

## Quelques jalons historiques et sémantiques en imagerie cellulaire

Yaroslav DE KOUCHKOVSKY

Directeur de recherche honoraire au CNRS, campus de Gif-sur-Yvette, France (kouchkovsky@orange.fr)

Sans vouloir faire de rapprochement anachronique avec l'universalité de la « théorie » cellulaire », il est intéressant de rappeler qu'il y a près de 2400 ans, Aristote avait déjà conclu que, malgré leur grande complexité, les animaux et les plantes devaient avoir en commun un nombre réduit d'éléments fondamentaux. Il fallut des siècles pour que cette intuition trouve une confirmation par l'observation détaillée des structures du vivant. Elle fut rendue possible par la fabrication d'outils optiques appropriés, en particulier des premiers microscopes de qualité par Antoni van Leeuwenhoek, un drapier et scientifique amateur hollandais (au départ, c'était pour vérifier la qualité de ses tissus). Ce fut ainsi qu'en 1665-1667, le physicien anglais Robert Hooke observa, sur des coupes de liège, des alvéoles répétées qu'il appela *cellules* par référence aux chambres monacales contiguës. Grâce à ses talents dans la fabrication des lentilles et poussé par sa grande curiosité, van Leeuwenhoek participa largement à ces découvertes initiales. Il décrivit ainsi, à partir de 1674, de multiples microorganismes et les spermatozoïdes.

L'étude des structures biologiques par *microscopie photonique* est limitée par ce qu'on appelle la *constringence*, quantifiée par la formule qu'Ernst Abbe établit en 1873. Elle établit qu'avec les indices de réfraction existants, la résolution directe ne peut être inférieure à 0,2  $\mu\text{m}$ . Mais l'observation cellulaire - en fait, bien plus que la simple observation ! - a fait depuis d'énormes progrès grâce à de nouveaux outils conceptuels et techniques. Il suffit de comparer les appareils modernes aux microscopes de recherche des années 1950 et encore plus aux microscopes verticaux mono-objectif en laiton qui, certes très beaux, trônaient encore dans les salles de travaux pratiques de l'Université de cette époque.

Les bases théoriques et techniques de la microscopie photonique se sont donc diversifiées, avec une explosion de nouveautés depuis le dernier quart du vingtième siècle. Nombre d'entre elles ont été rendues possibles par l'utilisation du rayonnement cohérent (*laser*) et de *sondes moléculaires fluorescentes*, synthétisées chimiquement ou extraites d'organismes biologiques comme la *Green Fluorescent Protein* (GFP) de la méduse *Aequorea victoria* et ses variantes.

Une de ces grandes innovations a été la mise au point de la *microscopie confocale*, commercialisée à partir des années 1980 par application des travaux de Marvin Minsky, à Harvard, publiés en 1953 et brevetées peu après. Son principe conjugue l'emploi de fluorophores, excités par un rayonnement laser, et la mesure de la fluorescence émise passant à travers un diaphragme en « trou d'épingle ». Avec l'aide de l'informatique, ceci permet de n'analyser qu'un plan étroit de l'échantillon, réduisant ainsi le flou des plans adjacents. En multipliant les coupes optiques, on peut reconstituer la structure tridimensionnelle de l'objet (3D) et même l'étudier au cours du temps (4D).

De nombreux autres outils ont été développés au cours de cette période récente. On peut citer ainsi la *microscopie à double photons [excitateurs]*, mise au point à l'Université Cornell en 1990 et dont le principe remonte à la thèse de Maria Goeppert-Mayer en 1930, la *microscopie à feuille* (ou *nappe de lumière*), développée à partir des recherches de Zsigmondy et Siedentopf en Autriche au début du 20<sup>ème</sup> siècle, etc. (voir le glossaire en annexe).

Cependant, même si ces techniques ont permis de contourner en quelque sorte les limites de l'optique photonique, elles finissent par buter sur des principes physiques fondamentaux. Comme dans la plupart des travaux de recherche, c'est donc en faisant appel à une approche radicalement différente que l'on a pu descendre dans l'échelle de résolution spatiale. Il s'agit de la *microscopie électronique*, inventée en 1931 par Max Knoll et Ernst Ruska qui s'appuyaient sur la mécanique ondulatoire développée par Louis de Broglie en 1924. Elle a permis d'aborder des infrastructures beaucoup plus fines, allant même jusqu'au niveau moléculaire nanométrique.

Initialement, le faisceau d'électrons traversait l'échantillon et c'est pourquoi cette microscopie est appelée par *transmission*. Elle fut complétée une trentaine d'années plus tard par l'étude des surfaces (selon les cas, après cryo-décapage ou cryo- fracture). Cette *microscopie électronique à balayage* a été mise au point en 1965 grâce aux travaux de Charles Oatley à Cambridge exploitant le principe des interactions onde-matière développé à Berlin par Max Knoll et Manfred von Ardenne dans les années 1930.

## BREF GLOSSAIRE DE MICROSCOPIE

Présentation par ordre alphabétique, sauf lorsqu'une technique dérive de celle mentionnée en tête ; liste non exhaustive, revue en 2016 avec Jean Salamero, Directeur de recherche au CNRS et Directeur de France-Bioimaging, Institut Curie.

<b>PHOTONIQUE</b>	
<b>Classique</b>	
BFM	Bright Field Microscopy
DFM	Dark Field Microscopy
DIC(M)	Differential Interference Contrast Microscopy (Nomarski)
FL(M)	Fluorescence Microscopy
PCM	Phase Contrast Microscopy
P(L)M	Polarized (Light) Microscopy
	...
<b>Moderne</b>	
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
FE-SEM	Field Emission Scanning Electron Microscopes
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FLIP	Fluorescence Loss In Photobleaching
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
(L)LSM	(Lattice) Light Sheet Microscopy
PRIM	PRoximity IMaging
PALM	Photo-Activated Localization <i>Microscopy</i>
PALM-FIAsh	<i>PALM-Fluorescein Arsenical Helix binder</i>
SIM	Structured Illumination Microscopy
SPM	Scanning Probe Microscopy
NSOM / SNOM	Near-field Scanning / Scanning Near-field Optical Microscopy
TIRF	Total Internal Reflection Microscopy
STED	Stimulated Emission Depletion Microscopy
SPIM	Single Plane Illumination Microscope
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
TPM	Two [excitation] Photon Microscopy
	...
<b>ÉLECTRONIQUE</b>	
(C)TEM	(Conventional) Transmission Electron Microscopy
cryo-EM	Cryogenic electron microscopy
FE-SEM	Field Emission-Scanning Electron Microscopy
FIB-SEM / SBF	Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy / Serial Block Face
REM	Reflection Electron Microscopy
S(R)EM	Scanning (Reflection) Electron Microscopy (FE, FF : Freeze-Etch, Freeze-Fracture)
STEM	Scanning Transmission Electron Microscopy
	...
<b>ATOMIQUE/QUANTIQUE</b>	
AFM	Atomic Force Microscopy
SNOM	Scanning Near-field Optical Microscopy
STM	Scanning Tunneling Microscopy

Cependant, alors que la microscopie optique reste applicable à des objets vivants, les conditions de la microscopie électronique ne l'autorisent pas. De mémoire cependant, le physicien Gaston Dupouy, à Toulouse, imagina dans les années 1960 une chambre isolée préservant les conditions biologiques. Toutefois, l'épaisseur de l'échantillon nécessitait une tension de l'ordre du million de volts et ce fut, apparemment, une tentative sans lendemain.

Plus remarquable est le développement récent de la *cryo-microscopie électronique de transmission (cryo-EM)*. Elle permet une résolution à l'échelle atomique d'éléments biologiques dans un environnement physiologique figé par de l'éthane liquide à -185°C. Cette détermination n'était jusqu'alors accessible que par diffraction des rayons X (travaux, depuis les années 1980, de J. Dubouchet, Suisse, R. Henderson, Écossais, et J. Franck, Germano-américain, prix Nobel 2020).

Enfin, une autre analyse au niveau atomique - mais on sort encore plus du domaine cellulaire - a été rendue possible par l'invention en 1981 du *microscope à effet tunnel* (une propriété quantique) par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer et, en 1985, du *microscope à force atomique* par Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber. Il faudrait leur ajouter les *microscopes optiques à champ proche*, basés sur l'existence d'ondes évanescentes, construits par D. W. Pohl en 1984 d'après les concepts de E. H. Synge de 1928. Dans ces techniques, une pointe (à l'échelle atomique), couplée à un levier, balaye la surface de manière à maintenir constant le champ électrique établi entre les deux et c'est la mesure du mouvement de la pointe qui restitue la surface de l'échantillon.

Une autre technique complémentaire, indirecte mais essentielle, est la *cytométrie en flux* dont le principe a été développé par A. Moldavan en 1934 et dont le premier appareil a été commercialisé

dans les années 1980. Il rend possible l'étude statistique et le tri individuel d'une population complexe d'objets cellulaires et même sub-cellulaires : noyaux, mitochondries, chloroplastes... Dans ces appareils, un flux laminaire dans une veine capillaire liquide entraîne ces objets un à un devant des faisceaux laser convergents et leurs multiples paramètres sont photodétectés (jusqu'à près d'une vingtaine pour les appareils actuels les plus performants contre trois au départ). Récemment le couplage de cette méthode à la microscopie optique individuelle a été tenté.

*Au total*, on dispose maintenant de plus d'une trentaine d'approches méthodologiques résumées dans le glossaire ci-joint. Nombre de ces méthodes ont été des ouvertures conceptuelles et techniques de premier plan et, à ce titre, ont été couronnées par des prix Nobel. La plupart sont basées sur des principes physiques développés des décennies avant d'être concrétisés. Ceci illustre, une fois encore, qu'on ne peut préjuger à court terme de l'« utilité » d'une recherche fondamentale. Réciproquement, celle-ci n'a pu explorer de nouveaux territoires que grâce au foisonnement instrumental rendu possible par les performances industrielles modernes.

### Repères bibliographiques

*Microscopy and Analysis* (revue bimestrielle gratuite, John Wiley & Sons, Ltd, Pub.) [Bien que sponsorisée par les fabricants, elle contient souvent d'intéressants articles généraux de recherche, bien illustrés].

Trugnan G., Fontanges P., Delautier D. & Ait-Slimane T. (2004) *FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM... De nouvelles techniques pour voir la vie en couleurs*. Médecine/Sciences, 20, 1027-1034 [Déjà ancienne, cette revue offre néanmoins une introduction aisée à plusieurs techniques de micro-imagerie].

Ce texte (ponctuellement mis à jour) est paru dans le bulletin de l'Association Française des Chercheurs Séniors, *La Lettre de Chercheurs Toujours* N° 28, septembre 2017, pages 27-30 (périodique consultable ou téléchargeable in extenso sur le site [www.chercheurs-toujours.org](http://www.chercheurs-toujours.org)). En tant qu'article séparé, il peut aussi être téléchargé à l'adresse [www.chercheurs-toujours.org/wp-content/uploads/quelques-jalons-historiques-et-sémantiques-en-imagerie-cellulaire.pdf](http://www.chercheurs-toujours.org/wp-content/uploads/quelques-jalons-historiques-et-sémantiques-en-imagerie-cellulaire.pdf).