

L'étude de la structure et du fonctionnement de la cellule a nécessité la mise au point d'outils et de techniques appropriés. Ce n'est qu'au XII siècle, avec l'intervention du microscope, que les cellules sont devenues visibles. Par la suite, pendant plusieurs années, toutes nos connaissances sur les cellules ont été découvertes grâce à cet instrument. La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Le principe est dans tous les cas le même : une onde est envoyée sur la préparation ou émise par la préparation. Cette onde est captée par un objectif qui la concentre et passe par un oculaire qui crée une image observable. Cette image est soit observée à l'œil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra et stocké sur ordinateur pour retraitement. Aujourd'hui la microscopie est divisée en deux grands groupes, différents par la nature de la particule élémentaire impliquée : le microscope optique ou photonique et le microscope électronique.

1. Microscope photonique

Un certain nombre de microscopes ayant chacun des montages optiques spéciaux ont été mis au point. Ces dispositifs permettent d'augmenter considérablement la qualité des observations. Parmi ces microscopes :

1.1. Microscope optique en lumière transmise

Le microscope optique en lumière transmise permet d'étudier les cellules fixées et colorées. Un objet éclairé en lumière transmise est examiné à travers un système optique composé d'un premier système de lentilles, l'objectif, de très courte focale, et d'un deuxième système de lentilles, l'oculaire, qui donne une image virtuelle de cette dernière. L'image finale se forme au niveau de l'œil ou d'un appareil photographique associé au microscope (Figure. 1). La puissance d'un microscope est définie par le produit du grandissement de l'objectif par la puissance de l'oculaire. Son grandissement étant au maximum de 1000. Cette notion importante doit être complétée par celle de pouvoir séparateur, qui détermine la qualité optique réelle de l'appareil. Celui-ci est défini comme la distance minimale séparant deux points du plan objet dont le microscope donne des images distinctes. Dans les meilleures conditions, le pouvoir séparateur du microscope photonique atteint sa limite théorique, qui est comprise entre 0,2 et 0,3 μm . Il est possible de l'employer :

) En lumière réfléchié : l'éclairage est vertical, éclairant l'objet de haut en bas ; la lumière réfléchié par l'objet est transmise à l'œil de l'observateur par le système optique du microscope.

) En fond noir : l'éclairage est latéral, le fond de la préparation est obscur ; seules les particules qui diffractent les rayons lumineux en direction de l'oculaire s'illuminent. Les rayons lumineux n'atteignent pas l'objectif lorsque la préparation est dépourvue de structure. Lorsque la préparation contient des particules, la lumière est diffractée et certains rayons traversent le système optique du microscope.

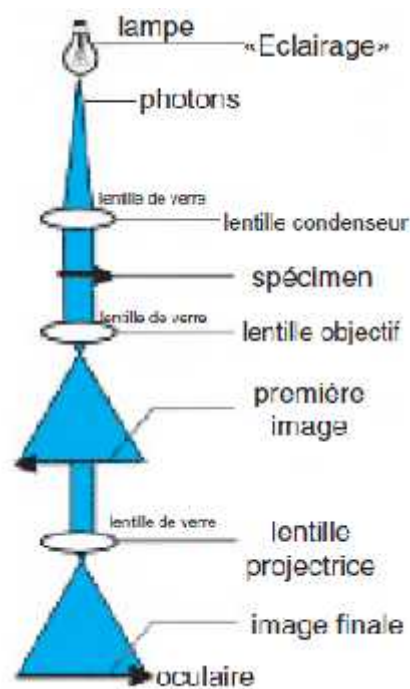


Figure. 1: Principe de fonctionnement du microscope en lumière transmise (Jean-Claude et Roland, 2005).

1.2. Microscope polarisant

Le microscope polarisant est un microscope photonique ordinaire pourvu de deux filtres : l'un est placé entre la lumière et l'objet, l'autre dans l'oculaire. Les filtres étant croisés, la lumière ne parvient pas à l'œil de l'observateur : mais lorsque les particules ou des structures sont anisotropes, elles apparaissent brillantes et se détachent sur le fond sombre. Ce microscope est surtout utilisé en cristallographie. Dans l'étude des cellules, il donne des images de toutes structures dont les molécules sont orientées, tels les fuseaux de division

(microtubules), les parois des cellules végétales (cellulose), les fibres musculaires striées (myofibrilles de myosine et d'actine)... (Figure. 2)

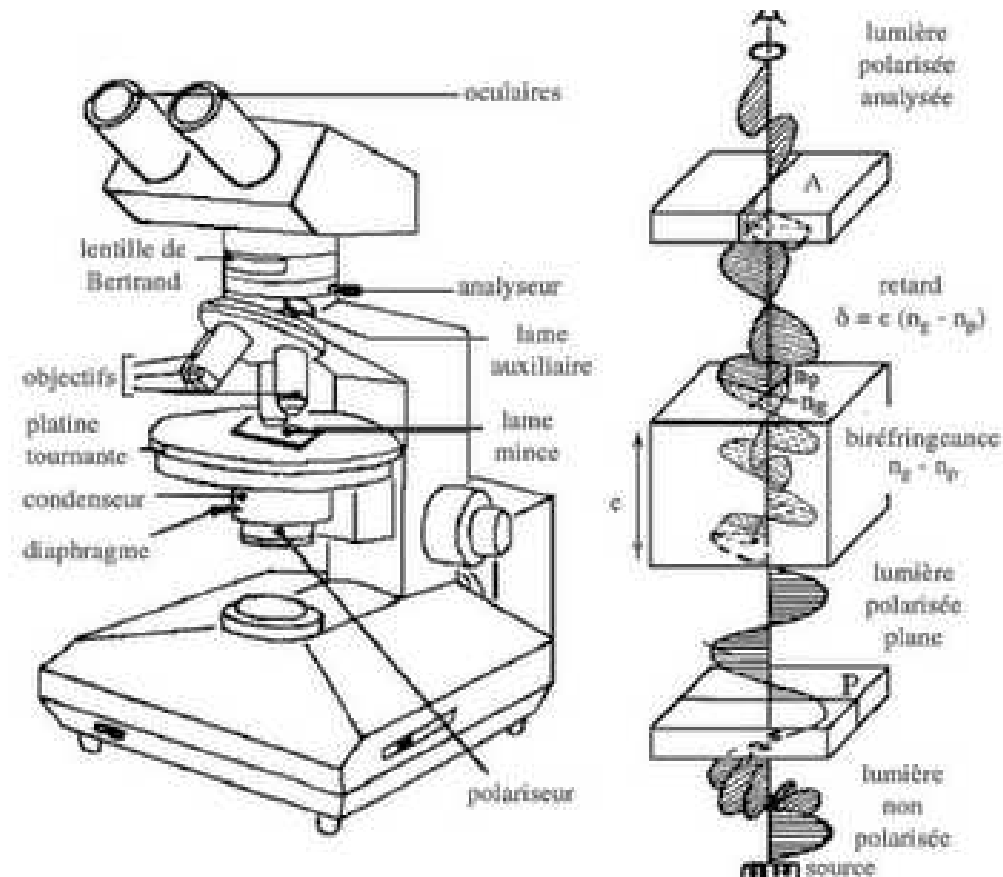


Figure. 2: Principe de fonctionnement du microscope polarisant
(Caron *et al.*, 2007).

1.3. Microscope à contraste de phase

Son principe repose sur l'amplification des contrastes naturels en mettant à profit les différences d'indices de réfraction entre les organites ; différences qu'il transforme en différences d'intensités de lumières qui sont alors visibles à l'œil. La base de cette transformation repose sur les interactions entre les ondes lumineuses : on parle d'interférences. Ce type de microscope est largement utilisé pour l'observation de cellules vivantes, en culture (Figure. 3).

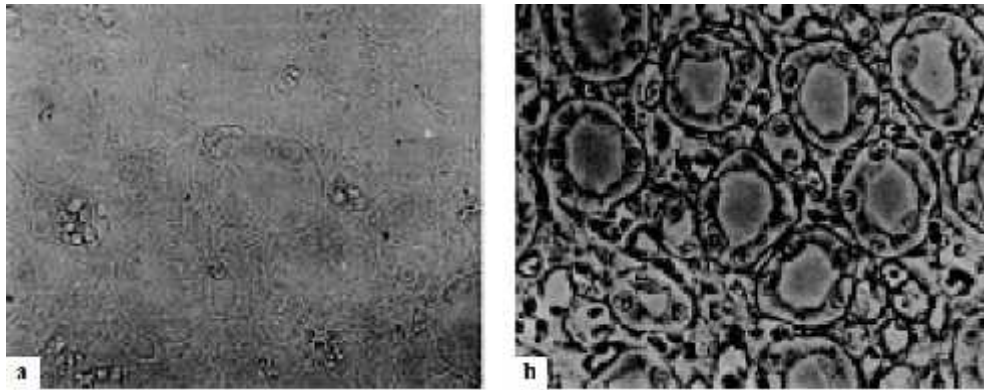


Figure. 3: Comparaison des images obtenues avec un microscope photonique ordinaire (a) et un microscope à contraste de phase (b). Coupes transversales de tubules rénal de mammifères (Jean-Claude et Roland, 2005).

1.4. Microscope à fluorescence

Le microscope à fluorescence permet de voir les molécules qui émettent des photons de longueur d'onde déterminée après excitation par une source lumineuse. Ce microscope est semblable à un microscope optique ordinaire, en dehors du fait que la lumière incidente passe à travers deux jeux de filtres. Le premier filtre la lumière avant qu'elle n'atteigne l'échantillon, ne laissant passer que les longueurs d'onde qui excitent le colorant fluorescent particulier utilisé. Le second bloque cette lumière et ne laisse passer que les longueurs d'ondes émises lors de la fluorescence du colorant. Les objets colorés apparaissent en couleur vive sur fond sombre (Figure. 4).

1.5. Microscope confocal à balayage

Ce microscope est un microscope à fluorescence dont la source lumineuse est un rayon laser. Ce rayon est focalisé sur un plan précis à une profondeur particulière de l'échantillon, et seule la fluorescence émise par ce plan précis peut sortir du détecteur, et être incluse dans l'image. On obtient une image précise en deux dimensions du plan sur lequel la mise au point a été faite - une coupe optique. Il est ainsi possible d'observer une cellule ou une structure plan par plan. Une série de coupe optique à différentes profondeurs permet de construire une image en trois dimensions (Figure. 5).

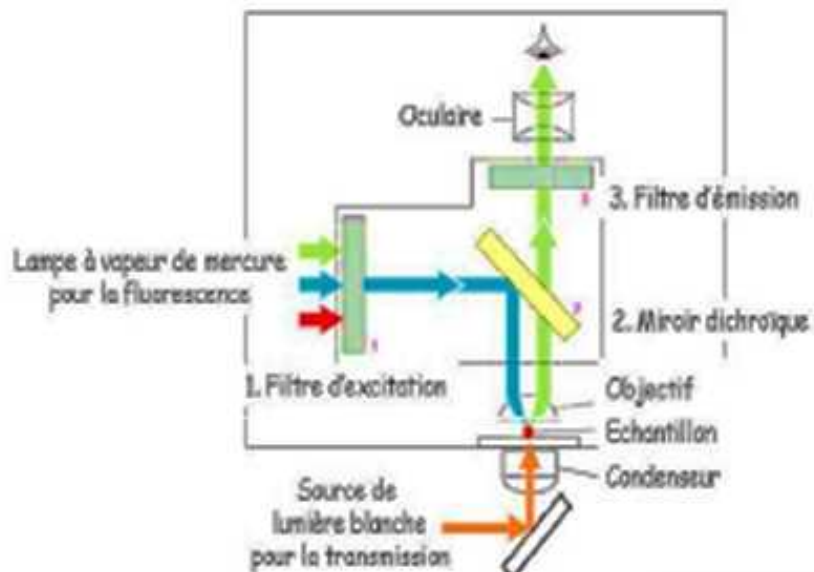


Figure. 4: Principe de fonctionnement du microscope à fluorescence (Thomas et William, 2004).

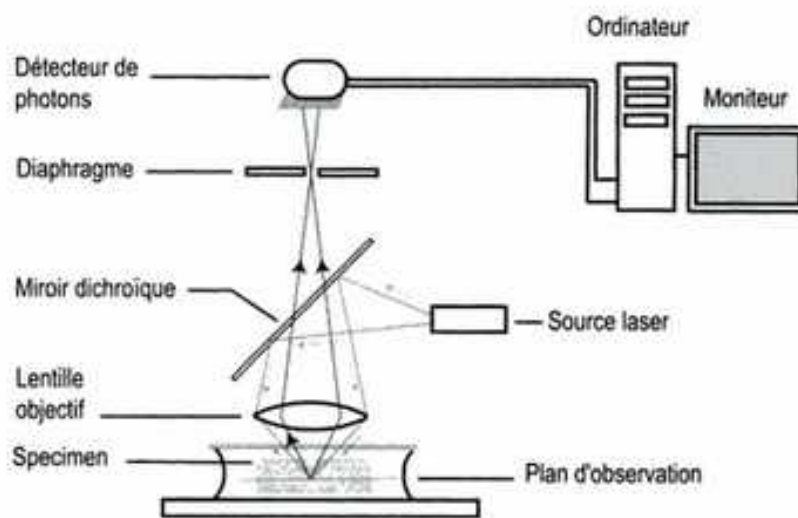


Figure. 5: Principe de fonctionnement du microscope confocal à balayage (Maillet et Lemullois, 2006).

2. Microscope électronique

Le microscope électronique est beaucoup plus récent par rapport au microscope optique. Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf qu'au lieu des photons ce microscope fonctionne avec des électrons le faisceau est produit et accéléré par un canon à électrons (cathode et anode percée).

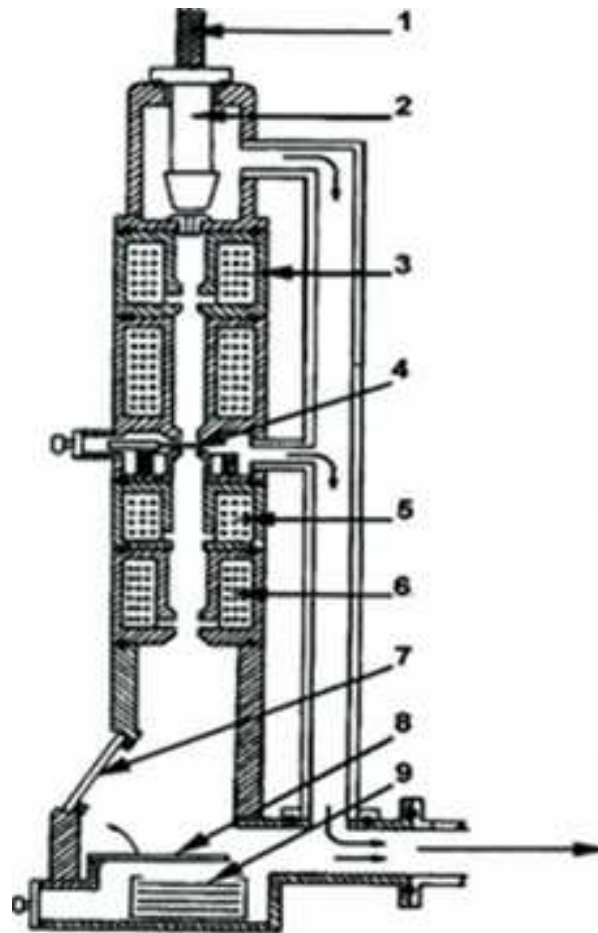
L'ensemble du dispositif est placé sous vide. Les lentilles de verre sont remplacées par des lentilles électromagnétiques seules capables de focaliser les électrons, et de créer des images. Avec ces microscopes on ne peut examiner que des cellules tuées, mais le pouvoir séparateur est de l'ordre de quelques angströms. On aura donc accès à l'ultra structure des organites. Il existe deux variantes de la microscopie électronique : la microscopie à transmission et la microscopie à balayage.

2.1. Microscope électronique à transmission

C'est la technique la plus performante. Dans son principe, elle ressemble à la microscopie optique en lumière directe. Le faisceau d'électron est émis par un canon à électron, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse, ils sont plus ou moins absorbée (la préparation est dite plus ou moins dense aux électrons), l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent. Son pouvoir séparateur est de 2nm (Figure. 6).

2.2. Microscope électronique à balayage

Bien que de résolution plus faible que la précédente, La résolution du MEB est de l'ordre de 1nm, cette technique donne des images absolument spectaculaires, en pseudo 3D. Le flux d'électrons balaye la surface de l'objet au préalable recouvert d'une couche métallique. Ce sont les électrons secondaires, renvoyés par la surface métallique, qui sont utilisés pour fournir une image. Cet appareil permet de gagner en profondeur de champ, mais son pouvoir séparateur est plus faible que celui du microscope à transmission. Il fournit des renseignements sur l'aspect tridimensionnel des surfaces cellulaires, par exemple (Figure. 7).



11. Câble haute tension. 2. Cathode. 3. Condensateur. 4. Objet à étudier. 5. Objet à étudier. 6. Objectif.
6. Projecteur. 7. Fenêtre d'observation. 8. Ecran Fluorescent. 9. Plaques photographiques.

Figure. 6: Principe de fonctionnement du microscope électronique à transmission
(Maillet et Lemullois, 2006).

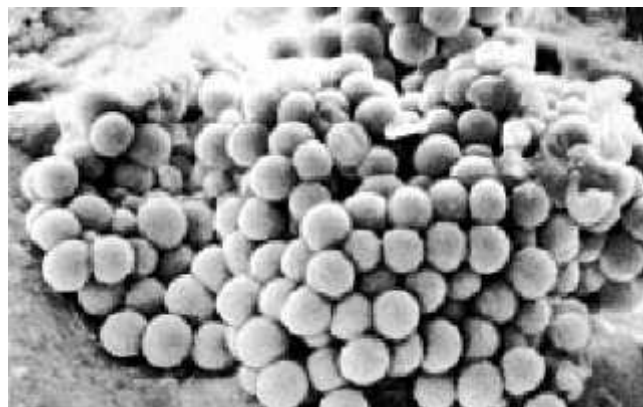


Figure. 7: Colonie de *Staphylococcus aureus* observée en microscopie électronique à balayage (Jean-Claude et Roland, 2005).