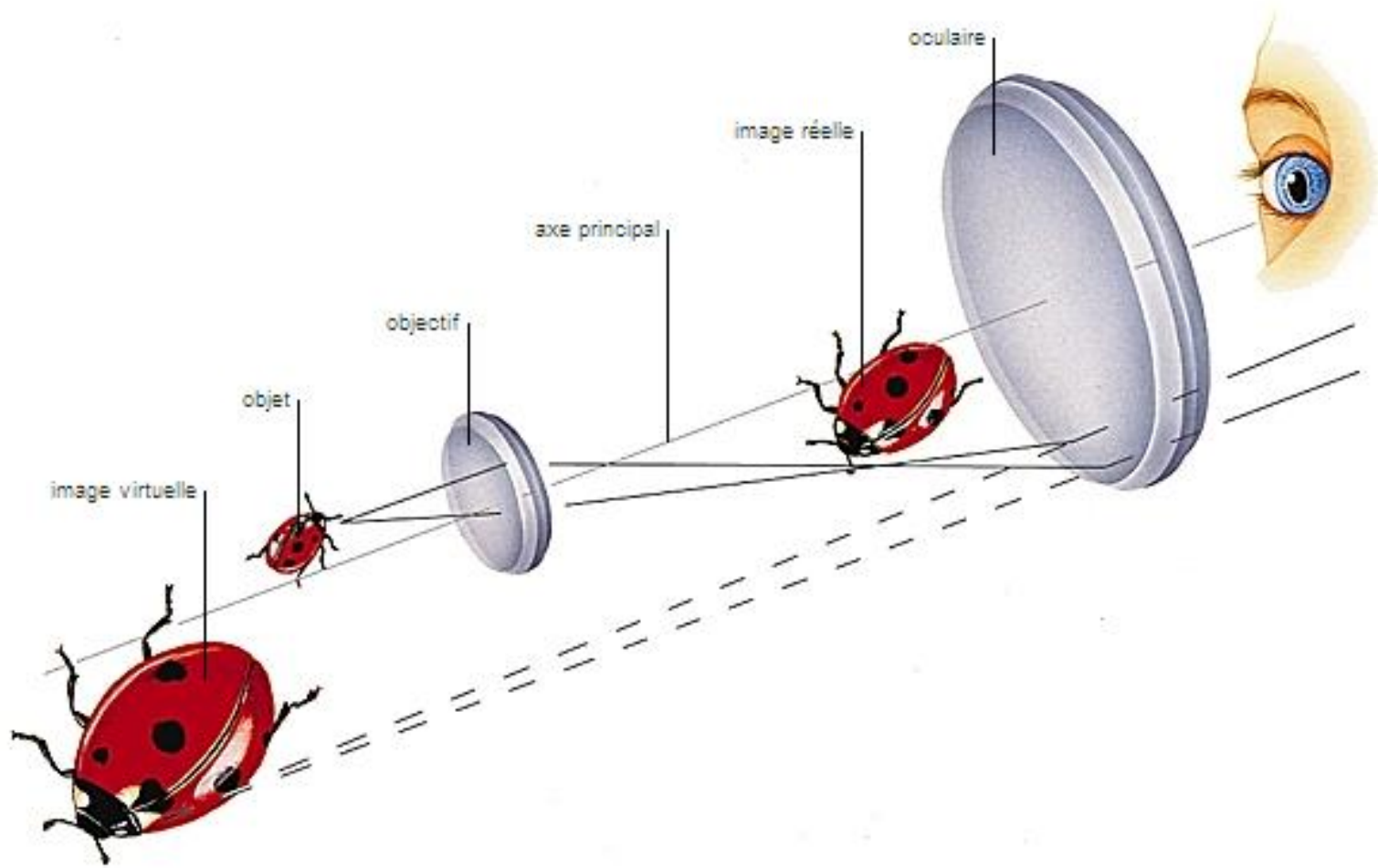
Objectif

Objectif à immersion : lentille baigne dans un liquide de réfraction proche de celui du verre -> augmente le pouvoir de résolution



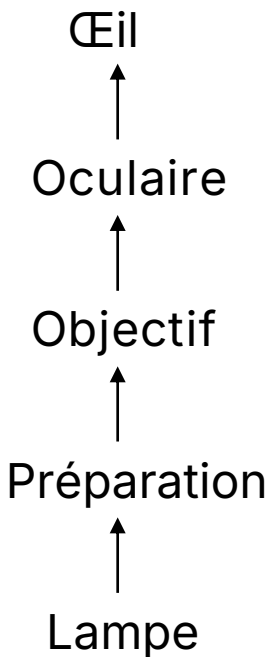
Oculaires

10



Ligne continue : direction rayons lumineux de l'image réelle  
 Ligne en pointillés : direction rayons lumineux de l'image virtuelle

# Caractéristiques de l'image



Grossissement G2  
Grossissement G1

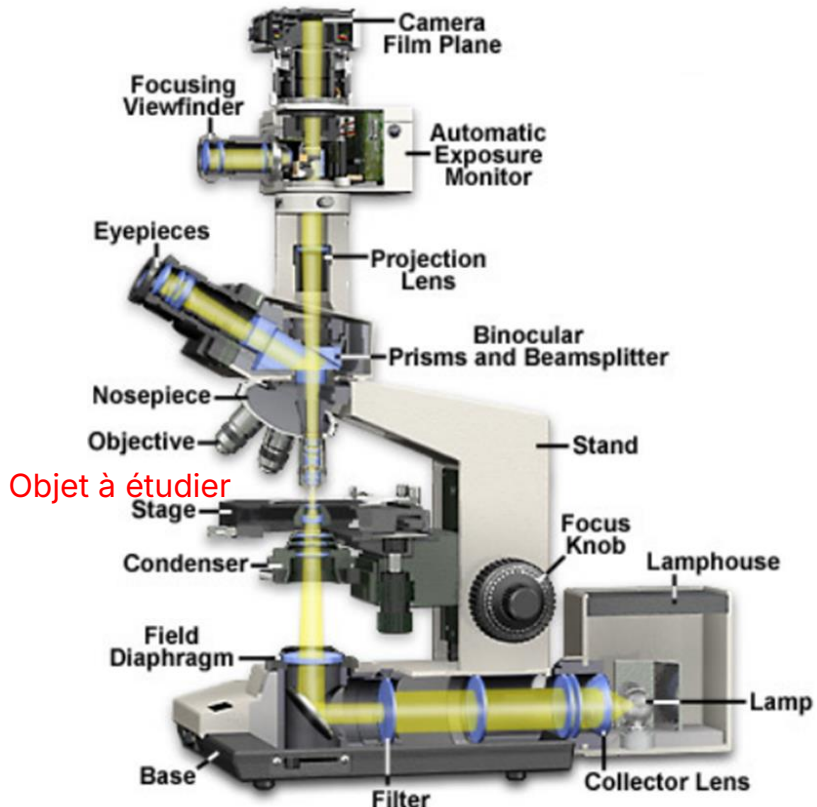
-> Grossissement = G1 x G2

Exemple :

Oculaire x10  
Objectif x100

Grossissement = 10 x 100 = 1000

Taille de l'image = taille réelle x grossissement



## C- Microscope photonique inversé

Limite de résolution : env 0,2  $\mu\text{m}$

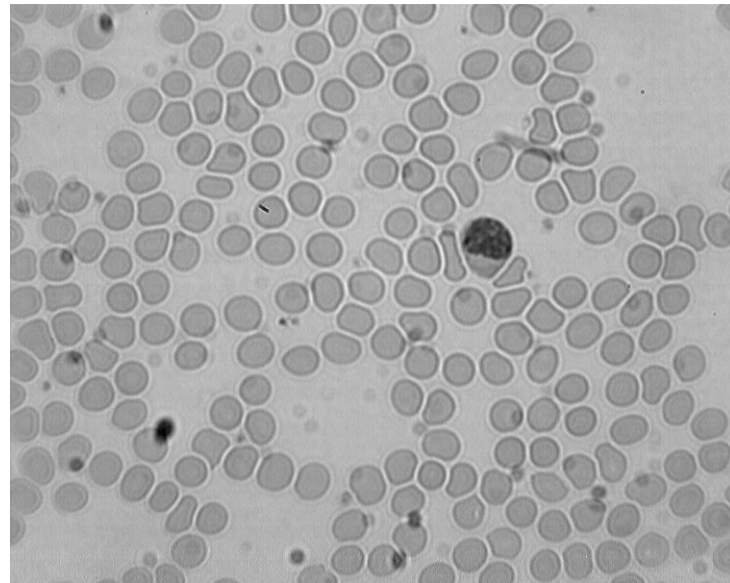
Observation en transparence

Grossissement utile : env 40 à 1250 x

Permet d'observer des cultures cellulaires ...

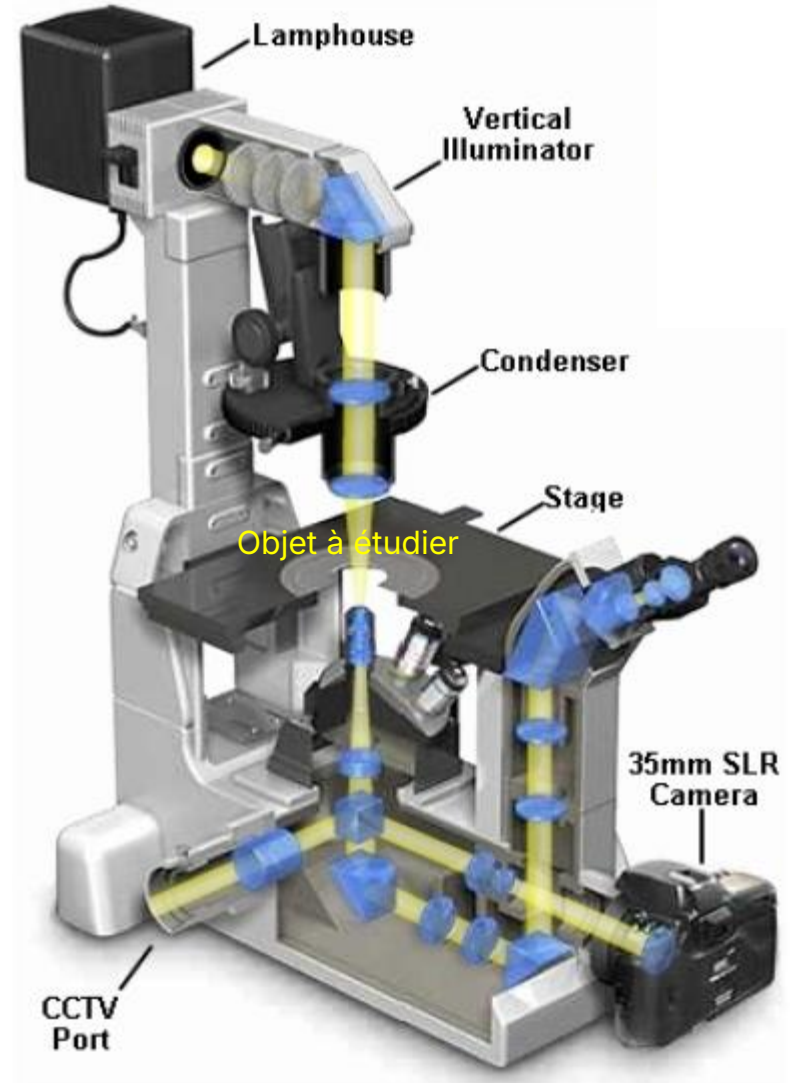
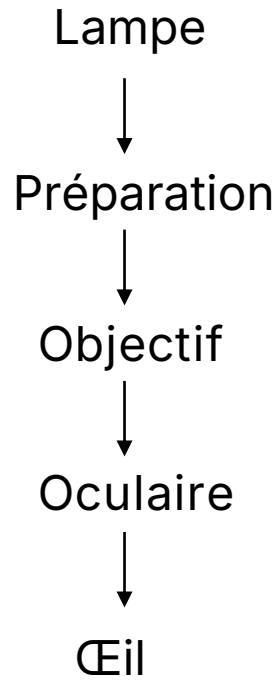


[https://www.gfmer.ch/Livres/FIV\\_atlas/FIV\\_ICSI.htm](https://www.gfmer.ch/Livres/FIV_atlas/FIV_ICSI.htm)



[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cellules\\_de\\_sang\\_humain\\_au\\_microscope\\_optique.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cellules_de_sang_humain_au_microscope_optique.jpg)

# Caractéristiques de l'image



*Exemple :*

*Oculaire x10  
Objectif x100*

*Grossissement =  $10 \times 100 = 1000$*

*Taille de l'image = taille réelle  $\times$  grossissement*

## D- Le microscope confocal

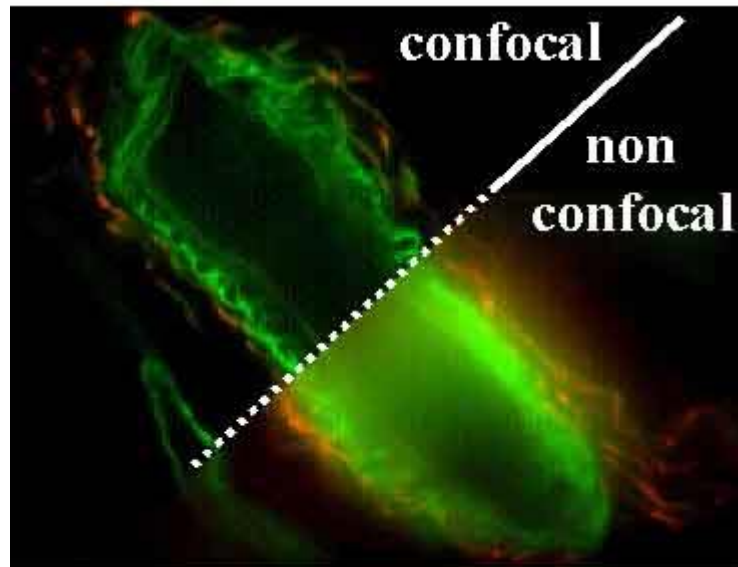
Eclairage de l'objet par balayage d'un faisceau lumineux émis par laser

Résolution améliorée

Utilisable en fluorescence

Traitement informatique : reconstitution 3D

But de la microscopie confocale à balayage laser : éliminer la lumière provenant des plans défocalisés qui parasite le plan focal



Perte de résolution due à l'excitation des fluorochromes se situant hors plan focal -> bruit de fond

<http://www.univ-rouen.fr/pfrric/ifrmp/principe.htm>

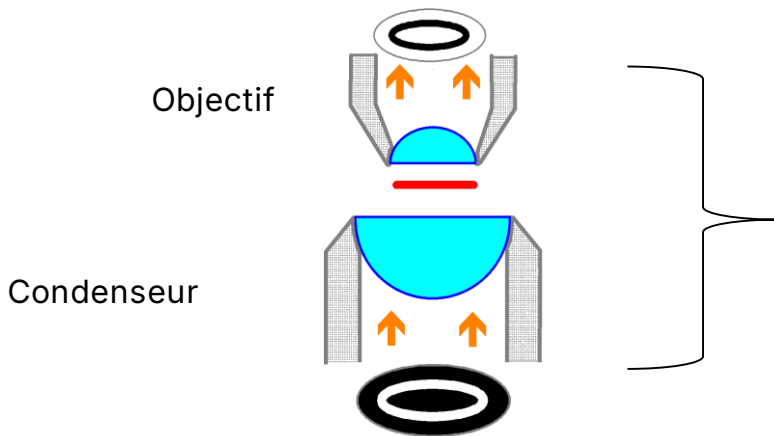
# III- Les compléments optiques

Matériel biologique relativement transparent

Peu visible à l'état frais, réfringent (renvoie la lumière et dévie les rayons lumineux)

Nécessité d'améliorations optiques et/ou de colorations

A- Contraste de phase (sélectionne la lumière déviée par l'objet)

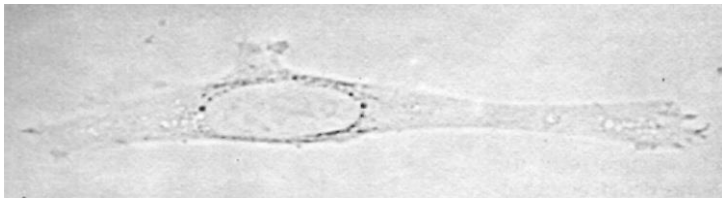


Très peu de lumière directe passe

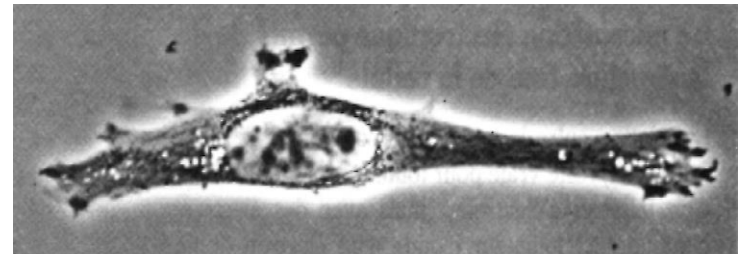
Zones échantillon modifient phase  
lumière -> lumière déviée non stoppée  
par anneaux (lumière réfractée)

Décalages de phase = variations  
contraste = zones claires/sombres

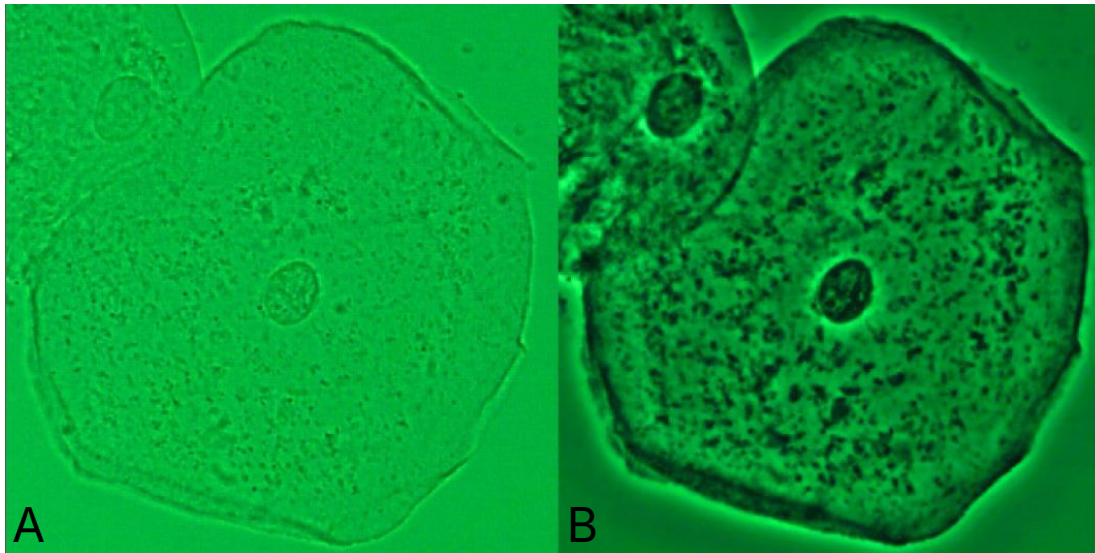
Production d'un halo



Fibroblaste en culture sans complément optique



Fibroblaste en culture observé en contraste de phase



Cellules obtenues en microscopie ordinaire (A) et en contraste de phase (B)

<http://www.cours.fmed.ulaval.ca/a06/fileadmin/cours/template/BIO11134/documents/documents/Cytol-PPT-CH1-2006.pdf>

# B- Contraste interférentiel

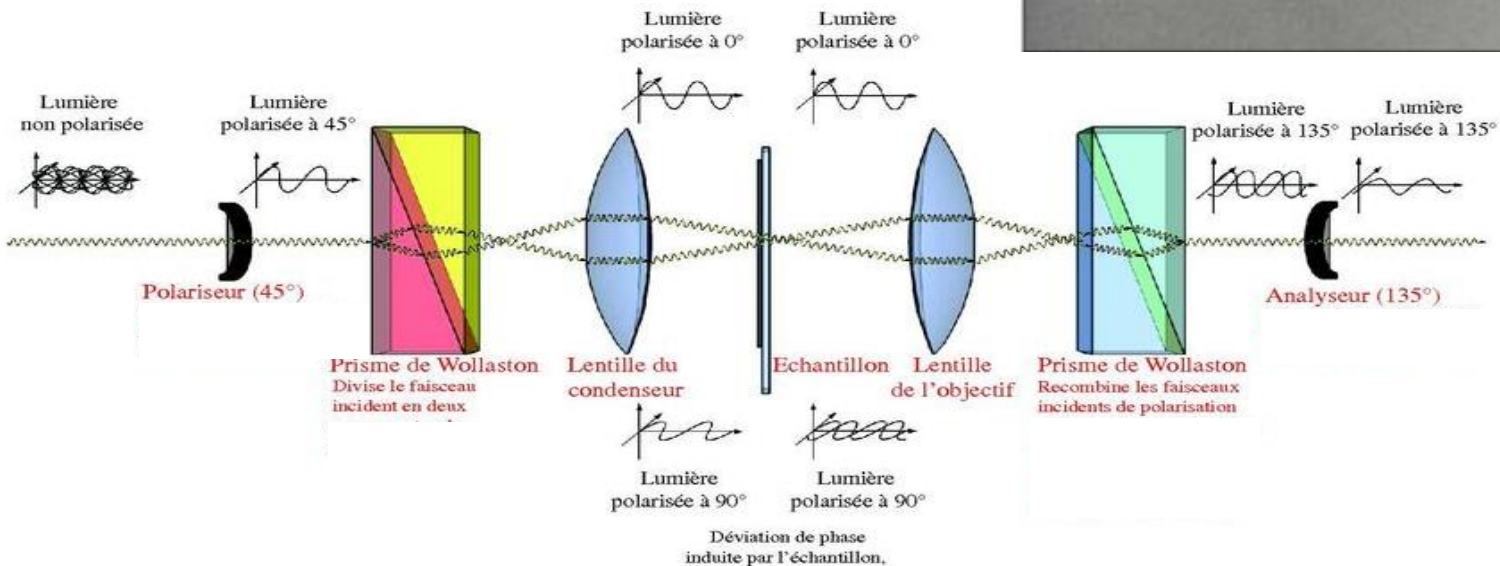
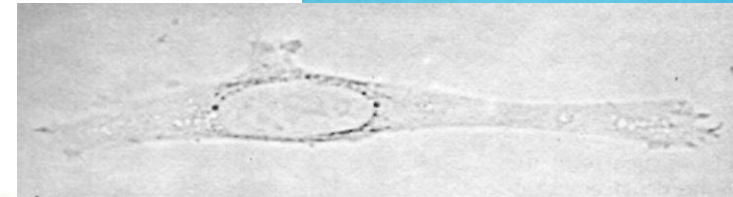
Lumière polarisée scindée en 2 faisceaux

Différence de vitesse selon structures traversées

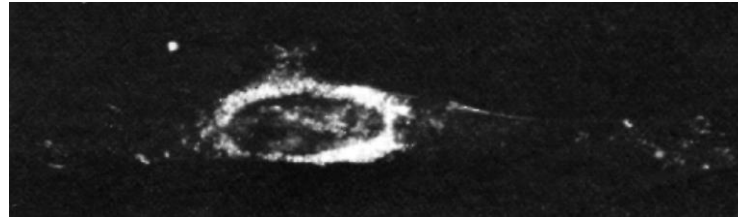
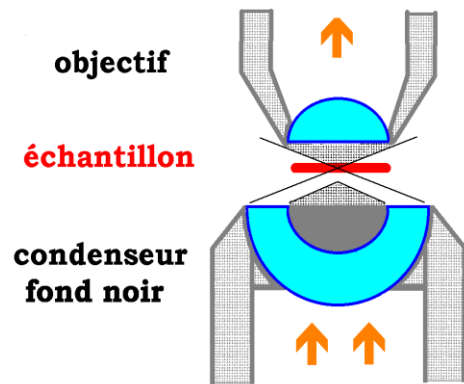
Entraîne décalages de phase

Recombinaison des faisceaux -> interférences

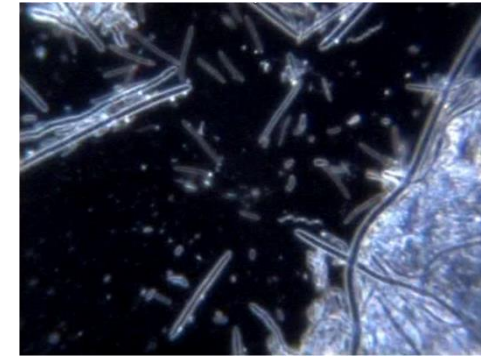
Variations de contraste -> impression de relief



# C- Fond noir

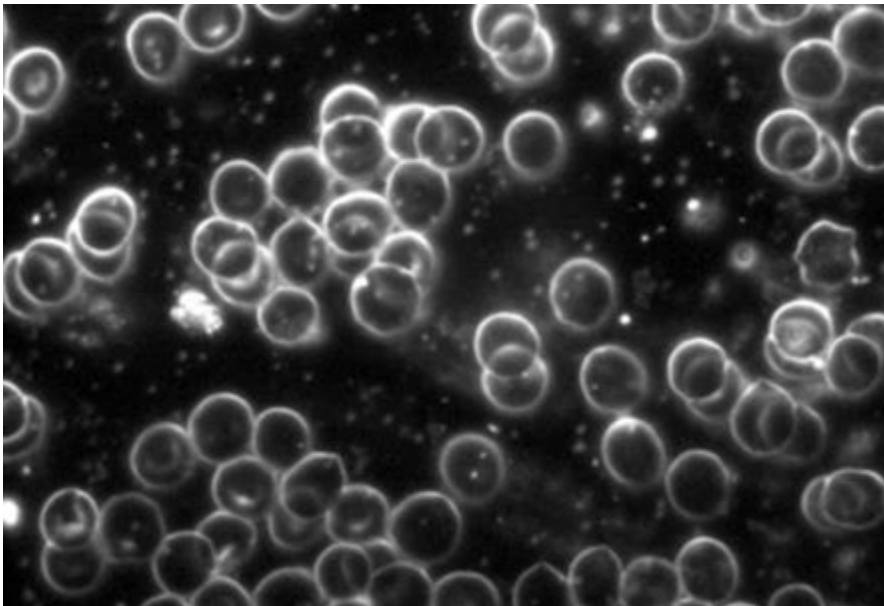


Fibroblaste en culture observé en fond noir

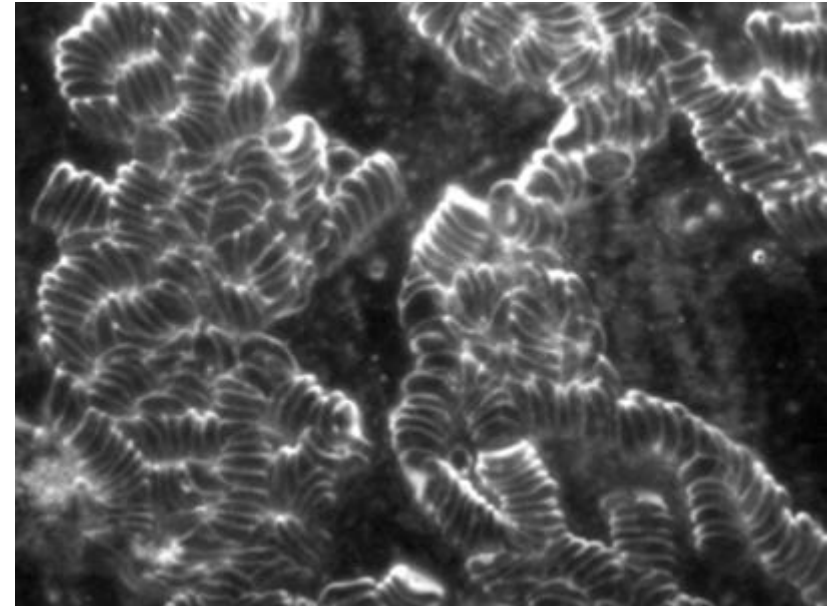


Bactéries de plaque sous-gingivale d'un patient

<http://www.parosphere.org/accueil/articles-de-fond/ecologie-de-la-bouche-2-5>



<http://www.optivital.fr/microscope-a-fond-noir>

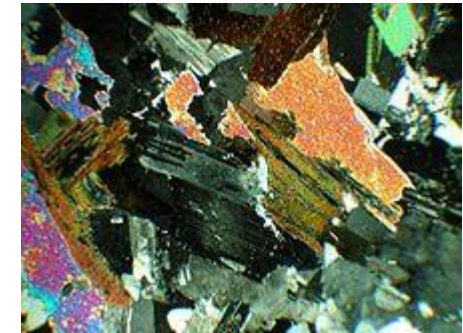
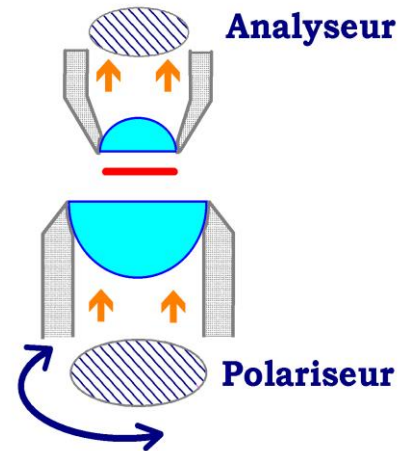


## D- Polarisation

Détection des variations de polarisation de la lumière après traversée de l'échantillon

Visualise les structures qui polarisent la lumière

Cristaux (acide urique...)

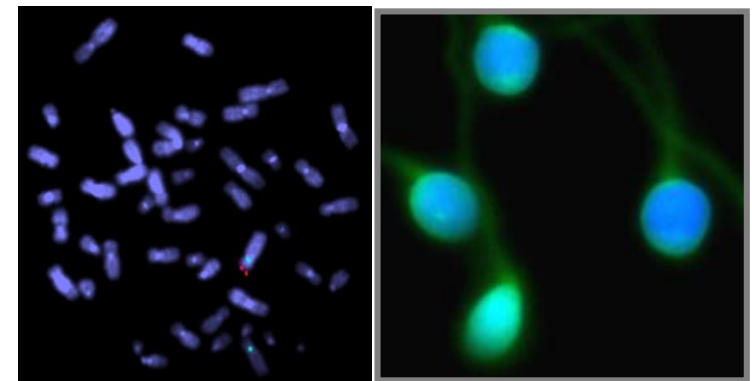
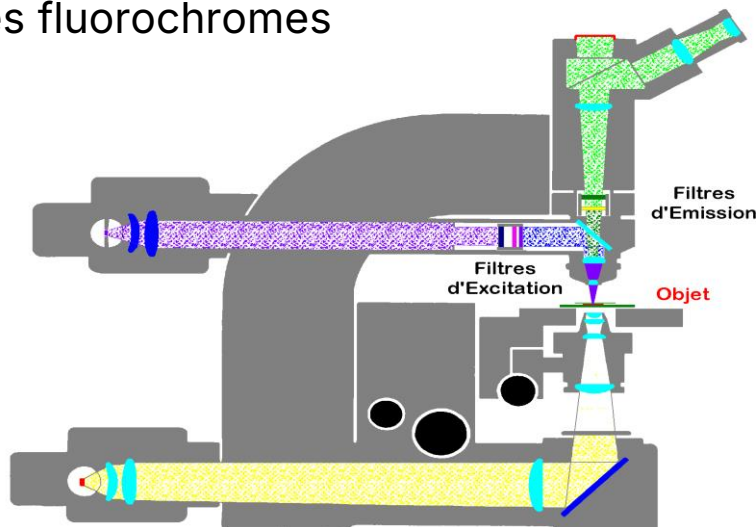


Lame mince de granite

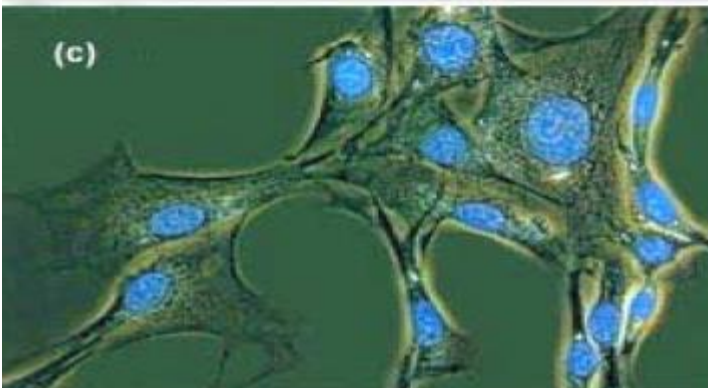
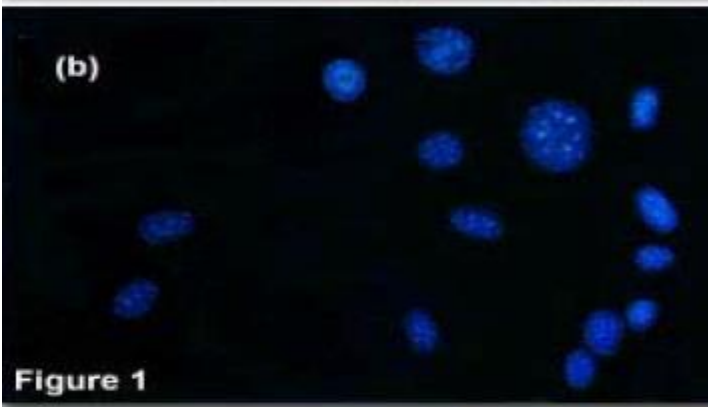
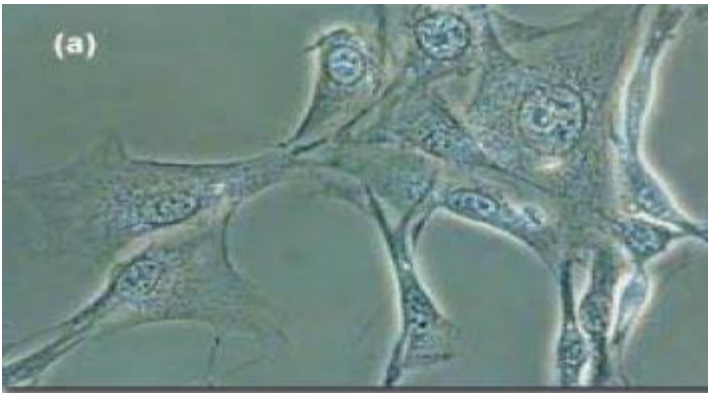
Thomas Bresson

## E- Epifluorescence

Pour les objets auto-fluorescents et pour les fluorochromes



Chromosomes et spermatozoïdes émettant une fluorescence bleue grâce au DAPI



Combinaison (c) de la microscopie à contraste de phase (a) et à épifluorescence (b) pour améliorer la visualisation de cellules (l'ADN en b est coloré avec un agent fluorescent, le DAPI)

# IV- Préparation pour microscopie photonique

Cellules isolées : étalement, fixation, coloration

Tissus biologiques : fixation, inclusion, coupe, coloration

## A- Fixation : Préservation des structures

Alcools (méthanol, éthanol)  
Acides (acétique)

Coagulation protéines

Aldéhydes (Formol, Glutaraldéhyde)  
Acide picrique  
OsO<sub>4</sub> (tétroxyde d'osmium) (M.E.)

Pontage chimique entre  
protéines (liaisons  
covalentes)

En Pratique :

Formol tamponné

Liquide De Bouin

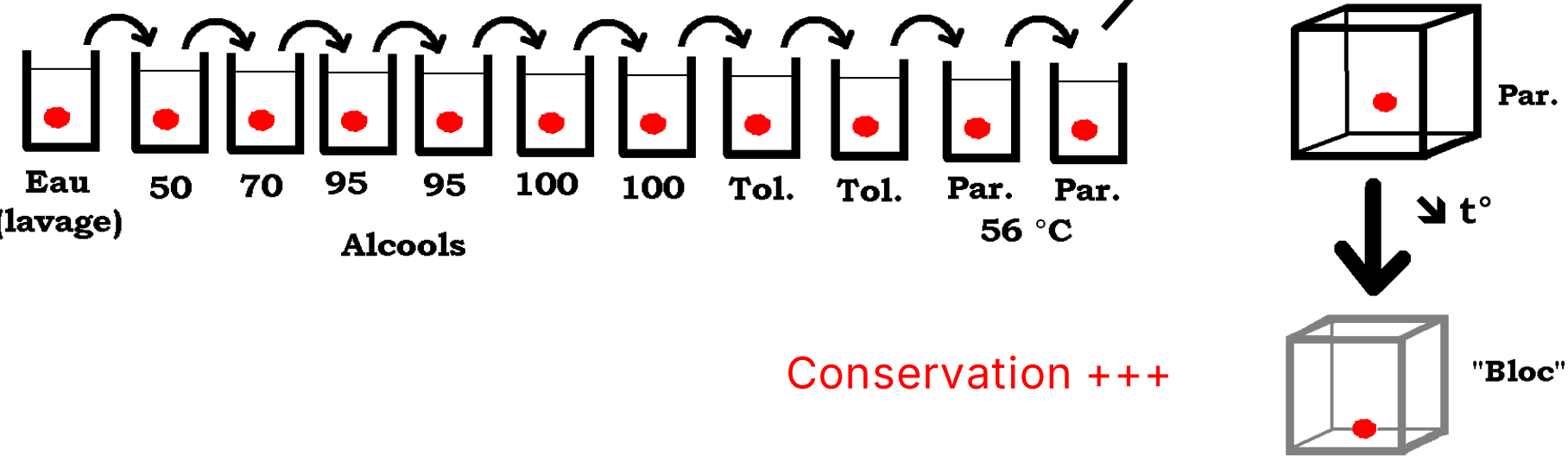
(Ac. picrique + Formol + Ac. Acétique)

Carnoy

(Acide acétique + Méthanol)

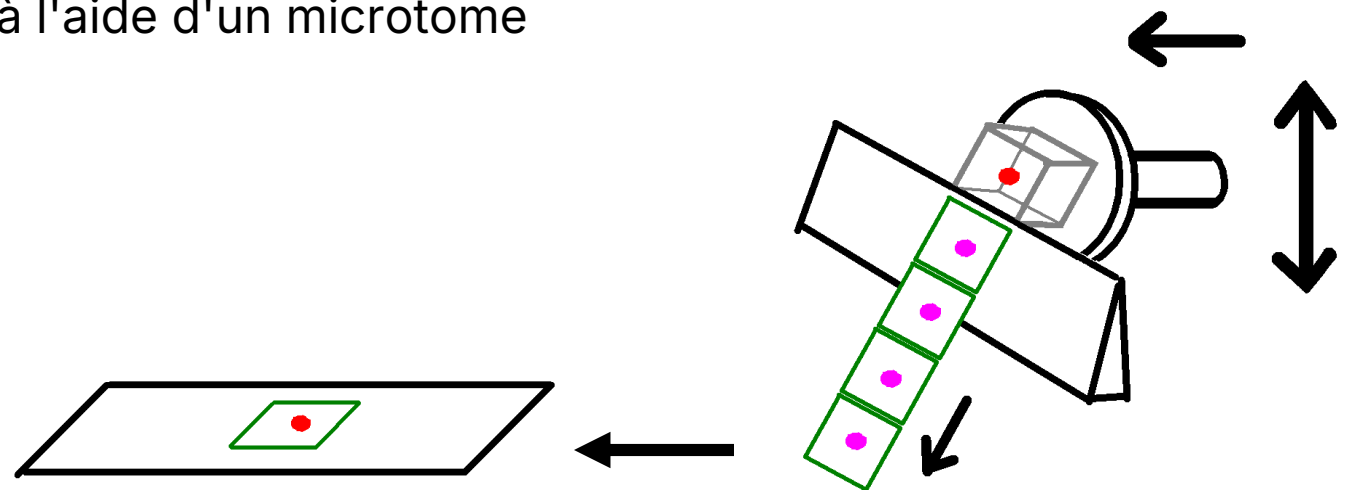
# B- Inclusion en paraffine

● Tissu fixé dans une solution aqueuse



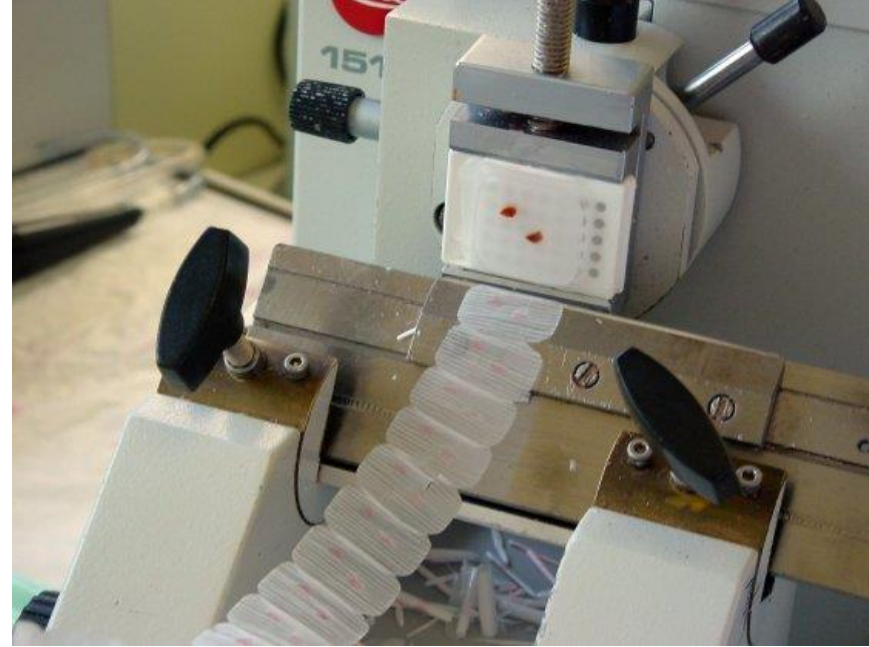
# C- Coupes : (4 à 6 µm)

à l'aide d'un microtome





Inclusion de tissus en paraffine



Coupes au microtome

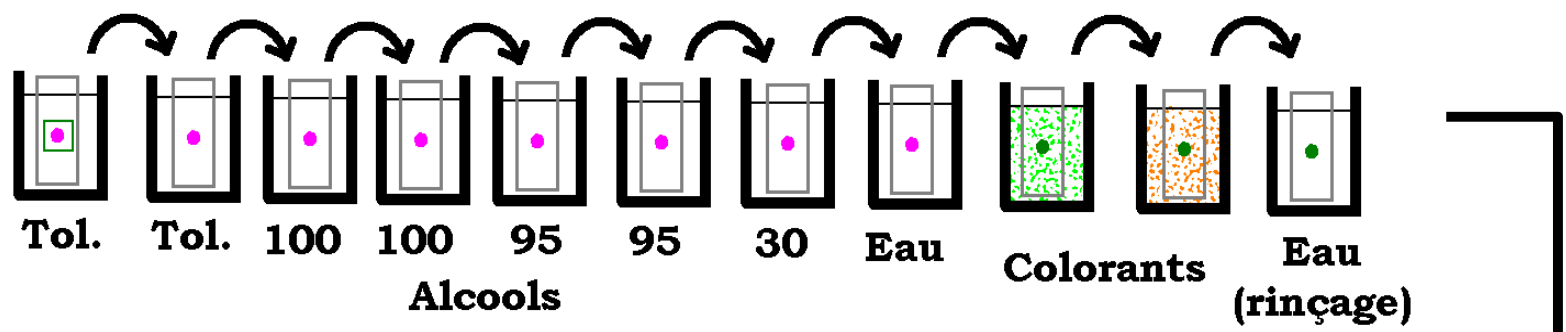


Ruban de coupes

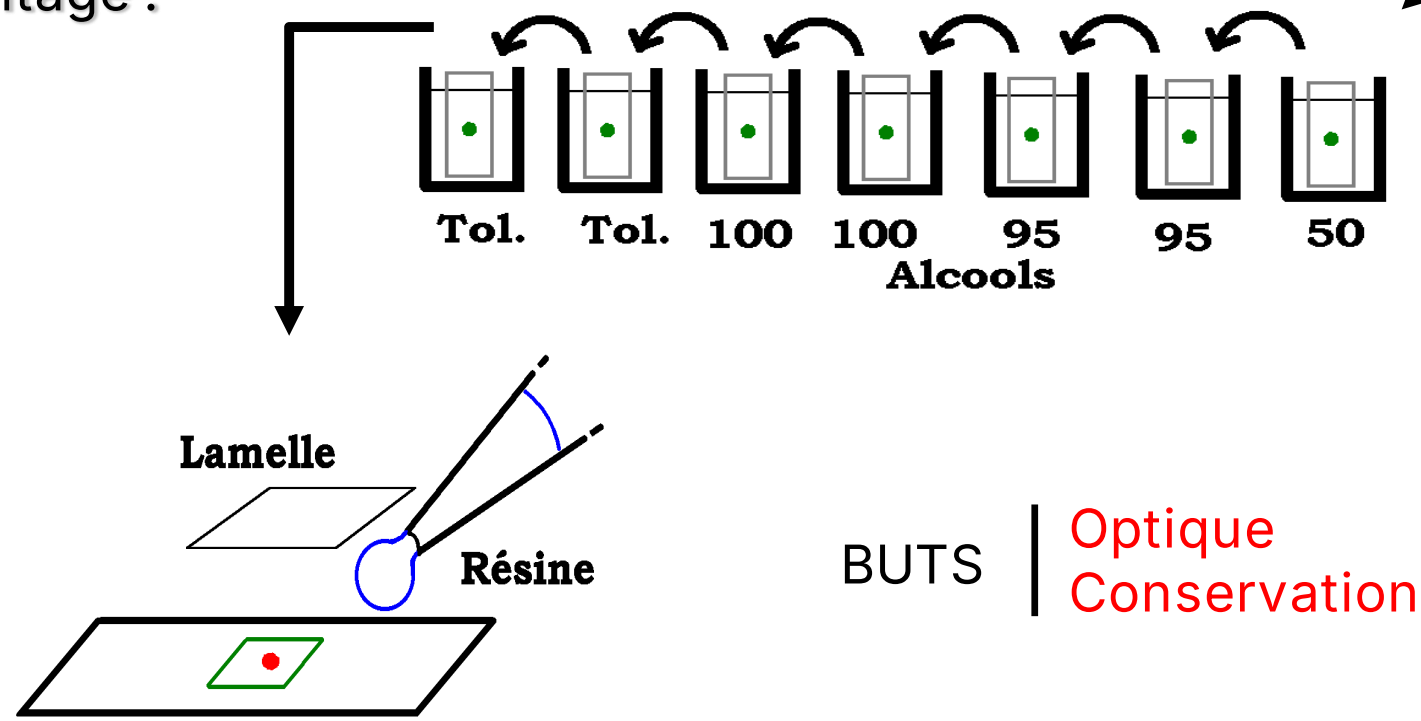


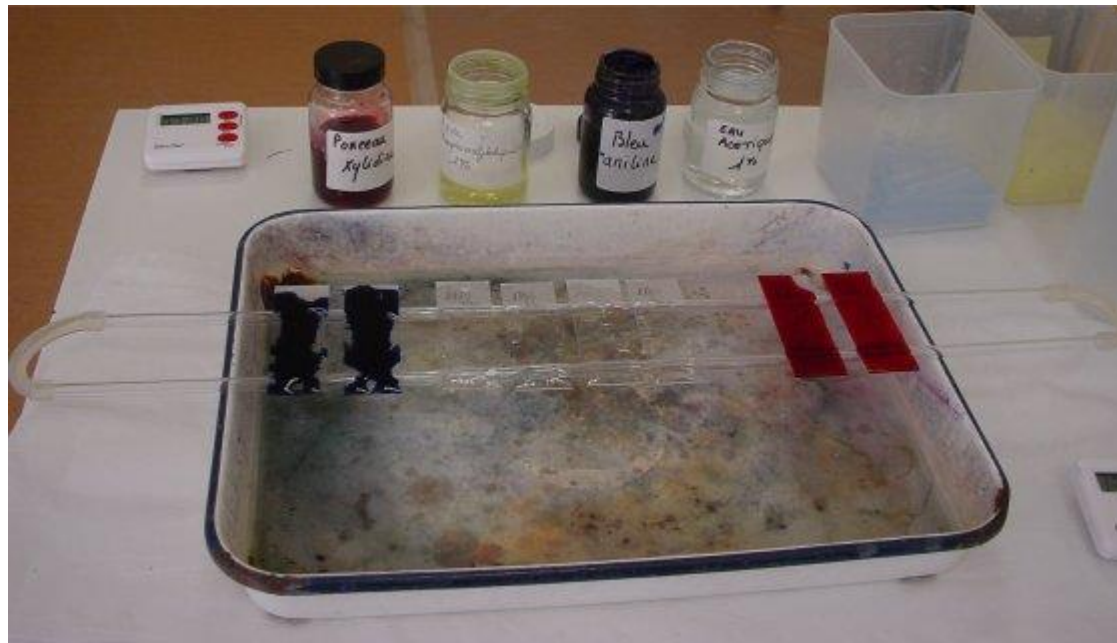
Dépôts des tranches sur lames

# D- Coloration



# E- Montage :





Coloration



Montage définitif avec collage  
des lamelles

# F- Synthèse

Avantages :            Conservation des structures  
                                 Qualité des images

Inconvénients :

36 à 48 h de préparation

Élimination des lipides

Élimination des petites molécules (ac. aminés, monosaccharides...)

Arrêt activités bio (enzymatiques ...)

Modification conformation des protéines



L'ANATOMIE PATHOLOGIQUE étudie ainsi les lésions des tissus et des organes (biopsies et pièces opératoires)

## G- Coupes en congélation

Tissu congelé, non fixé

Coupe avec cryo-microtome ( $t^{\circ} - 20^{\circ}\text{C}$ )

Coloration rapide (ex. Bleu de toluidine)

Avantages : RAPIDITÉ : examen extemporané

Maintient l'activité biochimique

Histo-enzymologie

Immuno-histologie

Conserve les lipides

Colorants des lipides : ex: noir soudan

Inconvénients : Qualité médiocre

# V- Méthodes de visualisation en microscopie photonique

## A- Colorations vitales

Utilisables avec des cellules vivantes

Colorants phagocytés (encre de Chine : cell mononucléées syst phagocytaire ...)

Colorants qui diffusent à travers les membranes (bleu de Nil)

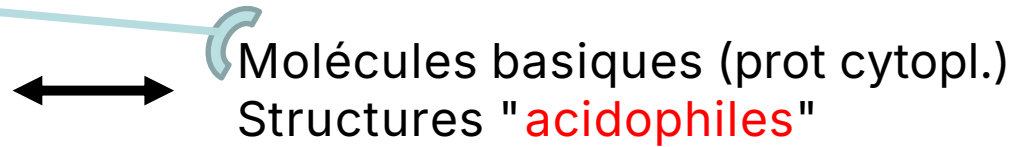
Colorants qui colorent cellules mortes par perméabilité membranaire

## B- Colorations générales

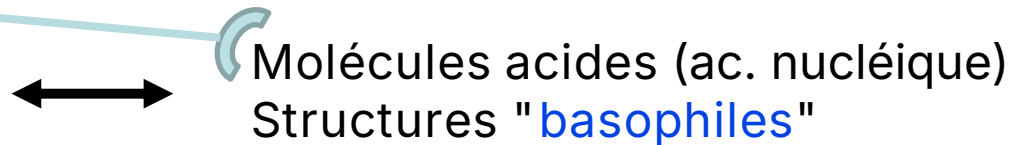
Rôle du ph +++



Colorants ACIDES (érythrosine, éosine, orange G...)



Colorants BASIQUES (hématéine, bleu de toluidine, ...)



Métachromasie = Modification de couleur suivant les molécules fixées au colorant (Ex. Bleu de toluidine, *acridine orange* –colorant fluo)

En pratique :

Coupes : hématéine-éosine -HE- hématéine-éosine safran –HES

Frottis sanguins : méthode de May Grünwald-Giemsa (MGG)

## C- Colorations histochimiques

P.A.S. (Per-iodic Acid Schiff) (Fuchsine) → Sucres

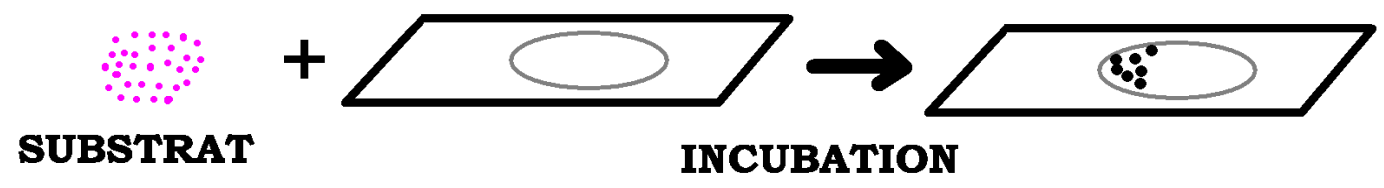
Feulgen-Rosenbeck → ADN (dosage par photométrie)

Colorations argentiques (variées) → Mélanine  
→ Amines biogènes  
→ Neurofibrilles

Perl's → Fer (ex dans macrophages)

# D- Histo-enzymologie

Sur matériel frais



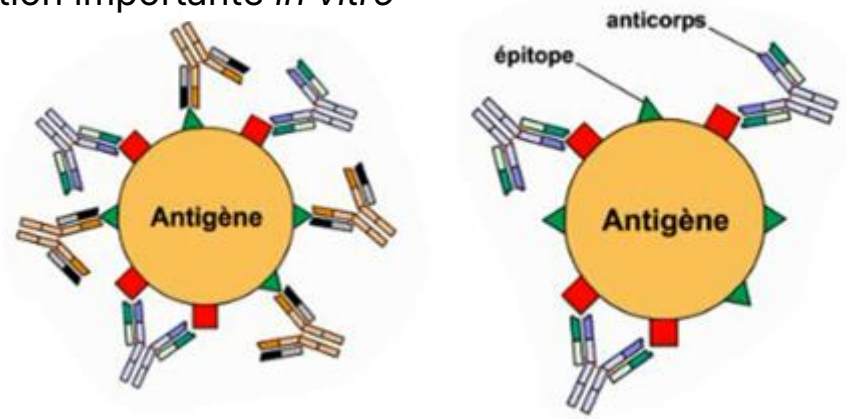
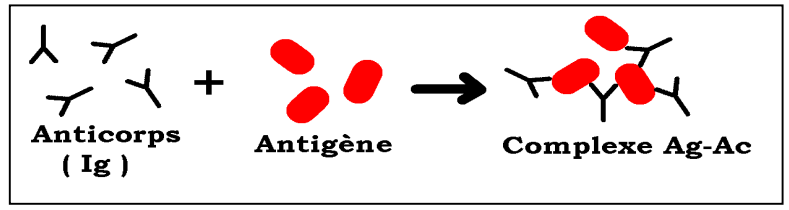
Pour peroxydases, phosphatases, estérases, etc...

# E- Immuno-histochimie **SPÉCIFICITÉ +++**

Anticorps (appartiennent à famille des immunoglobulines-Ig) produits par les lymphocytes B

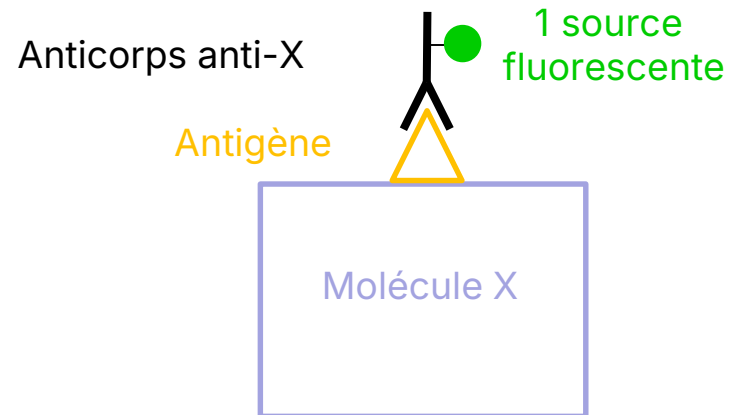
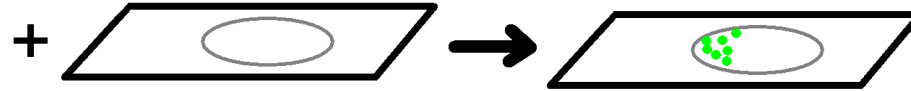
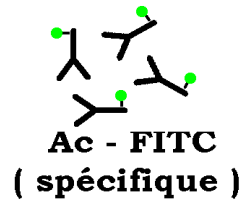
Polyclonaux : Obtention d'Ac par immunisation d'un animal -> extrait à partir du sérum

Monoclonaux : Produits par un clone de plasmocytes (L<sub>B</sub> différenciés) de l'animal puis fusion avec lignée cellulaire de lymphocytes tumoraux pour production importante *in vitro*

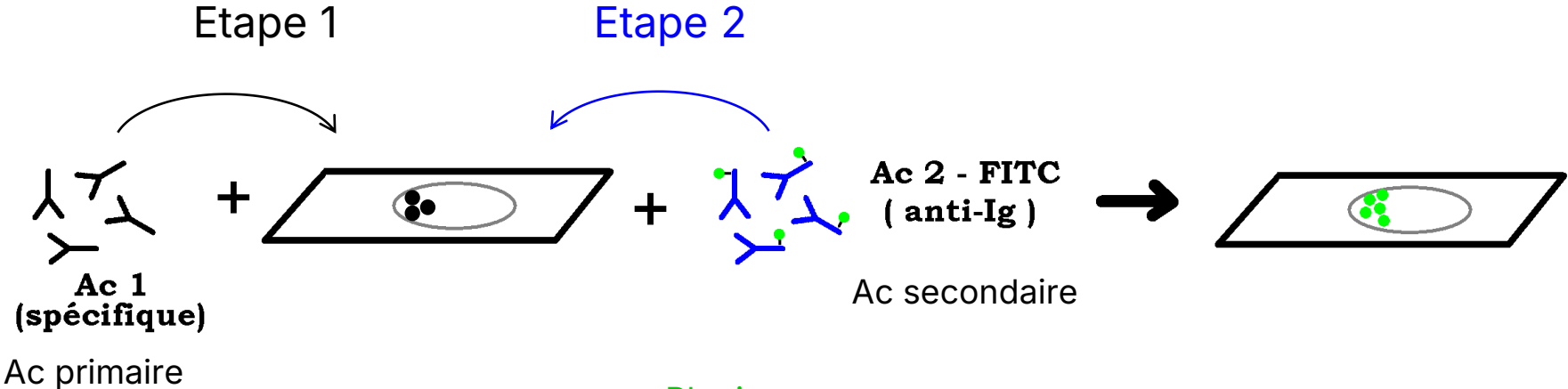


# 1- Immunofluorescence directe

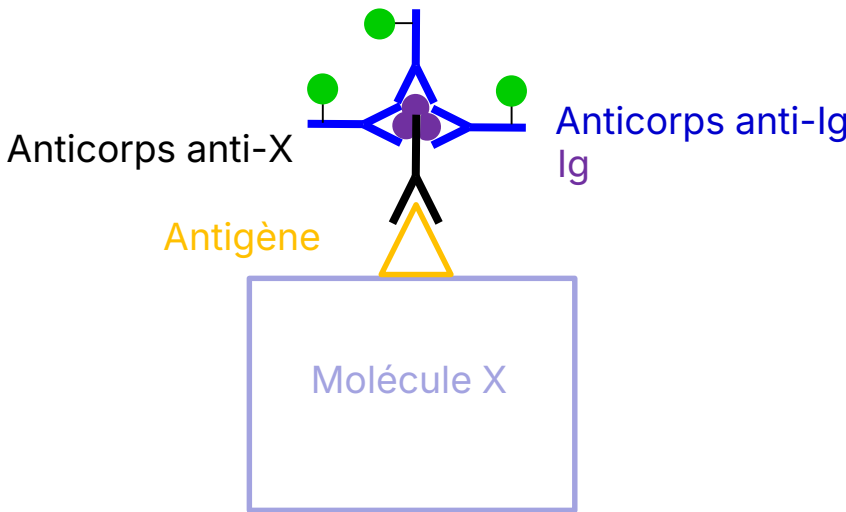
Fluorescéine -FITC



# 2- Immunofluorescence indirecte



Plusieurs sources fluorescentes

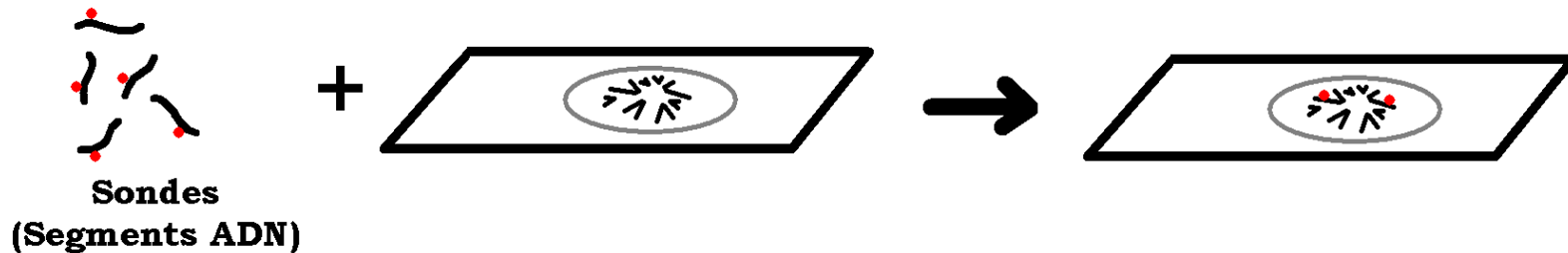


# F- Hybridation *in situ*

Localisation de segments d'ADN (ARN) par sondes

(Fragments d'ADN de séquence complémentaire)

Par ex. Sur chromosomes de cellules en mitose

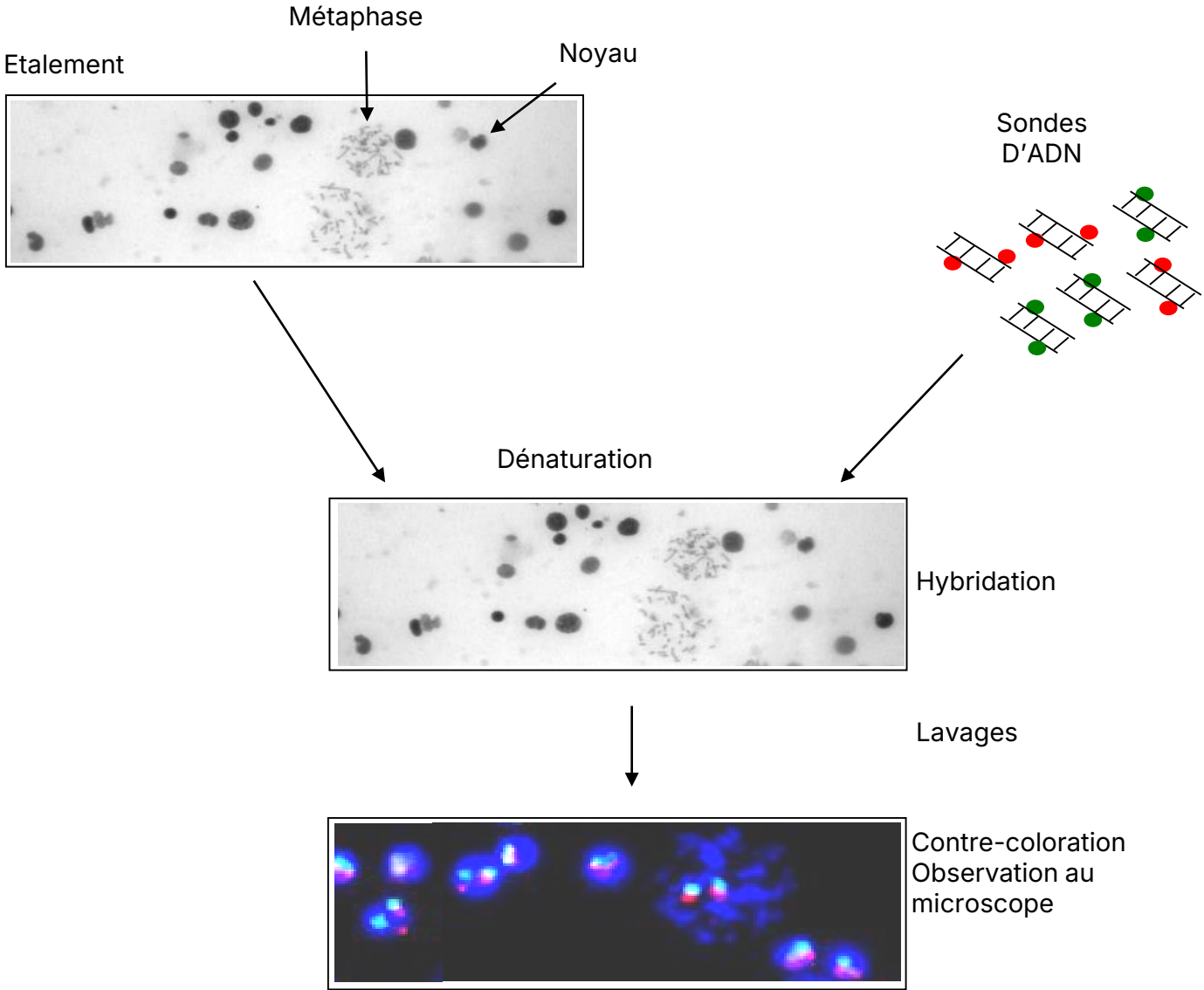


Marquage des sondes par :

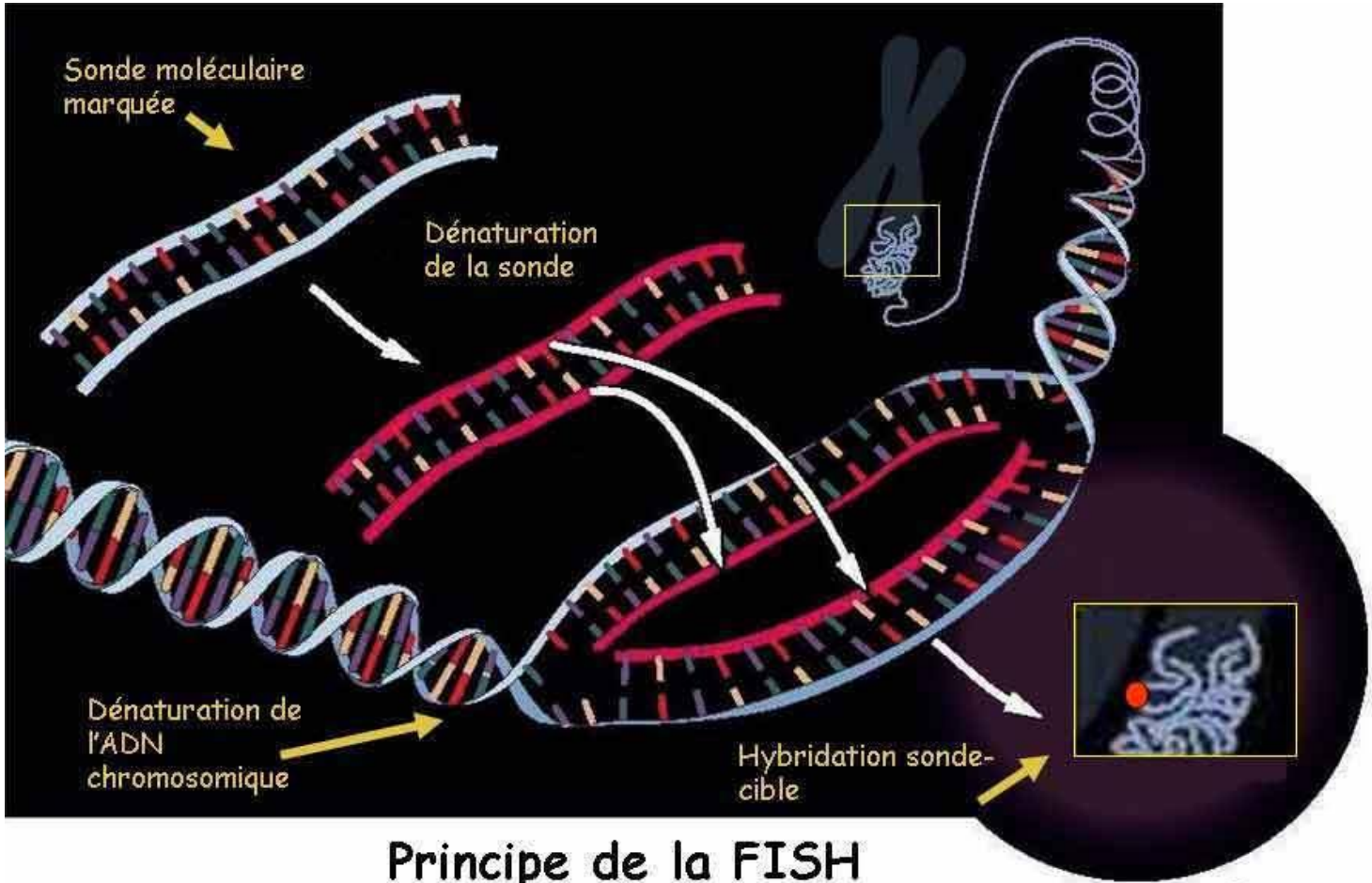
Isotopes (rarement utilisés)

Colorants fluorescents = FISH  
(Fluorescent *in situ* hybridization)

# Hybridation *in situ* fluorescente



# Hybridation *in situ* fluorescente



© C. Ozouf-Costaz

Contact : [aurore.perrin@chu-brest.fr](mailto:aurore.perrin@chu-brest.fr)