

Description de toutes les techniques qui permettent d'observer l'infiniment petit, de la microscopie optique à la microscopie ionique

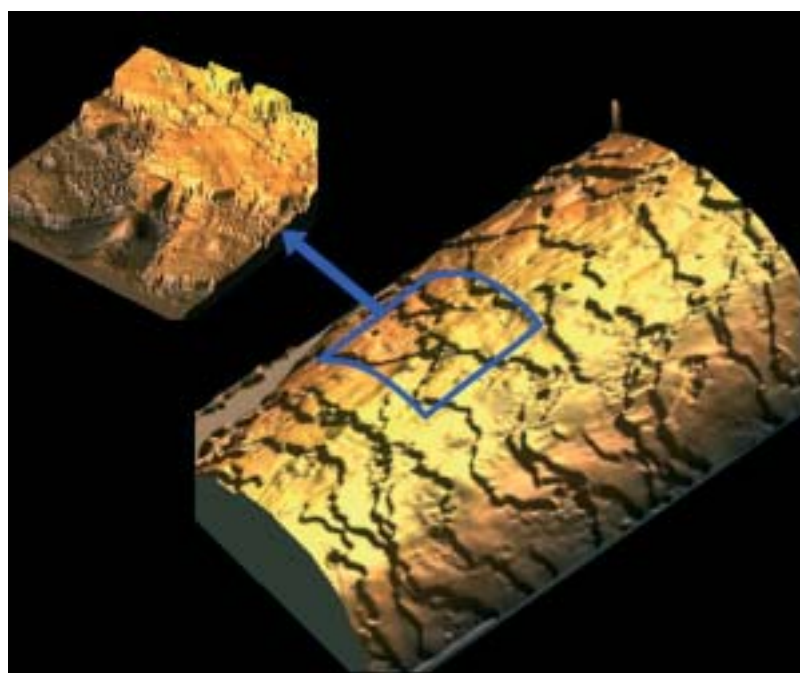
Par Laetitia Becq-Giraudon



# Observer le vivant

Depuis l'apparition de la microscopie optique (ou photonique), au XVII<sup>e</sup> siècle, puis celle de la microscopie électronique en 1933, les techniques de microscopie ne cessent de progresser. «*On sait par exemple aujourd'hui observer des alignements d'atomes dans un cristal*», témoigne Jean-François Barbot, professeur au laboratoire de métallurgie physique (LMP, UMR 6630) de l'Université de Poitiers. Dans les microscopies classiques, une onde interagit avec la préparation : en microscopie optique, l'onde est de nature lumineuse (il lui est associé des photons du domaine visible). En microscopie électronique, des électrons sont employés pour étudier l'objet, ces électrons étant associés à une onde «quantique» de très courte longueur d'onde. Enfin, l'échantillon étudié peut émettre des signaux ce qui permet une microanalyse localisée de l'échantillon – la spectroscopie x particulièrement, associée à la microscopie électronique, permet d'obtenir une image de distribution d'éléments chimiques dans l'échantillon.

Image AFM d'un cheveu (laboratoire LMP).



La microscopie optique, technique la plus ancienne, est encore majoritairement utilisée pour l'étude du vivant, en biologie comme en médecine. La préparation, éclairée par une source lumineuse, peut être visualisée grâce à différents types d'interactions : soit l'absorption de certaines longueurs d'ondes du spectre, c'est la microscopie en lumière directe où l'on observe un contraste de couleurs et d'intensités ; soit la génération d'un déphasage entre différents rayons lumineux, c'est la microscopie en contraste de phase ; soit l'émission de lumière à une longueur d'onde différente de celle de la lumière incidente, c'est la microscopie à fluorescence. Du fait de sa résolution limitée par les longueurs d'onde de la lumière visible, la microscopie optique ne permet pas de visualiser les détails inférieurs à environ 0,2 micromètre.

La dernière grande avancée en ce domaine fut la mise au point de la microscopie confocale : un faisceau laser (une seule longueur d'onde) peut être finement focalisé. Il offre une meilleure résolution spatiale et permet surtout d'exciter des fluorescences très précisément localisées. Le balayage point par point de l'échantillon par le faisceau, associé à une analyse par ordinateur, permet de construire des images de coupes très fines de l'échantillon. Cette technique est de plus en plus utilisée, associée à des marquages par immunofluorescence, pour obtenir des coupes et des reconstructions très fiables de cellules.

C'est en 1933 que l'utilisation des électrons de longueur d'onde beaucoup plus courtes que celles de la lumière visible, a permis la mise au point de microscopes à haute, voire très haute résolution. Après le microscope électronique à transmission (MET), au cours des années 1960, est apparu le microscope électronique à balayage (MEB). Dans le premier, le faisceau d'électrons traverse l'échantillon à analyser (image projetée) qui doit être le plus fin possible ; dans le second, les électrons sont focalisés et balayent point par point la surface de l'objet observé, donnant des

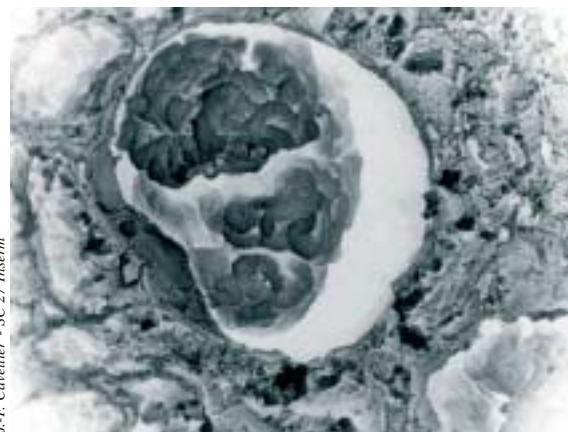
images de sa surface. «*Dans le domaine du vivant, cela a été un nouveau pas dans la connaissance de la structure interne des cellules avec l'observation des ribosomes, des mitochondries ou du réticulum endoplasmique par exemple*», explique Jean-François Cavellier, maître de conférences dans le service de médecine nucléaire du CHU de Poitiers. Cependant, la MET nécessite que l'échantillon biologique soit déshydraté et inclus dans une résine afin de pouvoir être «débité» en coupes très fines, d'environ 0,1 micromètre. En MEB, l'échantillon est aussi observé sous vide ; il est déshydraté sans déformation et recouvert d'un très fin dépôt métallique (souvent de l'or) afin de permettre l'évacuation des charges. «*Mais le principal écueil de ce type de microscopie est de ne pas permettre l'observation d'objets vivants. De plus, en biologie, le faible contraste spontané et la possibilité de nombreux artefacts ne permet généralement pas l'analyse de détails inférieurs à quelques Ångströms, sauf à utiliser des techniques de préparation très délicates applicables seulement à certains types d'échantillons. Par contre, dans les deux techniques de microscopie électronique, on peut tirer partie de l'interaction entre les électrons du faisceau et l'échantillon en analysant le spectre du rayonnement X émis par l'échantillon. On réalise une microsonde électronique, en équipant la colonne d'un microscope électronique d'un spectroscope X en regard de l'échantillon, ce qui permet de réaliser une "microanalyse" localisée des inclusions de cet échantillon.*» Lorsque l'inclusion analysée est micro-cristalline, on peut également faire diffracter le faisceau électronique par ce microcristal, ce qui permet de déterminer sa structure cristalline.

Une autre microscopie analytique a été développée à partir de 1962 : la microscopie par émission ionique secondaire. Dans cette technique, l'échantillon examiné est progressivement érodé par un faisceau d'ions (atomes électriquement chargés par perte d'électrons). L'échantillon émet alors des ions des différentes espèces atomiques le constituant, et ces ions, recueillis par une optique électromagnétique, sont séparés selon leurs masses, et donc selon leurs espèces chimiques, et fournissent finalement des images de distribution de chaque élément chimique présent dans l'échantillon, avec une résolution de l'ordre du micromètre.

Vers 1982, une autre famille de microscopes dits à champ proche apparaît, engendrant une grande avancée en métallurgie et en cristallographie. Le principe consiste à approcher une pointe extrêmement fine (un atome à la pointe) d'un échantillon.

En microscopie à effet tunnel, la différence de potentiel appliquée entre la pointe et l'échantillon induit un courant électrique, conséquence directe de la mécanique quantique. L'intensité de ce courant dépend de la distance entre la pointe et l'objet observé.

En microscopie à force atomique, c'est l'attraction ou la répulsion entre la pointe et l'échantillon qui permet de déterminer la distance entre les deux objets. La résolution spatiale permet avec des échantillons «durs» de visualiser les atomes. «*Dans le domaine du vivant, le grand intérêt du champ proche est qu'il permet l'observation d'échantillons dans l'eau, donc de biomolécules dans leur état "actif" ou d'organismes vivants tels que des cellules en cultures. Ainsi, grâce à un soutien de la Région Poitou-Charentes, nous avons pu réaliser, au laboratoire de métallurgie physique, des images de bactéries vivantes*», précise Jean-François Cavellier. «*En physique des matériaux, la microscopie à très haute résolution est à la source de progrès immenses particulièrement dans le domaine de l'électronique où l'utilisation de métaux en couches minces permet une miniaturisation des circuits*, note Jean-François Barbot. Au laboratoire, nous modifions et observons l'aspect de la surface des matériaux que nous fabriquons. Nous avons également des contrats ponctuels avec des entreprises spécialisées en aéronautique ou microélectronique.» ■

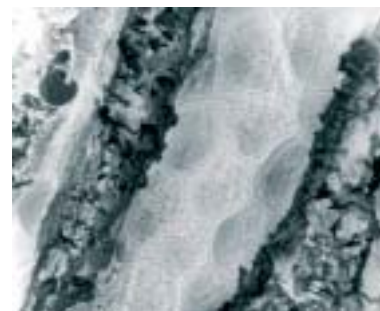


J.-F. Cavellier - SC 27 Inserm

Globule rénal dans la capsule de Bowman : le vaisseau en pelote est entouré de cellules à podocytes à travers lesquelles s'effectue l'ultrafiltration produisant l'urine primaire recueillie dans la capsule.

Ci-dessous : tubule rénal qui conduit l'urine primaire vers les calices rénaux qui débouchent sur la vessie.

«**La Société française de physique a pour but de contribuer au développement et au rayonnement de la physique en France et d'y associer les physiciens du pays**», témoigne Jean-François Barbot, le président de la section du Centre-Ouest. C'est pourquoi, dans le cadre de l'année mondiale de la physique, cent ans après les travaux révolutionnaires d'Einstein et dans l'objectif de faire connaître à un public le plus large possible les progrès, l'importance et les enjeux de la physique, la société présente l'exposition qui se déroule à l'espace Mendès France. Intitulée «**La physique et votre santé**», très interactive, cette exposition développe cinq grands thèmes : les gestes sportifs



(effort, force, sécurité), le coeur et le sang (écoulement sanguin, effet Doppler), la médecine et la radioactivité (médecine nucléaire, radiologie, ultrasons), l'observation de l'infiniment petit (microscopes) et l'homme réparé (robotique, prothèses). Exposition à l'Espace Mendès France jusqu'au 3 juillet.