

## Chapitre II : Méthodes d'étude de la cellule TD N°1 : Méthodes de microscopie optique et électronique

### I-Définitions :

- **La microscopie** : est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures à l'échelle microscopique.
- **Le microscope** : est un instrument qui donne une image grossie d'un petit objet (**grossissement**), sépare les détails de celui-ci sur l'image (**résolution**) et rend les détails visibles à l'œil nu.

Du fait de leurs très 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.

### 2. Microscopes optiques (M.O)

#### 2.1. Microscope optique à fond clair

Le microscope optique à fond clair est utilisé en routine dans les laboratoires de biologie où il peut être employé pour l'analyse des échantillons **traités par des colorants**. Ce microscope est ainsi appelé parce qu'il forme, en effet, une image foncée sur un fond clair. Il permet de recueillir la lumière de la source dans les objectifs ; après avoir été transmise par l'échantillon.

#### ➤ Principe

Le microscope optique à fond clair (**Figure 1**), utilise comme source lumineuse la lumière visible (lampe ou miroir). Il est équipé de trois systèmes de lentilles de verre transparentes :

- **Un objectif** : effectue le grossissement primaire et donne une image réelle inversée et agrandie de l'objet.
- **Un oculaire** : effectue le grossissement secondaire de l'image fournie par l'objectif. Il grossit l'image intermédiaire formée par l'objectif, et donne l'image finale.
- **Un condenseur** : concentre la lumière sur l'échantillon (l'objet). Son rôle est essentiel pour la qualité des images, notamment le **contraste** et la **résolution**.

#### ➤ Le pouvoir séparateur (ou de résolution)

C'est la plus petite distance séparant deux points voisins que l'on peut distinguer à l'aide du microscope. La limite de résolution d'un microscope photonique classique est d'environ **0,2  $\mu\text{m}$**  et l'agrandissement peut atteindre jusqu'à **2000**.

### 2-2-Types de microscopes optiques

Il existe plusieurs types de microscopes optiques ayant chacun des **montages optiques spéciaux**, ont été mis au point pour permettre l'observation des cellules dans certaines conditions. Les microscopes les plus utilisés sont regroupés dans le **tableau (1)**.

**Tableau 1** : Différents types des microscopes optiques (MO)

Les types	Utilisés pour :
1. MO à fond clair	L'observation des structures cellulaires internes <b>après coloration</b> .
2. MO à fond noir	L'observation d'échantillons <b>non colorés</b> et des cellules <b>vivantes en action</b> (déplacement, division, phagocytose...etc).
3. MO à fluorescence	L'observation des <b>éléments fluorescents</b> dans une cellule (molécules rendues fluorescentes par couplage à un <b>fluorochrome</b> ).
4. MO à contraste de phase	L'observation des cellules <b>vivantes non pigmentés</b> qui ne sont pas visible au microscope à fond clair à cause du <b>faible contraste</b> entre les cellules et l'eau. Il permet de voir les déplacements cellulaires et de suivre les étapes de la division cellulaire.
5. MO inversé	L'observation de cellules <b>en culture in vitro</b> .

### 3- 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** (bobines).
- La **limite de résolution** du ME est **plus élevée** à celle du MO. Elle est de **0.2 nm** (c'est-à-dire 1000 fois plus élevé que le MO).

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

#### 3-1-Microscope électronique à transmission (MET)

Dans le MET, les électrons traversent l'échantillon traité par des **métaux lourds**. Sur l'écran du MET apparait 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.

### 3-2-Microscope électronique à balayage (MEB)

Le MEB permet d'observer l'objet en **trois dimensions**. 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.

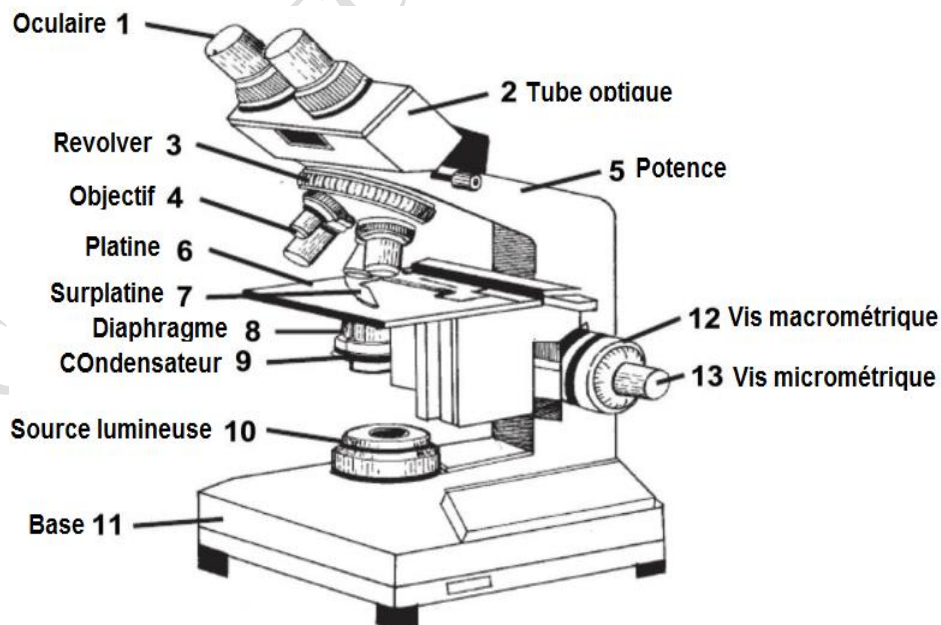
Le flux d'électrons **balaye la surface de l'objet**. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image.

### 4-Différence entre microscopes optiques et électroniques

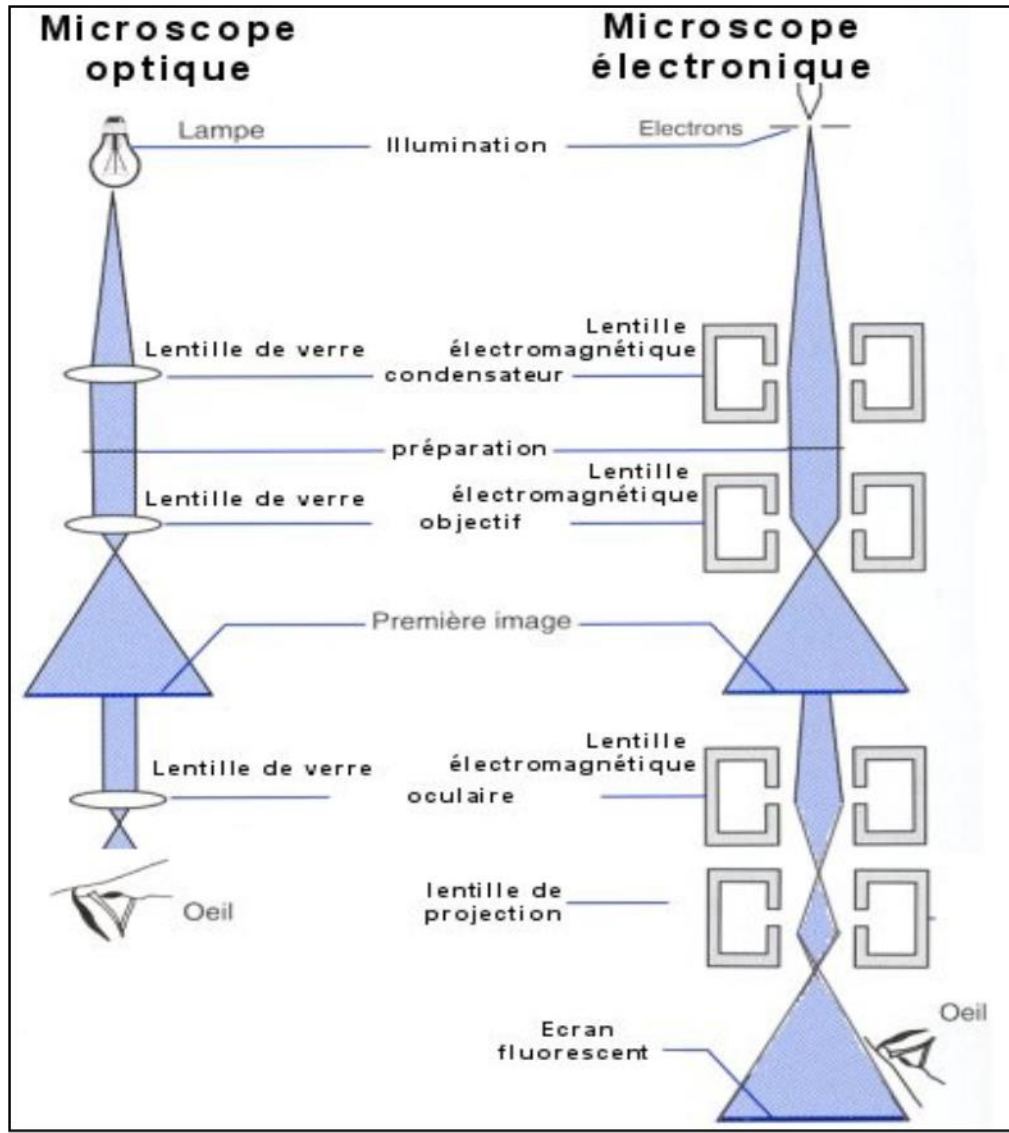
Le **tableau (2)** résume les principales différences entre les microscopes optiques et microscopes électroniques.

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

Caractéristiques	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 électromagnétique
Pouvoir séparateur	0.2 $\mu$ m (200 nm)	0.2nm (2 Å)
Epaisseur de l'échantillon	2 à 10 $\mu$ m	300-800 Å
Grossissement	40 à 2000	500.000 (MET)



**Figure 1** : les principaux constituants du microscope optique à fond clair



**Figure 2:** Comparaison entre le principe de fonctionnement du microscope optique et le microscope électronique à transmission (MET)