

LES TECHNIQUES D'ÉTUDE DES STRUCTURES INFRAMICROSCOPIQUES

I). — L'ULTRA-VIOLET ET LA FLUORESCENCE

Par Ch.-A. BAUD.

(Institut d'Histologie, Faculté de Médecine de Lyon)

Dans les descriptions histologiques, on parle fréquemment de parties « astructurées » (par exemple des membranes ou des fibrilles), ce qui veut dire qu'aucune structure n'y est perceptible au microscope. Mais le pouvoir séparateur de cet instrument est limité par la nature ondulatoire de la lumière, et en réalité de telles parties microscopiquement astructurées sont formées par la réunion de constituants *inframicroscopiques* : micelles et agrégats de molécules.

Les techniques d'étude des structures inframicroscopiques ont pour but de détecter d'une part les formes et les orientations des gros agrégats moléculaires et des micelles, et d'autre part les configurations des molécules elles-mêmes. De nombreux procédés ont été mis au point ; nous leur consacrerons cette série d'exposés, en commençant par ceux qui utilisent le rayonnement ultra-violet.

*
* *

La microphotographie en ultra-violet, qui permet — grâce à la longueur d'onde plus courte — d'obtenir des détails que l'œil ne perçoit pas avec les rayons de grande longueur d'onde auxquels il est sensible, ne peut cependant pas être considérée comme un procédé d'étude des structures inframicroscopiques. L'abaissement de la limite du pouvoir séparateur que l'on produit ainsi (jusque vers 0,1 micron) n'est pas suffisant. Mais deux autres techniques, utilisant aussi l'ultra-violet comme source de rayonnement, ont apporté des résultats intéressants.

I. — LE DICHROÏSME EN ULTRA-VIOLET.

La première technique, celle du « dichroïsme en ultra-violet », est due à T. CASPERSSON (*Chromosoma* ; 1 ; 605-619 ; 1940). Le principe en est le suivant : les substances qui présentent une bande d'absorption dans l'ultra-violet peuvent, si leurs molécules sont orientées régulièrement dans une structure, présenter un dichroïsme, c'est-à-dire une différence d'absorption des rayons ultra-violets polarisés, suivant leur position par rapport à la direction de vibration du rayonnement.

On utilise pour ces observations un microscope à optique de quartz, sous le condensateur duquel on a placé un prisme de spath qui polarise l'ultra-violet. Des photographies sont prises en orientant l'objet dans différentes positions par rapport au plan de vibration du rayonnement.

Les premières expériences furent faites avec des frottis d'acide thymonucléique ; cette substance fut choisie à cause de la forte bande d'absorption qu'elle présente vers 2.600 angströms, et qui est due à la présence de bases puriques ou pyrimidiques dans la molécule, et d'autre part à cause de la tendance que montrent ses molécules à s'orienter parallèlement dans les frottis. Les photographies montrèrent que le rayonnement ultra-violet dont la direction de vibration était parallèle à l'axe des molécules, était plus faiblement absorbé que celui dont la direction était perpendiculaire.

La méthode fut appliquée ensuite à diverses cellules, en particulier aux têtes de spermatozoïdes, qui ont en général une forte teneur en acide thymo-

nucléique; un dichroïsme fut mis en évidence, identique à celui observé dans les frottis; cette méthode permet donc de conclure que les molécules d'acide thymonucléique étaient orientées dans la tête des spermatozoïdes parallèlement à son grand axe, exactement comme dans les frottis.

Ainsi, l'étude du dichroïsme en ultra-violet permet de mettre en évidence l'orientation des molécules (et même des parties de molécules) qui ont une bande d'absorption dans l'ultra-violet, et qui sont régulièrement disposées dans une structure histologique. De telles recherches ont été faites récemment sur la fibre nerveuse (H. LUTHY, *Helv. Physiol. Acta*, 4, (C) 50-51, 1946).

II. — LA POLARISATION DU RAYONNEMENT DE FLOUORESCENCE.

La seconde technique, qui consiste à étudier la polarisation du rayonnement de fluorescence, a pour base une observation de H. ZIEGENSPECK (*Kolloid-Z.*; 106, 62-64, 1944); cet auteur avait constaté que les fibres de Ramie, colorées par certains fluorochromes et éclairées en lumière bleue, émettaient une lumière de fluorescence jaune, entièrement polarisée parallèlement à l'axe de la fibre; il avait montré que ce phénomène était dû à l'interposition orientée des particules de fluorochrome dans les espaces intermicellaires anisodiamétriques et régulièrement disposés de la fibre de Ramie, en mettant en évidence le dichroïsme en lumière blanche transmise. Ainsi, l'étude de la polarisation de la lumière de fluorescence renseigne sur l'orientation des espaces intermicellaires et par conséquent sur celle des micelles elles-mêmes.

Nous avons pensé pouvoir réaliser à partir de cette observation, une technique d'étude des structures inframicroscopiques, permettant de détecter l'orientation des espaces intermicellaires dans les tissus végétaux et animaux. Pour obtenir commodément un intense rayonnement de fluorescence des préparations histologiques colorées, permettant leur examen aux plus forts grossissements du microscope, nous nous sommes adressé non pas à la lumière bleue, mais à l'ultra-violet. Nous avons utilisé soit l'« éclairage » par transparence, soit l'incidence oblique par dessus. Sur l'oculaire du microscope était placé un nicol analyseur. Nos préparations étaient colorées dans la phosphine Geigy à 0,1 % pendant une minute, lavées à l'eau, différenciées pendant dix minutes dans l'eau formolée, puis montées dans la glycérine ou l'huile de paraffine.

Nous avons observé la polarisation complète de la lumière de fluorescence, dans les fibres végétales à texture micellaire bien parallèle à l'axe de la fibre, comme dans le procédé de ZIEGENSPECK; lorsque les fibres étaient perpendiculaires au nicol, aucun éclairage n'était visible au microscope.

Au contraire, dans le cas des fibres animales (myofibrilles lisses ou striées), on n'obtient qu'un léger affaiblissement de la lumière de fluorescence, dans les conditions où les fibres végétales s'éteignent complètement. Ce phénomène ne peut être interprété comme une absence d'orientation des espaces intermicellaires; il est vraisemblablement dû au fait que les espaces intermicellaires sont beaucoup plus grands dans les fibrilles animales, et que le fluorochrome s'y trouve en grande partie à l'état non orienté.

L'étude de la polarisation du rayonnement de fluorescence permet donc de détecter l'orientation des espaces intermicellaires dans une structure histologique, à condition que ces espaces soient assez étroits pour permettre l'orientation de tout le colorant interposé.

Présenté à la Section de Microscopie, en sa séance du 15 novembre 1947.