

## **Chapitre II- Méthodes d'étude de la cellule**

### **TD N°1-Méthodes de microscopie optique et électronique**

#### **Objectif :**

- Connaitre le principe de fonctionnement du microscope optique et électronique.
- Pouvoir faire la différence entre la microscopie photonique et la microscopie électronique.

#### **Introduction:**

Du fait de leurs petites tailles (10 à 100  $\mu\text{m}$ ), l'observation des cellules nécessite l'utilisation des microscopes. Les méthodes utilisées pour étudier la structure de la cellule sont la microscopie optique (ou photonique) et la microscopie électronique.

#### **1. Les microscopes optiques(M.O)**

##### **1.1. Le microscope optique à fond clair**

###### **➤ Principe :**

Le M.O utilise comme source lumineuse la lumière visible.

Il est équipé de trois systèmes de lentilles transparentes (verre) :

- Un objectif effectue le grossissement primaire et donne une image réelle.
- Un oculaire effectue le grossissement secondaire. Il permet à l'œil de former une image virtuelle agrandie de l'image réelle formée par la lentille de l'objectif.
- un condenseur concentre la lumière sur l'objet

###### **➤ Le pouvoir séparateur ou limite de résolution**

Est la plus petite distance séparant deux points voisins que l'on peut distinguer à l'aide du microscope. La limite de détection D peut se calculer d'après la formule suivante :

$$D = 0,61 \lambda / n \cdot \sin \alpha$$

D = pouvoir séparateur

$\lambda$  = longueur d'onde du rayonnement utilisé

$\alpha$  = demi angle d'ouverture de l'objectif

n = indice de réfraction du milieu transparent qui sépare l'objet de l'objectif (l'air ou l'huile à immersion).

##### **1.2.Types de microscopes optiques**

Il existe plusieurs types de microscopes ayant chacun des montages optiques spéciaux, ont été mis au point pour permettre l'observation des cellules dans certaines conditions. Parmi ces microscopes, nous avons :

###### **➤ Microscope à contraste de phase**

Ce type de microscope sert à observer des cellules vivantes, non colorées. Il permet de voir les déplacements cellulaires (ex : suivre les étapes de la division cellulaire).

###### **➤ Microscope à fond noir**

MO à fond noir permet d'observer des cellules vivantes en action (déplacement, division, phagocytose, etc.)

###### **➤ Microscopie de fluorescence**

Ce type de microscope permet d'observer des éléments fluorescents dans une cellule. Le plus souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à un fluochrome.

➤ **Microscope inversé**

À l'inverse de la microscopie optique classique où la lumière arrive sur l'échantillon par le bas et où l'observation se fait par le dessus, pour le microscope inversé, la source de lumière est placée au-dessus de l'échantillon et les objectifs en dessous. Ce microscope est beaucoup utilisé pour l'observation de cellules en culture *in vitro*.

➤ **Microscope à lumière polarisée**

Il permet d'étudier les composants cellulaires qui se caractérisent par la libération de la lumière polarisée. Il est utilisé dans le domaine de l'observation pétrographique et l'identification des minéraux dans les roches.

Les types	Utilisés pour :
Optique à fond clair	L'observation des structures cellulaires internes après coloration
Optique à fond noir	L'observation d'échantillons non colorés et des cellules vivantes et en déplacement
Optique à fluorescence	Le marquage fluorescent de structure et de composés macromoléculaires.
Optique à contraste de phase	La mise en évidence des différences d'indices de réfraction et de contraste
Optique inversé	L'observation de cellules en culture.

**Tableau 1** : Les différents types des microscopes optiques

## **2. Les microscopes électroniques**

➤ **Principe**

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf que:

- Les photons sont remplacés par des électrons.
- Les lentilles de verre sont remplacées par des lentilles électromagnétiques.
- La limite de résolution du ME est plus élevée à celle du MO. Elle est de 2 nm (c'est-à-dire 1000 fois plus élevée que le MO).

L'agrandissement du ME peut atteindre jusqu'à 500.000 contre 2000 pour un MO.

### **2.1. Microscope électronique à transmission (MET)**

Dans le MET, les électrons traversent l'échantillon traité par des métaux lourds.

Sur l'écran du MET apparaît une image claire et agrandie. L'image est due à l'absorption différentielle des électrons par les différentes structures de l'échantillon.

Le MET se compose essentiellement de:

- une source des électrons (fil métallique chauffé à un degré très élevé sous vide). Sous vide, les électrons vont être accélérés en appliquant une différence de potentiel de 10 à 100 kV
- Espace tubulaire sous vide
- Des lentilles électromagnétiques (Bobines) permettent la diffraction du trajet des électrons.

### **2.2. Microscope électronique à balayage (MEB)**

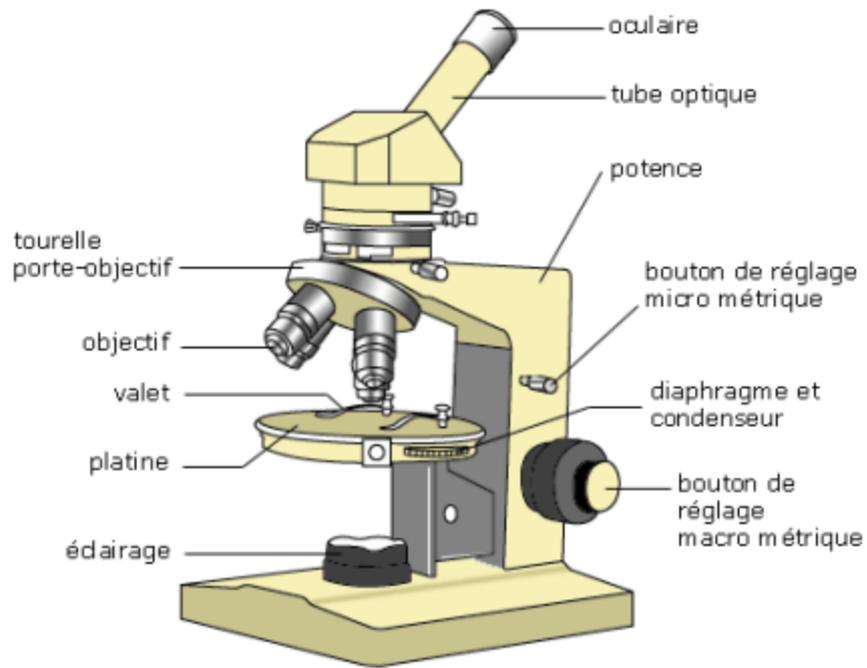
Le MEB permet d'observer l'objet en trois dimensions (en pseudo 3D..). Il est utilisé dans l'étude des surfaces des objets massifs après leur traitement par des substances métalliques réfléchissantes telles que le platine, l'argent et l'or.

Le flux d'électrons balaye la surface de l'objet. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image.

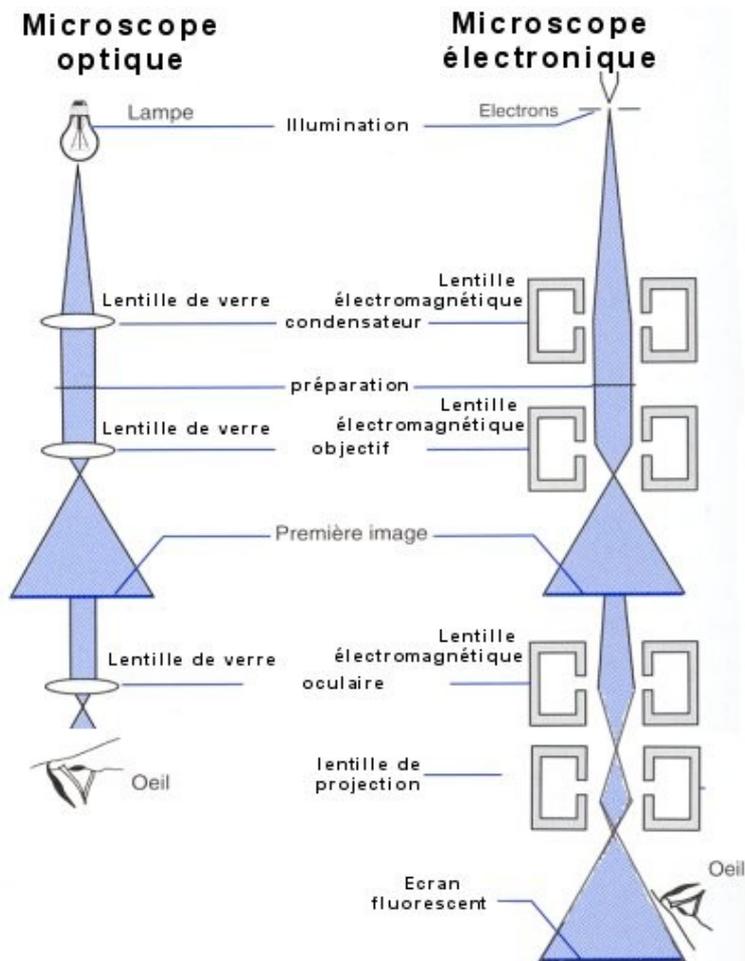
### **3. Différence entre microscopes optiques et électroniques**

	MO	ME
Source d'énergie	Lampe électrique	Filament de tungstène porté à incandescence
Rayonnement	photons	Electrons libres accélérés dans le vide pour traverser ensuite l'échantillon
Système optique	Lentille de verre	Lentille électrique Lentille magnétique
Pouvoir de résolution= pouvoir séparateur	0.2 $\mu$ m	0.2nm (2Å)
Epaisseur de l'échantillon	2 à 10 $\mu$ m	300-800Å
Grossissement	40 à 2000	500.000(MET)

**Tableau 2** : les principales différences entre MO et ME



**Figure 1** : Schéma d'un microscope optique monoculaire



**Figure 2**: Principe de fonctionnement du microscope optique et électronique à transmission