

Chapitre II : Méthodes d'étude de la cellule

TD N°1 : Méthodes de microscopie optique et électronique

1-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 μm), 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 (**Figure1**), 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**.
- **Un oculaire** : effectue le **grossissement secondaire** de l'image fournie par l'objectif.
- **Un condenseur** : sert à **concentrer la lumière sur l'échantillon**. 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 μm** 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 : Les différents types des microscopes optiques

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

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.
- 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 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 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.

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 électroniques.

Tableau 2 : les principales différences entre MO et ME

	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 μ m	0.2nm (2Å)
Epaisseur de l'échantillon	2 à 10 μ m	300-800Å
Grossissement	40 à 2000	500.000(MET)

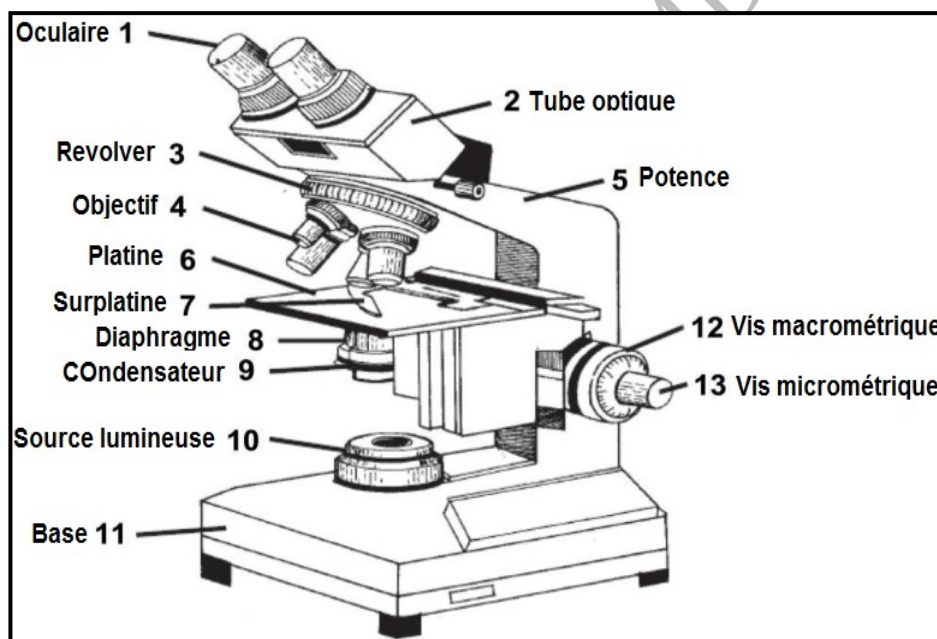


Figure 1 : les principaux constituants du microscope optique à fond clair

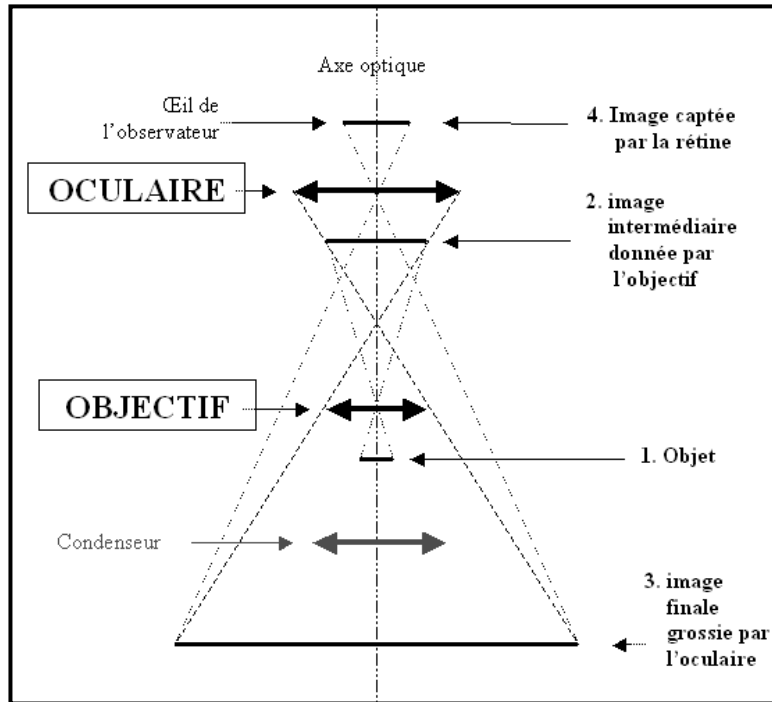


Figure 2 : Principe de fonctionnement du microscope optique (L'image intermédiaire formée par l'objectif est grossie par l'oculaire)

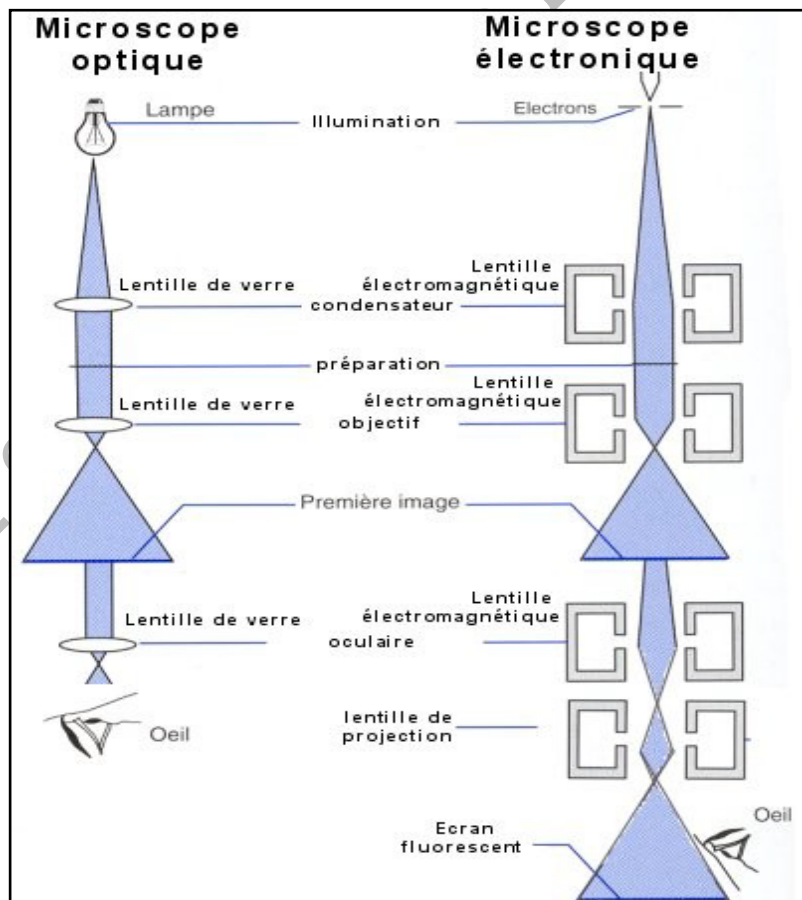


Figure 3 : Comparaison entre le principe de fonctionnement du microscope optique et le microscope électronique à transmission