

PASS

HISTOLOGIE

UE2

Jean Foucier

PARCOURS
SANTÉ
& L.A.S

EDISCIENCE

Les illustrations de l'ouvrage ont été réalisées par l'auteur.

Le pictogramme qui figure ci-contre mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du photocopillage.

Le Code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Or, cette pratique



s'est généralisée dans les établissements

d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour

les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.

Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation de l'auteur, de son éditeur ou du Centre français d'exploitation du

droit de copie (CFC, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).

© Dunod, 2020

11 rue Paul Bert, 92240 Malakoff

www.dunod.com

ISBN 978-2-10-080983-7

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2^o et 3^o a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Table des matières

Abréviations	XIII
Introduction générale	1

Partie I : Les techniques d'études histologiques

Chapitre 1 Les approches microscopiques

■ 1 Principes de l'analyse microscopique : limite de résolution et pouvoir séparateur	6
▪ 1.1 Microscopie optique	6
▪ 1.2 Microscopie électronique	7
■ 2 La microscopie optique	8
▪ 2.1 Préparation d'échantillons tissulaires	8
▪ 2.2 Préparation de populations cellulaires isolées	12
▪ 2.3 Les microscopes photoniques	13
■ 3 La microscopie électronique	17
▪ 3.1 Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission (ou MET)	17
▪ 3.2 Autres types d'observation en MET	20
▪ 3.3 Microscopie électronique à balayage (ou MEB)	21

Chapitre 2 Méthodes histologiques de détection *in situ*

■ 1 Les méthodes histochimiques	22
■ 2 Les méthodes cyto/histoenzymatiques	23
■ 3 Les méthodes immunocyto/histologiques	24
▪ 3.1 Anticorps	24
▪ 3.2 Les marqueurs d'anticorps	26
▪ 3.3 Les techniques de marquage	27

■ 4 Hybridation <i>in situ</i>	30
■ 5 Autoradiographie	31
Questions à choix multiples	33

Partie II : Les tissus épithéliaux

Chapitre 3 Les tissus épithéliaux : généralités

■ 1 Caractéristiques générales des tissus épithéliaux	45
▪ 1.1 Polarité tissulaire et cellulaire	45
▪ 1.2 Polarité fonctionnelle cellulaire	47
■ 2 Les complexes jonctionnels	48
▪ 2.1 Jonctions intercellulaires	48
▪ 2.2 Jonctions d'ancrage cellule-substrat	54

Chapitre 4 Les épithéliums de revêtement

■ 1 Caractéristiques générales	57
■ 2 Les différents types d'épithélium de revêtement	58
▪ 2.1 Les critères de classification	58
▪ 2.2 Classification des épithéliums de revêtement	59
■ 3 Différenciations apicales et basales	64
▪ 3.1 Équipement microvillositaire	64
▪ 3.2 Ciliature	65
▪ 3.3 Stéréocils	67
▪ 3.4 Plaques membranaires	67
▪ 3.5 Lobulations basales	67
■ 4 Dynamique du renouvellement cellulaire	68

Chapitre 5 Les épithéliums glandulaires

■ 1 Formation des épithéliums glandulaires	70
■ 2 Les glandes exocrines	72
▪ 2.1 Classification des glandes exocrines selon leur organisation structurale	73
▪ 2.2 Critères fonctionnels de classification des glandes exocrines	78

■ 3 Les glandes endocrines	83
▪ 3.1 Diversité des productions hormonales	83
▪ 3.2 Les cellules neuroendocrines	84
■ 4 Les glandes amphicrines	85
Questions à choix multiples	86

Partie III : Les tissus conjonctifs

Chapitre 6 Les tissus conjonctifs : définition et classification

■ 1 Tissus conjonctifs et organisation mésenchymateuse	101
■ 2 Classification des tissus conjonctifs	102
▪ 2.1 Les tissus conjonctifs lâches	102
▪ 2.2 Les tissus réticulaires	102
▪ 2.3 Les tissus conjonctifs denses	103
■ 3 Les tissus conjonctifs spécialisés	103

Chapitre 7 Les cellules des tissus conjonctifs

■ 1 Les cellules résidentes	104
▪ 1.1 Les fibroblastes/fibrocytes	104
▪ 1.2 Les adipocytes, chondrocytes et ostéocytes	105
■ 2 Les cellules ubiquistes	106
▪ 2.1 Les lymphocytes	106
▪ 2.2 Les macrophages	106
▪ 2.3 Les mastocytes	106
▪ 2.4 Autres cellules	108

Chapitre 8 La matrice extracellulaire

■ 1 Le matériel fibreux matriciel	109
▪ 1.1 Le collagène	109
▪ 1.2 Les fibres élastiques	114
■ 2 Les constituants de la substance fondamentale	114
▪ 2.1 Les composés polysaccharidiques	114
▪ 2.2 Les protéines structurales d'adhérence	116

■ 3 Une matrice extracellulaire particulière, la lame basale	118
▪ 3.1 Localisation et structure	118
▪ 3.2 Composition moléculaire	118
▪ 3.3 Rôles biologiques	119

Chapitre 9

Un tissu conjonctif spécialisé, le tissu adipeux

■ 1 Les adipocytes	121
▪ 1.1 Les adipocytes blancs	121
▪ 1.2 Les adipocytes bruns	122
■ 2 Le tissu adipeux blanc	122
▪ 2.1 Organisation tissulaire	122
▪ 2.2 Localisation	123
▪ 2.3 Rôles biologiques	124
■ 3 Le tissu adipeux brun	125
▪ 3.1 Organisation et localisation	125
▪ 3.2 Son rôle thermogénique	125

Chapitre 10

Les tissus squelettiques (1) : les tissus cartilagineux

■ 1 Caractéristiques	126
▪ 1.1 Organisation générale	126
▪ 1.2 Les constituants du tissu cartilagineux	127
■ 2 Chondrogenèse, croissance et renouvellement du tissu cartilagineux	129
▪ 2.1 Croissance des cartilages	129
▪ 2.2 Renouvellement des constituants matriciels	130
■ 3 Les différents types de cartilages	130
▪ 3.1 Les cartilages hyalins	130
▪ 3.2 Les cartilages fibreux ou fibrocartilages	130
▪ 3.3 Les cartilages élastiques	131
▪ 3.4 Cas des cartilages articulaires	131

Chapitre 11

Les tissus squelettiques (2) : les tissus osseux

■ 1 Les constituants du tissu osseux	133
▪ 1.1 Les cellules osseuses	133
▪ 1.2 La matrice extracellulaire osseuse	135

■ 2 Les différents types d'organisation du tissu osseux	136
▪ 2.1 Le tissu osseux non lamellaire ou réticulaire	136
▪ 2.2 Le tissu osseux lamellaire	136
▪ 2.3 Les tissus de recouvrement des structures osseuses	138
▪ 2.4 Les différents types anatomiques osseux	138
■ 3 Rôles des tissus osseux	139
Chapitre 12	
Les tissus squelettiques (3) : ostéogène et dynamique tissulaire osseuse	
■ 1 Ossification primaire	140
▪ 1.1 Ossification endochondrale	140
▪ 1.2 Ossification périostique	143
▪ 1.3 Ossification dermique ou de membrane	143
■ 2 Ossification secondaire	145
▪ 2.1 Remodelage osseux	145
▪ 2.2 Dynamique des tissus osseux	147
■ 3 Régulation des processus d'ossification	148
▪ 3.1 Facteurs mécaniques	148
▪ 3.2 Facteurs locaux et endocriniens	148
Questions à choix multiples	149

Partie IV : Les tissus musculaires

Chapitre 13

Les tissus musculaires striés squelettiques

■ 1 Organisation générale des muscles squelettiques striés	169
■ 2 Caractéristiques microscopiques	170
■ 3 Structure et composition moléculaire des myofibrilles	171
▪ 3.1 Les myofilaments fins	172
▪ 3.2 Les myofilaments épais	172
■ 4 Réticulum sarcoplasmique et système T	173
▪ 4.1 Le réticulum endoplasmique	173
▪ 4.2 Le système T	173

■ 5 Particularités moléculaires des rhabdomyocytes	174
▪ 5.1 Molécules myofibrillaires	174
▪ 5.2 Molécules et complexes moléculaires membranaires	175
■ 6 Diversité des fibres musculaires	178

Chapitre 14 Le tissu cardiaque

■ 1 Les compartiments tissulaires cardiaques	180
▪ 1.1 Les enveloppes tissulaires cardiaques	180
▪ 1.2 Les structures tissulaires de la paroi du cœur	181
■ 2 Les cardiomyocytes contractiles	182
▪ 2.1 Caractéristiques histologiques	182
▪ 2.2 Caractéristiques moléculaires	183
■ 3 Les cardiomyocytes « non contractiles »	184
▪ 3.1 Cellules cardionectrices	184
▪ 3.2 Cellules myoendocrines	184

Chapitre 15 Les tissus musculaires lisses

■ 1 Les muscles lisses	186
■ 2 Structure des cellules musculaires lisses	187
▪ 2.1 Caractéristiques générales	187
▪ 2.2 Caractéristiques structurales et moléculaires	187
▪ 2.3 Caractéristiques membranaires	188
■ 3 Organisation tissulaire et diversité des cellules musculaires lisses	189
▪ 3.1 Cas de cellules isolées	189
▪ 3.2 Cellules disposées en couche	189
▪ 3.3 Cellules regroupées en un muscle individualisé	190
■ 4 Types cellulaires apparentés	190
▪ 4.1 Les cellules myoépithéliales	190
▪ 4.2 Les cellules myofibroblastiques	190
▪ 4.3 Péricytes	190
▪ 4.5 Les cellules épithélioïdes	191

Chapitre 16

La contraction musculaire

■ 1 Contraction des cellules musculaires squelettiques	192
▪ 1.1 L'innervation du muscle	192
▪ 1.2 Couplage excitation-contraction	194
■ 2 Contraction des cellules musculaires lisses	196
▪ 2.1 Caractères généraux	196
▪ 2.2 Mécanisme moléculaire de la contraction	197
Questions à choix multiples	199

Partie V : Le tissu nerveux

Chapitre 17

Les cellules du système nerveux

■ 1 Les neurones	213
▪ 1.1 Caractéristiques morphologiques	213
▪ 1.2 Caractéristiques cytologiques	215
■ 2 Les cellules gliales	217
▪ 2.1 Les cellules gliales du système nerveux central (SNC)	218
▪ 2.2 Les cellules gliales du système nerveux périphérique (SNP)	220
■ 3 Les cellules souches neurales	221

Chapitre 18

Dynamique fonctionnelle neuronale : transport neuronal et communication synaptique

■ 1 Transport neuronal	223
▪ 1.1 Les transports axonaux	223
▪ 1.2 Les transports dendritiques	224
■ 2 Les synapses	224
▪ 2.1 Caractéristiques générales	224
▪ 2.2 Organisation structurale des synapses	227
▪ 2.3 Fonctionnalité synaptique	229

Chapitre 19

Myéline et myélinisation

■	1 Organisation structurale des gaines de myéline	231
■	2 Distribution des structures myélinisées	232
▪	2.1 Au niveau du SNC	232
▪	2.2 Au niveau du SNP	234
■	3 Composition chimique de la myéline	235
■	4 Conséquences fonctionnelles de la myélinisation	235

Chapitre 20

Le système nerveux central

■	1 Les substances blanche et grise	238
▪	1.1 La substance blanche	238
▪	1.2 La substance grise	239
▪	1.3 Distribution tissulaire des substances blanche et grise	239
■	2 Compartimentation du SNC	239
▪	2.1 La barrière hémato-encéphalique	239
▪	2.2 La barrière entre le liquide céphalorachidien (ou cérébrospinal) et le névraxe	240
▪	2.3 La barrière entre le milieu sanguin et le liquide céphalorachidien	241

Chapitre 21

Le système nerveux périphérique

■	1 Les nerfs périphériques	242
▪	1.1 Les deux types de fibres nerveuses	243
▪	1.2 Les nerfs	243
■	2 Les ganglions nerveux	245
▪	2.1 Les ganglions sensitifs	245
▪	2.2 Les ganglions du système nerveux végétatif	245
■	3 Les terminaisons nerveuses	245
▪	3.1 Terminaisons efférentes	245
▪	3.2 Terminaisons afférentes	246

Questions à choix multiples	247
------------------------------------	------------

Partie VI : Le tissu sanguin

Chapitre 22 Les cellules sanguines

■ 1 Quantification des catégories cellulaires sanguines	265
▪ 1.1 Numération de la formule sanguine	266
▪ 1.2 Numération et formule leucocytaires	266
■ 2 Les catégories cellulaires sanguines	268
▪ 2.1 Les cellules de la lignée rouge	268
▪ 2.2 Les globules blancs ou leucocytes	270
▪ 2.3 Les plaquettes sanguines ou thrombocytes	273

Chapitre 23 L'hématopoïèse

■ 1 Les tissus hématopoïétiques	275
▪ 1.1 Les sites de l'hématopoïèse	275
▪ 1.2 Le tissu médullaire hématopoïétique	276
■ 2 Le compartiment cellulaire hématopoïétique	276
▪ 2.1 Les cellules souches hématopoïétiques (CSH ou CFU-S)	276
▪ 2.2 Les cellules progénitrices	277
▪ 2.3 Les cellules en cours de maturation	278
■ 3 Contrôle de l'hématopoïèse	280
▪ 3.1 Facteurs activateurs hématopoïétiques	281
▪ 3.2 Facteurs inhibiteurs	283

Chapitre 24 Les tissus lymphoïdes secondaires (ou périphériques)

■ 1 Organes lymphoïdes encapsulés	284
▪ 1.1 Les ganglions lymphatiques	284
▪ 1.2 La rate	287
■ 2 Tissus lymphoïdes diffus associés aux muqueuses	288

Chapitre 25

La réponse immunitaire

- 1 Acquisition des immunocompétences lymphocytaires 289
- 2 Les lymphocytes B et leur rôle dans l'immunité humorale 290
- 3 Les lymphocytes T et leur rôle dans l'immunité cellulaire 291
 - 3.1 Différenciation de deux sous-populations de lymphocytes T, T4 et T8 291
 - 3.2 Le thymus, site de la maturation des lymphocytes T 292
 - 3.3 Activation des lymphocytes T4 292
 - 3.4 Activation des lymphocytes T8 293
- 4 Les lymphocytes NK et leur rôle cytotoxique 293

Questions à choix multiples 295

Index 313

Abréviations

Ach	Acétylcholine
Ad	Adrénaline
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i> (ou cardionatine)
APAAP	<i>Alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase</i>
ATP	Adénosine tri phosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
BFU	<i>Burst forming-unit</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFU	<i>Colony forming-unit</i>
CFU-B	<i>Basophile colony forming-unit</i>
CFU-Eo	<i>Eosinophile colony forming-unit</i>
CFU-GEMM	<i>Granulocyte, erythrocyte, monocyte, megacaryocyte colony forming-unit</i>
CFU-GM	<i>Granulocyte, monocyte colony forming-unit</i>
CFU-L	<i>Lymphocyte colony forming-unit</i>
CFU-M	<i>Macrophage colony forming-unit</i>
CFU-S	<i>Spleen colony forming-unit</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigènes
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
DAB	Diaminobenzidine
DAPC	<i>Dystrophin-associated protein complex</i>
DMC	Dystrophie musculaire congénitale
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECP	<i>Eosinophile cationic protein</i>
EPO	Érythropoïétine
FACIT	<i>Fibril associated collagen with interrupted triple helix</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAGs	Glycosaminoglycannes
GFAP	<i>Glial fibrillary acid protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte, monocyte-colony stimulating factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HES	Hématéine-éosine-safran
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IDM	Infarctus du myocarde
Ig	Immunoglobuline
IGF	<i>Insulin growth factor</i>

Ihh	<i>Indian hedgehog</i>
IL	Interleukine
ITV	Complexe intégrine-taline-vinculine
LCR	Liquide céphalorachidien (ou cérébrospinal)
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
MAG	<i>Myelin associated glycoprotein</i>
MALT	<i>Mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>
MBP	<i>Myelin basic protein</i> (et <i>Major basic protein</i>)
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MET	Microscopie électronique à transmission
MGG	May-Grunwald-Giemsa
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MLC-K	<i>Myosin light chain-kinase</i>
MLC-P	<i>Myosin light chain-phosphatase</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT	Nitro bleu de tétrazolium
NF	Neurofilament
NFS	Numération/Formule sanguine
NK	<i>Natural killer</i> (Lymphocyte)
NSE	<i>Neuron specific enolase</i>
ODF	<i>Osteoclast differentiating factor</i>
OPG	Ostéoprotégérine
PAF	<i>Platelet activator factor</i>
PAP	<i>Peroxidase anti-peroxidase</i>
PAS	<i>Periodic acid-Schiff</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoérythrine
PGs	Protéoglycannes
Pi	Phosphore inorganique
PLP	<i>Proteolipid protein</i>
PMP	<i>Peripheral myelin protein</i>
Ps	Pouvoir séparateur
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>
PTHrp	<i>Parathyroid hormone-related peptide</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
REG/RER	Réticulum endoplasmique granulaire (ou rugueux)
REL	Réticulum endoplasmique lisse
SED	Syndrome d'Ehlers-Danlos
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMPs	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF	<i>Tumor necrotic factor</i>
TPO	Thrombopoïétine
TRITC	Isothiocyanate de tétra-méthylrhodamine
UCPI	<i>Uncoupling protein 1</i> (ou thermogénine)
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

Introduction générale

Il semble admis que R. Hooke fut le premier, lors d'une communication à la Société Royale de Londres en 1667, à rapporter l'existence de cellules à partir de ses observations effectuées sur une lamelle de liège à l'aide d'un microscope. Quelques années plus tard, Leeuwenhoek fut celui qui perfectionna l'instrumentation scientifique permettant d'aborder un monde jusqu'alors inconnu à l'homme en raison de sa petitesse. Les microscopes construits par Leeuwenhoek furent rapidement à l'origine d'un foisonnement d'observations mais qui restèrent longtemps dépourvues d'interprétations. Il faudra attendre la première moitié du XIX^e siècle, pour que s'impose progressivement, les développements rapides des instruments microscopiques aidant, l'idée de la nature cellulaire des tissus animaux et végétaux et qu'émerge la théorie cellulaire que formulera T.H. Schwann en 1839, la cellule représentant l'unité de la matière vivante. En France, cette théorie ne pénétrera dans l'enseignement médical qu'en 1879 et n'y sera officiellement reconnue qu'en 1902 avec sa pleine intégration dans les programmes de la propédeutique des études médicales... Si la réalité cellulaire ne fut acceptée qu'après bien des débats et qu'elle se traduit par la naissance d'une discipline particulière, la cytologie, en revanche, le concept de tissus comme constituants du vivant s'imposa relativement facilement et dès 1822 le terme d'histologie était donné à l'étude de ces derniers.

Les organismes vivants, telles des poupées russes, comportent un emboîtement de niveaux structuraux auxquels se trouvent rattachées des fonctionnalités spécifiques. Ainsi, s'observe une échelle croissante de complexité résultant de processus progressifs de coopération entre les divers éléments constitutifs du vivant et débouchant sur des niveaux différents d'intégrations morphofonctionnelles au sein de l'organisme : à partir de l'étage moléculaire, se mettent en place hiérarchiquement les niveaux des organites cellulaires, puis des cellules, des tissus et des organes, et enfin des appareils ou des systèmes. Le bon fonctionnement de l'organisme est intimement inféodé à celui de l'intégrité de chacun de ses niveaux d'organisation et à leur pouvoir de coopération entre eux. À chacun de ces niveaux se trouvent rattachées des disciplines consacrées à son étude sur les plans descriptif et/ou fonctionnel, l'approche morphologique de base pouvant être enrichie d'une dimension physiologique et moléculaire. Ainsi, l'histologie aujourd'hui a dépassé le fait de n'être qu'une stricte approche descriptive des tissus et des cellules au niveau structural puis ultrastructural à partir des années soixante, en s'appropriant une dimension moléculaire par suite de l'utilisation conjointe de techniques microscopiques variées et d'outils méthodologiques permettant des détections moléculaires *in situ*.

Un organe donné comporte généralement une association d'éléments tissulaires et cellulaires de natures différentes et pouvant ne pas avoir les mêmes origines embryonnaires. L'agencement harmonieux de ces différents éléments constitutifs est

l'une des conditions nécessaires pour que soit assurée la fonctionnalité de l'organe considéré. C'est le cas par exemple de l'intestin dont la paroi est constituée par une association de cellules d'origine endodermique (cellules épithéliales bordant la lumière intestinale), mésodermique (cellules du stroma conjonctif sur lequel repose la couche épithéliale et cellules musculaires lisses ayant pour origine la splanchnopleure), neuroectodermique (cellules des microganglions parasympathiques). On constate que c'est à l'échelon tissulaire que se manifestent les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'organe considéré par la présence de cellules spécifiques différenciées et dont seule l'histologie dans ses approches multiples peut rendre compte.

Classiquement, quatre grandes familles de tissus, qualifiés parfois de primaires, sont distinguées dans tout organisme : les tissus épithéliaux, conjonctifs, musculaires et nerveux. À celles-ci, s'ajoute une catégorie plus difficile à cerner qui regroupe des communautés de cellules éparses au sein de l'organisme (cellules en migration, cellules en suspension dans des liquides biologiques). La plupart de ces catégories tissulaires ont pour point commun d'être formées de deux compartiments baignant dans un liquide interstitiel, l'un cellulaire et l'autre, extracellulaire (la matrice extracellulaire). Un tissu est par conséquent caractérisé par la nature de ses cellules, la composition moléculaire de sa matrice, et par la proportion relative de ses compartiments cellulaire et matriciel.

Le but de l'histologie est de rendre intelligible l'observation de la diversité cellulaire, d'en comprendre sa logique et de l'intégrer dans des agencements tissulaires permettant d'explicitier la fonctionnalité de ces derniers. Aussi l'histologie constitue-t-elle une base fondamentale de l'anatomo-pathologie, en autorisant une approche diagnostique de pathologies, si celles-ci s'expriment ou se reflètent à l'échelle tissulaire.



Partie I

**Les techniques
d'études histologiques**

L'histologie est une discipline qui a pour finalité d'étudier les tissus et qui se confond bien souvent avec celle consacrée à l'étude des cellules, la cytologie.

Compte tenu de la dimension des objets à étudier, les premières approches méthodologiques se sont faites à travers l'utilisation et le développement de l'instrumentation microscopique, optique puis électronique, ce qui a permis de réaliser et d'affiner les descriptions morphologiques cellulaires et tissulaires, tant à l'échelle structurale qu'ultrastructurale. Durant ces cinquante dernières années, l'étude des tissus a pu bénéficier d'approches méthodologiques complémentaires et être enrichie par des apports issus d'autres disciplines (biochimie, immunologie, biologie moléculaire) ou de technologies nouvelles (imagerie, informatique). Ainsi à partir d'une approche se limitant à évaluer l'état statique des cellules et des tissus qu'offre l'observation de leur morphologie, l'utilisation conjointe de la microscopie et de méthodologies issues de disciplines nouvelles a permis l'accès à une facette dynamique des structures cellulaires et tissulaires et de rendre compte des liens entre structure et fonction à ces différents niveaux d'organisation du vivant.

Les approches microscopiques

1

Plan

- 1 Principes de l'analyse microscopique : limite de résolution et pouvoir séparateur
- 2 La microscopie optique
- 3 La microscopie électronique

Objectifs

- Comprendre comment la microscopie permet d'accéder aux différents niveaux d'organisation cellulaire et tissulaire.
- Saisir l'importance de la préparation des échantillons biologiques et du choix des méthodes à utiliser selon le but recherché.

L'œil humain en tant que système optique est inapte à appréhender directement le monde de l'« infiniment petit ». Depuis la fin du xvii^e siècle, s'est imposé le fait d'avoir recours à l'instrumentation microscopique pour accéder à la connaissance structurale, et pour partie fonctionnelle, des cellules et des tissus, inaccessible par la seule vision humaine.

Les microscopes sont classés selon la nature de la source qui sert à observer la préparation biologique. La microscopie optique (ou photonique) a comme source d'éclairement la lumière, tant dans le spectre du visible (microscopie à transmission standard, microscopie à contraste de phase) que dans celui des rayonnements UV (microscopie à fluorescence dont la microscopie confocale)*. La microscopie électronique, comme son nom l'indique, utilise un faisceau d'électrons pour observer les préparations.

À noter

* La technologie microscopique a fait l'objet de nombreux développements, que ce soit en microscopie photonique (microscopes polarisant, à fond noir, biphotonique...) ou en méthodologies utilisant des sources autres que lumineuses (microscopes à force atomique, à effet tunnel, à rayons X), mais tous ne sont pas applicables aux matériels biologiques et seuls ceux cités précédemment pour la microscopie optique et électronique font l'objet d'une utilisation de routine en biologie.

L'histologie repose sur deux constats méthodologiques : le choix du type de microscope utilisé en fonction du but recherché et le mode de préparation de l'échantillon biologique le rendant apte à être observé et analysé à l'échelle microscopique.

■ 1 Principes de l'analyse microscopique : limite de résolution et pouvoir séparateur

I 1.1 Microscopie optique

On désigne sous le terme de limite de résolution « l », la plus petite distance entre deux points observés avec un système optique (œil humain, microscope) au-delà de laquelle les deux points paraissent confondus.

Le pouvoir séparateur « P_s » d'un système optique donné correspond à l'inverse de la limite de résolution atteignable avec ce système, c'est-à-dire que $P_s = 1/l$. Par conséquent, plus la limite de résolution est faible, plus le pouvoir séparateur du système optique est élevé.

Cette distance « l » est fonction de divers paramètres et s'exprime par la formule :

$$l = 0,6 \lambda / n \sin \alpha$$

où λ est la longueur d'onde de la radiation émise par la source d'éclairage, n l'indice de réfraction du milieu dans lequel est placé l'échantillon et α l'angle incident sous lequel est frappée la préparation par le flux éclairant.

La limite de résolution théorique de l'œil humain étant de l'ordre de 0,2 mm, l'utilisation de systèmes optiques artificiels sous la forme de microscopes s'est donc avérée indispensable pour avoir accès à une vision de détails non accessibles à l'œil humain (**figure 1.1**).

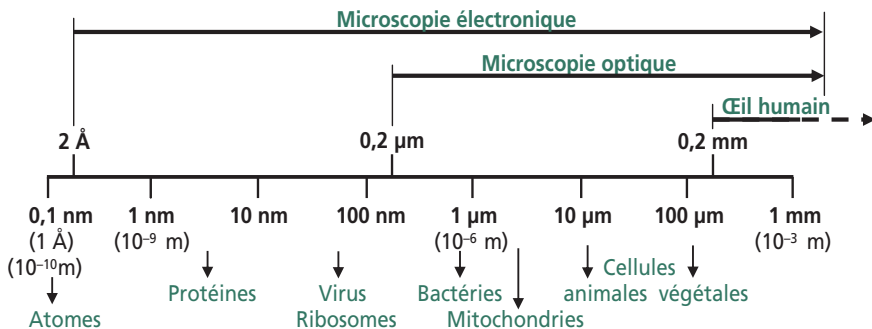


Figure 1.1 Limites de résolution des systèmes optiques et échelle logarithmique des tailles des objets biologiques.

Dans le but d'améliorer le pouvoir séparateur des instruments optiques, c'est-à-dire d'accéder à une limite de résolution la plus faible possible, on recherche l'optimisation des facteurs impliqués dans la formule donnée précédemment. Compte tenu des limites imposées par la technologie, les préparations peuvent être observées avec :

- λ la plus faible possible (approche limitée en microscopie optique standard car nécessitant des optiques en quartz onéreuses, optiques qui sont cependant utilisées en microscopie à fluorescence où les sources lumineuses sont des radiations UV monochromatiques de faible longueur d'onde (voir § 2.3.3) ;
- une augmentation des valeurs de n ou de α . L'instrumentation permet difficilement de dépasser la valeur de 70° pour α , ce qui donnerait si cela était, un avantage insignifiant puisque $\sin 70^\circ = 0,94$, la valeur maximale du sinus d'un angle α étant égale à 1. Le pouvoir séparateur peut par contre être amélioré en augmentant l'indice de réfraction n . Ceci est réalisé en interposant un milieu liquide réfringent entre l'objet et la face frontale d'un objectif dit à immersion (huile de cèdre par exemple avec $n = 1,55$, l'eau ayant $n = 1,33$ et l'air $n = 1$).

La limite de résolution théorique établie pour la microscopie optique est de $0,2\mu\text{m}$, c'est-à-dire que l'instrumentation de la microscopie optique a permis de multiplier par un facteur 1 000 le pouvoir séparateur de l'œil humain (**figure 1.1**).

I 1.2 Microscopie électronique

Dans la microscopie électronique, les rayons lumineux utilisés en microscopie optique sont remplacés par un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons. Les électrons se déplacent à grande vitesse dans le vide et leur trajectoire est canalisée par un jeu de lentilles électromagnétiques.

L'énergie cinétique de l'électron est donnée par la tension V_{AB} qui est appliquée aux bornes du canon à électrons, avec $eV_{AB} = \frac{1}{2}mv^2$, où e est la charge de l'électron et m sa masse. Par cette formule, sa vitesse v est égale à :

$$v = \sqrt{2eV_{AB}/m}$$

Ainsi, la vitesse des électrons est d'autant plus grande que la tension électrique appliquée aux bornes du canon à électrons est élevée.

Le rayonnement électronique ayant une double nature ondulatoire et corpusculaire, à un électron animé d'une vitesse v , est associée une onde pilote dont la longueur d'onde λ est donnée par la formule $\lambda = h/mv$, où h est la constante de Planck. En remplaçant dans la formule v par sa valeur littérale citée ci-dessus et les constantes h , m et e par leur valeur numérique, on obtient

$$\lambda \approx 12,25/\sqrt{V_{AB}}$$

qui montre que la longueur d'onde associée au déplacement des électrons est inversement proportionnelle à la racine carrée de la tension appliquée aux bornes de la source du rayonnement.

Or, la formule établie pour la microscopie optique permettant de connaître la limite de résolution « l » reste valable, avec l'indice de réfraction n qui n'intervient pas, les électrons se déplaçant dans le vide. D'où « l » = $0,6\lambda/\sin \alpha$. Il en découle que plus la vitesse des électrons est grande en raison d'une tension élevée appliquée aux bornes du canon à électrons*, plus la longueur d'onde associée au déplacement des électrons est faible, et plus la limite de résolution est faible c'est-à-dire que le pouvoir séparateur obtenu est important.

La limite de résolution théorique calculée pour la microscopie électronique à transmission est de 2 Å, c'est-à-dire que le Ps d'un microscope électronique est 1 000 fois grand que celui d'un microscope optique.

À noter

* Des microscopes électroniques à très haut voltage ont un pouvoir séparateur élevé et permettent, de surcroît, de pouvoir examiner des coupes relativement épaisses (de 1 à 5 μm), ce qui autorise des approches ultrastructurales tridimensionnelles qui ne sont pas possibles avec l'utilisation de microscopes électroniques classiques à tension moins élevée en raison du faible pouvoir de pénétration des électrons en général.

■ 2 La microscopie optique

I 2.1 Préparation d'échantillons tissulaires

Elle consiste à pouvoir examiner des tissus ou des cellules isolées de telle façon qu'à l'observation l'échantillon biologique soit dans un état le plus proche possible de ce qu'il est à l'état vivant et puisse révéler un certain nombre de ses caractéristiques morphologiques inaccessibles à l'œil humain ou dévoiler la présence de ses constituants par leur nature biochimique et/ou fonctions biologiques. Cinq temps de préparation des échantillons sont classiquement distingués : fixation, inclusion, coupe, coloration, montage.

2.1.1 La fixation

La fixation est une étape essentielle en histologie et le choix du fixateur ainsi que la détermination des conditions de son action constituent des préalables indispensables pour mener à bien une étude histologique à des fins d'analyses morphologiques, histochimiques ou immunocytologiques. Une mauvaise appréciation de ces paramètres expérimentaux est susceptible d'engendrer des aspects cytologiques artificiels désignés sous le terme d'artefacts.

Fixations standard

Il est nécessaire que le liquide de fixation pénètre rapidement dans l'échantillon et se répartisse de manière homogène à l'intérieur de celui-ci. Aussi la pièce à fixer doit-elle être de petite taille, de manière à ne pas créer un effet de gradient de bonne fixation, décroissant depuis la zone superficielle vers le centre de l'échantillon. Les facteurs temps de fixation d'une part, et température à laquelle s'effectue le traitement d'autre part, sont des variables qui nécessitent d'être déterminées pour chaque type de tissus à traiter. Parmi les fixateurs couramment utilisés on retiendra le paraformaldéhyde, le formol, le mélange formol/acide picrique/acide acétique (liquide de Bouin), le mélange alcool absolu/acide acétique (liquide de Carnoy). Le choix du fixateur est conditionné par le but de l'étude à mener. Ainsi :

- Le liquide de Bouin est, par ses propriétés d'autofluorescence, incompatible avec des approches microscopiques à fluorescence. De plus, comme le formol, s'il permet une bonne préservation des structures, il peut entraîner des dénaturations des protéines et masquer des sites antigéniques.
- Le méthanol peut engendrer des rétractions des structures cellulaires mais permettre une bonne conservation des éléments cytosquelettiques. Des altérations morphologiques peuvent également se produire avec l'acétone qui par ailleurs favorise la sauvegarde de l'antigénicité des constituants cellulaires.

Cas de fixation *in situ* de pièces anatomiques

Utilisant les voies de la circulation sanguine, il est possible de perfuser un organe en place avec un liquide de fixation après avoir effectué au préalable une pré-perfusion avec un liquide de lavage tamponné afin d'éliminer le sang contenu dans les vaisseaux. L'organe peut, après prélèvement, subir un second temps de fixation de durée variable selon sa nature et l'objectif de l'étude à mener.

Cas de fixation par congélation

Il est possible de fixer un échantillon biologique par un refroidissement instantané en le plongeant dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide, en présence d'un cryoprotecteur (glycérol, sucrose ou DMSO, par exemple) pour éviter que ne se forment des cristaux de glace à partir de l'eau contenue dans les cellules qui pourraient être à l'origine de lésions mécaniques, tant au niveau cellulaire que tissulaire. L'échantillon congelé est ensuite maintenu à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à son utilisation ultérieure. La congélation est particulièrement bien adaptée pour permettre une bonne préservation des propriétés antigéniques et/ou activités enzymatiques de certains constituants cellulaires ou le maintien en place d'éléments cellulaires de nature lipidique.

2.1.2 L'inclusion

Même fixé, l'échantillon reste peu susceptible de pouvoir être coupé en tranches suffisamment fines pour permettre à la lumière éclairant l'échantillon de pouvoir le traverser. Il est nécessaire de rigidifier les structures tissulaires pour réaliser des conditions permettant de faire des coupes fines. L'image classique qui permet d'illustrer et de justifier cette étape est la différence d'épaisseur des coupes d'un morceau de beurre que l'on peut faire lorsqu'il sort durci d'un réfrigérateur ou s'il est resté à la température de la pièce. La bonne qualité des coupes qui sont réalisées dépend directement de celle de l'inclusion, celle-ci constituant une étape critique dans la préparation des échantillons histologiques.

La stratégie de l'étape d'inclusion consiste dans le remplacement, molécules à molécules, de l'eau présente dans les tissus par un constituant solide à température ambiante, entraînant ainsi la rigidité de l'échantillon biologique. En routine histologique, c'est la paraffine qui est utilisée. Liquide à $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, elle se solidifie à température ambiante. Cependant, le fait de sa non-miscibilité avec l'eau oblige à procéder à une étape préalable de déshydratation des tissus et à utiliser un solvant intermédiaire permettant

l'imprégnation de l'échantillon avec la paraffine. La déshydratation est réalisée par des bains d'alcool (éthanol) de concentration croissante (70°, 95° et 100°). La paraffine n'étant pas miscible avec l'alcool, des solvants intermédiaires comme le toluène ou le xylène, miscibles à la fois avec l'alcool et la paraffine, ont longtemps été utilisés. Cependant, en raison de leur toxicité, ils peuvent être remplacés par du butanol. À des bains dans ces solvants utilisés d'abord purs, succèdent des bains en étuve à 56 °C, avec un mélange solvant/paraffine puis en paraffine seule.

Une inclusion finale est ensuite effectuée où l'échantillon biologique est englobé dans un bloc rigide de paraffine de forme parallélépipédique constitué à l'aide de barres de Leuckart.

D'autres milieux d'inclusion sont parfois utilisés en fonction du type d'étude envisagé. C'est le cas de la gélose pour l'imprégnation et l'enrobage de petites pièces tissulaires ou des résines époxy permettant de réaliser des coupes semi-fines observables en microscopie optique (voir ci-dessous § 3.1.2).

2.1.3 Coupe

Un microtome est utilisé pour obtenir des coupes de l'échantillon suffisamment minces, d'une épaisseur de l'ordre de 4 à 8 µm, pour permettre leur traversée par un rayon lumineux et donc leur observation en microscopie optique à transmission. Le bloc de paraffine est taillé selon une forme pyramidale. Il est soumis à une avancée horizontale vers la lame d'un couteau combinée à un mouvement de va-et-vient vertical, ce qui conduit à la formation d'un ruban constitué de coupes de forme trapézoïdale, accolées les unes aux autres, et contenant l'échantillon biologique entouré de paraffine. Les coupes successives d'un même ruban sont qualifiées de séries et leur observation, en respectant l'ordre dans lequel elles se trouvent, autorise une approche structurale 3D de l'échantillon étudié.

Les rubans de coupes sont disposés à plat sur des lames de verre sur lesquelles a été étalée une goutte d'eau contenant de l'albumine glycérolisée, afin qu'en contact avec cette solution aqueuse les coupes puissent se déplisser correctement. Les lames sont posées sur une platine chauffante, ce qui permet l'évaporation du liquide présent sous les coupes, puis elles sont mises pour leur séchage complet dans une étuve à 37 °C pendant au moins 24 heures. Les principales étapes citées ci-dessus sont récapitulées dans la **figure 1.2**.

Pour des échantillons congelés, les coupes sont réalisées à l'aide d'un cryomicrotome sous une température de -20 °C. Les coupes dites à congélation, d'une épaisseur souvent légèrement supérieure à celles des coupes en paraffine (6 à 10 µm), sont prélevées individuellement à l'aide d'un pinceau au niveau de la lame du couteau et disposées directement sur des lames de verre. Les préparations ainsi obtenues sont habituellement séchées à l'air, à température ambiante.

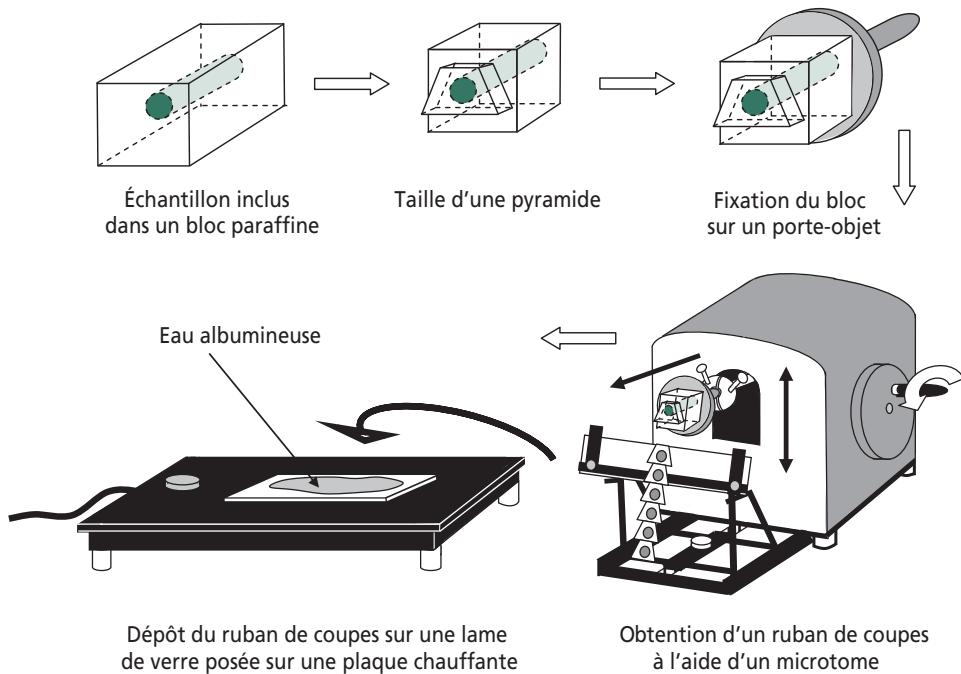


Figure 1.2 Préparation des coupes histologiques en paraffine.

2.1.4 Coloration

L'observation des coupes, directement après leur confection, ne permet pas d'accéder à la connaissance des diverses caractéristiques des échantillons biologiques. La microscopie optique standard à transmission rend nécessaire le renforcement de contrastes au sein de l'échantillon biologique en utilisant certaines des propriétés biochimiques de ses constituants et/ou différentes structures. En jouant sur leurs affinités sélectives vis-à-vis de substances colorantes, il est possible de différencier spécifiquement par leur coloration, certains éléments structuraux et/ou fonctionnels présents au niveau cellulaire. Ainsi, des colorants basiques en se fixant sur des constituants acides permettront la détection de ces derniers au sein de l'échantillon analysé.

Les colorants usuellement utilisés sont sous une forme aqueuse et, la paraffine imprégnant les coupes étant hydrophobe, il est donc nécessaire de procéder à un déparaffinage et à une réhydratation des préparations avant d'entamer leur coloration. Le protocole suivi est inverse de celui qui est utilisé pour l'inclusion. Les préparations sur lame sont déparaffinées en présence du solvant employé dans l'étape d'inclusion (toluène, xylène ou butanol) puis réhydratées par une succession de bains en alcool de degré décroissant (éthanol 100, 95, 70) qui précède des bains finaux en eau distillée.

Parmi les très nombreux colorants classiquement utilisés à des fins d'analyses tissulaires topographiques, certaines approches relevant de l'histochimie étant évoquées ailleurs (**Chapitre 2, § 1**), peuvent être cités :

- l'hématéine-éosine (ou hémalum-éosine ou HE) utilisé en routine histopathologique. L'hématéine est un colorant basique qui colore les noyaux en bleu noir en raison de la présence des acides nucléiques ; l'éosine, colorant acide, colore en rose les structures basiques cytoplasmiques et extracellulaires ;
- l'hématéine-éosine-safran (ou HES), également utilisé en routine en histopathologie. En plus des colorations citées précédemment, les fibres de collagène apparaissent colorées en jaune ;
- le May-Grunwald-Giemsa (ou MGG) utilisé préférentiellement pour l'étude d'échantillons sanguins sur frottis ou sur apposition d'organes hématopoïétiques ;
- le bleu de toluidine, colorant basique permettant de révéler la basophilie de certains constituants cellulaires et par conséquent leur acidité. Ce colorant est souvent employé pour la coloration de coupes semi-fines ;
- le trichrome de Masson et l'azan (association d'azocarmin et d'aniline) qui colorent tous les deux les noyaux en rouge mais aussi les fibres de collagène de type I, respectivement en vert émeraude et en bleu ;
- l'orcéine qui colore en brun les fibres élastiques.

2.1.5 Montage

Afin de protéger les échantillons lors des manipulations dues aux observations microscopiques et de pouvoir les conserver dans le temps, il est procédé à une dernière étape qui consiste à mettre la préparation entre lame et lamelle de verre. Ce montage utilise un produit dont l'indice de réfraction est proche ou légèrement supérieur à celui du verre et qui, en séchant, assure l'adhérence de la lamelle sur l'échantillon et la lame. Certaines résines de synthèse sont utilisées à cette fin, mais c'est le baume du Canada qui est le plus couramment employé. Ce dernier est hydrophobe, mais soluble dans le xylène, ce qui implique qu'une nouvelle fois il est nécessaire de réaliser une déshydratation des échantillons avec une batterie de bains d'alcool à degré croissant suivi d'un bain de xylène. Une lamelle portant sur sa face inférieure une goutte de baume est déposée sur la préparation et par de légères pressions sur cette lamelle, les bulles d'air qui pourraient exister entre l'échantillon et la lamelle sont chassées. Les lames sont ensuite mises en étuve à 37 °C pendant 24 heures afin d'assurer le séchage du baume.

2.2 Préparation de populations cellulaires isolées

Les étapes précédemment décrites pour l'obtention de coupes histologiques à partir d'échantillons tissulaires sont conservées, à l'exception évidemment de celles concernant l'inclusion et la microtomie.

À partir d'une suspension de cellules isolées, des préparations histologiques peuvent être faites en réalisant :

- soit des frottis (cas des frottis sanguins effectués par un déplacement rapide d'une lamelle de verre sur la lame sur laquelle a été déposée une goutte de sang) ;
- soit des projections de cellules sur une lame en utilisant une cytocentrifugeuse.

Il est également possible d'obtenir des préparations cellulaires sous la forme d'empreintes en procédant à une apposition de certains tissus facilement dissociables sur une lame histologique.

Un séchage à l'air de la préparation, suivi ou non d'une fixation classique (avec du méthanol par exemple), précède le temps de coloration qui ne nécessite pas une réhydratation préalable. Des colorants tels le MGG (employé en routine pour les frottis sanguins) ou le bleu de toluidine sont fréquemment utilisés. L'étape du montage entre lame et lamelle répond aux mêmes règles que celles décrites à propos des coupes histologiques.

I 2.3 Les microscopes photoniques

Tous les microscopes de ce type ont pour caractéristique commune d'éclairer et de traverser par un rayon lumineux l'échantillon à observer. Trois types principaux de microscopes ont été développés, basés sur la manière avec laquelle les constituants moléculaires de la préparation réagissent au flux lumineux qui les atteint : les microscopes en lumière directe (où certaines longueurs d'onde lumineuse sont absorbées et sont à l'origine de colorations), les microscopes à contraste de phase (où des déphasages sont créés au sein des rayons lumineux), les microscopes à fluorescence (avec émission d'une lumière ayant une longueur d'onde différente de celle provenant de la source lumineuse).

2.3.1 Microscopie standard (en lumière directe)

Le microscope se compose de trois parties (**figure 1.3**) :

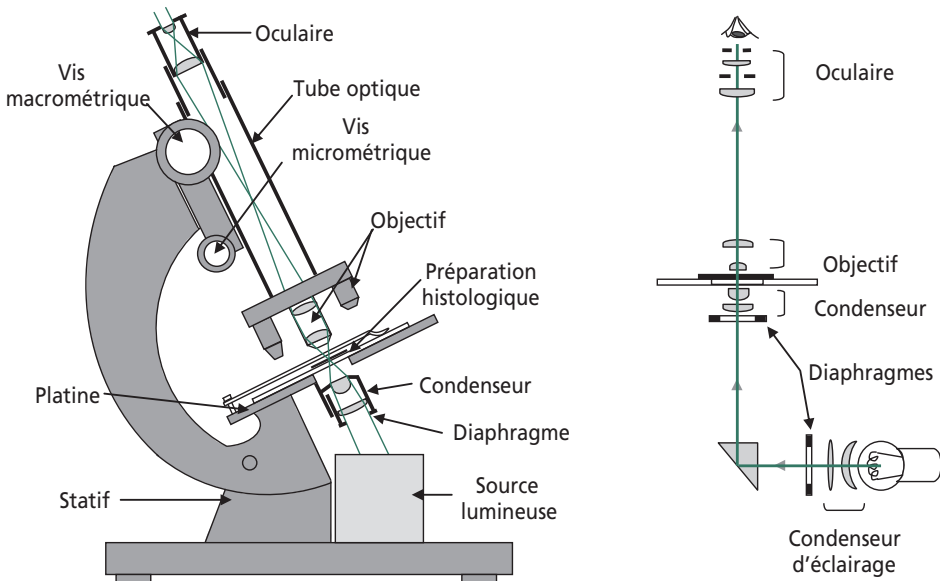


Figure 1.3 Microscopie optique standard.

- un support ou statif auquel sont rattachés la platine, sur laquelle est disposée la préparation maintenue par des valets, et le tube optique, capable d'être déplacé selon un axe perpendiculaire à la platine grâce à des vis macro- et micrométrique afin de permettre une mise au point de l'image ;
- une source lumineuse et des éléments d'optique. Ces derniers comportent d'une part un condenseur placé en amont de la préparation dont le rôle est de focaliser le flux lumineux sur l'échantillon, et d'autre part des objectifs constituant par leurs lentilles un système optique convergent et qui sont classés selon leur pouvoir grossissant ($\times 10$, $\times 20$, $\times 40$ ou $\times 100$) ;
- un oculaire, système également convergent contenant un jeu de lentilles, jouant le rôle d'une loupe.

2.3.2 Microscopie à contraste de phase

La microscopie en contraste de phase permet de rendre visibles des différences d'indice de réfraction au sein d'un échantillon et ainsi mettre en évidence des constituants cytoplasmiques. Son avantage est de pouvoir observer des préparations non colorées ainsi que des cellules vivantes, ces dernières révélant notamment un halo réfringent autour de leur membrane plasmique et qui disparaît lorsque les cellules sont mortes. Le microscope contient un condenseur capable de créer des différences de phase dans les ondes lumineuses. En traversant la préparation et les systèmes optiques, ces différences sont transformées en variations d'amplitudes se traduisant par des intensités lumineuses différentes.

2.3.3 Microscopie à fluorescence

Deux types de microscopes (microscope à fluorescence standard et microscope confocal) utilisent la lumière ultraviolette comme source lumineuse.

Principes d'utilisation de la fluorescence

Comme cela fut évoqué plus haut, dans ce type de microscope, les lentilles du système optique sont en quartz, les lentilles en verre étant opaques aux rayons ultraviolets. De nombreuses molécules ont la propriété d'émettre dans le spectre visible une lumière ayant une longueur d'onde définie dite d'émission quand elles sont frappées par un rayon UV monochromatique d'une longueur d'onde donnée dite d'excitation. L'excitation de la molécule provoquée par l'absorption du rayon UV incident se manifeste par un transfert d'électrons et le retour à l'état fondamental s'accompagne d'une émission lumineuse caractérisée par une longueur d'onde supérieure à celle de la lumière d'excitation. Chaque molécule possède ses propres spectres d'absorption et d'émission. La source lumineuse est généralement une lampe à mercure dont la lumière traverse, en amont de l'échantillon, des filtres spécifiques permettant l'obtention d'une longueur d'onde excitatrice choisie en fonction du type de molécule à détecter. Un système de filtres permet également en aval de l'échantillon, de sélectionner des longueurs d'onde d'émission.

La détection de substances spécifiques peut résulter :

- d'une autofluorescence* (ex : vitamine A, collagène et élastine, NADPH, GFP pour « *green fluorescent protein* » et ses dérivés, lipofuscine**...);
- d'une adjonction d'une substance fluorescente (fluorochrome) possédant une affinité spécifique pour la substance à révéler (ex : DAPI, Hoescht pour l'ADN);
- d'une réaction d'immunolocalisation en utilisant des anticorps marqués avec un fluorochrome (**Chapitre 2, § 3.2.1**).

À noter

* L'emploi d'aldéhydes comme fixateurs peut générer l'apparition de produits fluorescents indésirables notamment à partir de groupements amines. Cependant, à l'exception peut-être de la lipofuscine, la plupart des constituants autofluorescents ne causent pas de problèmes véritables pour l'observation des préparations.

** Les granules de lipofuscine souvent jaunâtres, mais dont la couleur varie en fait selon la longueur d'onde d'excitation, correspondent à des vésicules du type lysosomal dans lesquelles sont accumulés des lipides ayant subi une peroxydation. Leur nombre augmente avec l'âge, notamment dans les cellules musculaires et nerveuses, et dans le cas de certaines pathologies dont les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

Les fluorochromes ont un temps de vie, c'est-à-dire le temps durant lequel ils demeurent sous un état excité, qui est très court (de l'ordre de la nanoseconde). Plus ce temps est court, plus grande est la sensibilité du fluorochrome. Par ailleurs, ils présentent une photostabilité variable correspondant au nombre d'excitations qu'ils peuvent subir avant d'être dégradés. Le photoblanchiment (ou « *photobleaching* ») désigne la destruction irréversible d'un fluorochrome suite à son excitation par la lumière. Cette extinction de la fluorescence a reçu une application pour étudier dans des cellules vivantes le positionnement et le déplacement de molécules. La méthode dite FRAP pour « *fluorescence recovery after photobleaching* » consiste à provoquer l'extinction d'un fluorochrome à l'aide d'un flash lumineux intense et bref, et à suivre, dans la zone illuminée, la réapparition d'une fluorescence due à la diffusion vers la zone photoblanchie de molécules fluorescentes voisines non éteintes par le flash. La vitesse d'une diffusion moléculaire dans le milieu cellulaire peut ainsi être mesurée.

De nouveaux fluorochromes se dégradant lentement ont été développés tels les Alexafluor qui possèdent une photostabilité plus grande que celle de la fluorescéine par exemple. La diminution d'intensité de fluorescence (« *fading* ») qui se produit sans qu'il y ait nécessairement une excitation lumineuse, peut être limitée en jouant sur le choix du milieu de montage de la préparation.

Microscopie confocale

Elle permet d'avoir accès à l'architecture tridimensionnelle d'un l'objet. Elle consiste à pouvoir observer une coupe optique, correspondant à un plan focal choisi au sein d'un échantillon épais, et dans laquelle toutes les lumières parasites provenant des régions qui lui sont extérieures sont éliminées. Une reconstruction 3D de la structure de l'objet est rendue possible en réalisant des coupes focales sériées (ou « *Z série* »), c'est-à-dire

une série de plans de focalisation successifs dans l'épaisseur de l'échantillon dont les images sont saisies et traitées par informatique.

Le microscope confocal possède une source d'éclairage laser (Argon, Krypton/Argon...) et utilise des systèmes optiques adaptés à la fluorescence qui n'illuminent pas la totalité de l'échantillon, mais forment, en traversant un trou en tête d'épingle ou « *pinhole* », un point lumineux qui se concentre dans une zone spécifique dans l'épaisseur de l'objet. La fluorescence émise à partir du point illuminé est concentrée par un second trou en tête d'épingle et est recueillie par un détecteur, cependant que la fluorescence émise par d'autres régions de l'échantillon, hors du point illuminé, ne se trouve pas détectée (**figure 1.4**). Les données issues du balayage du plan de coupe par le point lumineux, permettent d'obtenir sur écran une image 2D de la coupe optique.

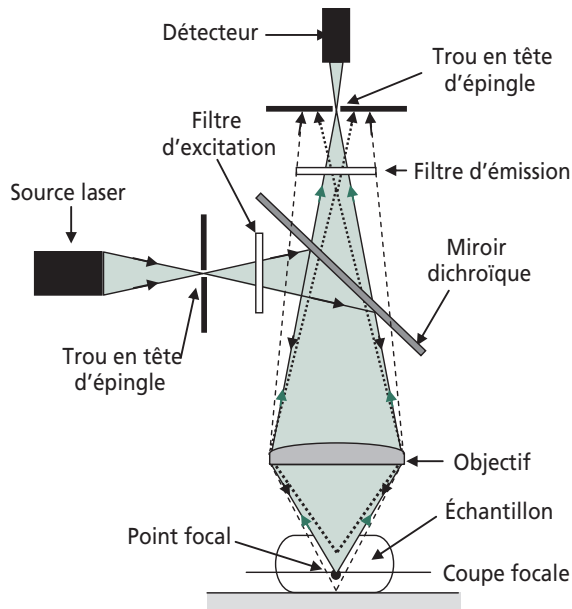


Figure 1.4 Microscopie confocale.

C'est le déplacement du balayage selon un pas donné dans l'épaisseur de l'objet, qui conduit à l'obtention de coupes focales successives autorisant, par leur traitement informatique, l'accès à une reconstruction tridimensionnelle de cet objet. La microscopie confocale permet ainsi l'observation d'échantillons d'une épaisseur d'une centaine de μm obtenus avec un microtome particulier réalisant des coupes épaisses, le vibratome. En utilisant plusieurs traceurs fluorescents dont les spectres d'émission sont suffisamment écartés, il est possible de réaliser des marquages multiples et d'accéder à la distribution tridimensionnelle de constituants cellulaires et/ou tissulaires (exemple de marqueurs pouvant être utilisés à cette fin : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), le Texas Red (TX Red) et la phycoérythrine (PE) émettant respectivement dans le vert, le rouge et le bleu).