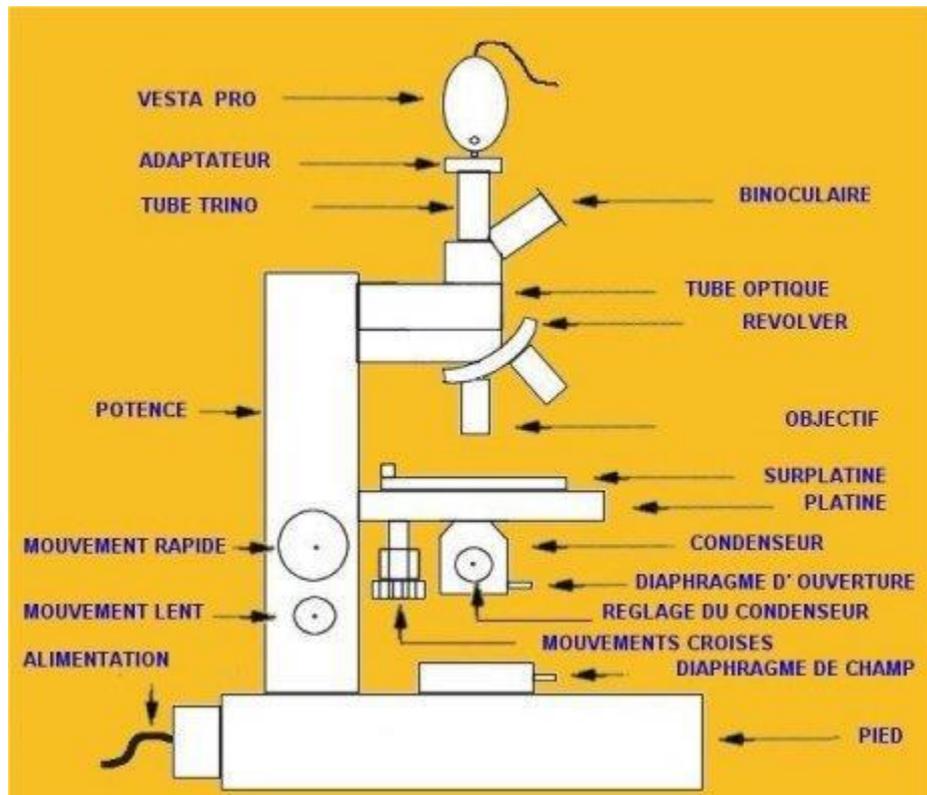


TD2. Microscopie

Présentation du microscope optique :

Un microscope optique en général est composé d'un statif (pied) qui assure la stabilité de l'appareil, d'un tube optique le long duquel existe un système de lentilles en verre et comportant à ses extrémités un oculaire permettant de recueillir l'image et des objectif servant à agrandir un certain nombre de fois l'image de la préparation, d'une platine (porte objet) percée d'un trou et munie de pinces pour immobiliser la lame et d'une source lumineuse éclairant la préparation.



Le microscope est caractérisé par :

- **son grossissement ou puissance** : Egal au produit du grossissement (ou puissance) de l'objectif et de l'oculaire Plus le grossissement de l'objectif est important, plus l'objectif doit être proche de l'objet à observer.
- **son pouvoir de résolution** : La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Indépendamment du capteur utilisé et des aberrations ou imperfections des lentilles, la résolution du microscope optique est fondamentalement limitée par la diffraction de la lumière.

2 : Principe du fonctionnement du microscope :

Deux types d'observations sont réalisables en microscopie : l'observation par transmission pour le microscope optique et pour le microscope électronique à transmission et l'observation par réflexion pour le microscope électronique à balayage. Donc le microscope travaille en :

Transmission : l'échantillon est traversé par des photons et électrons ; les lentilles de verre (MO) ou les champs électromagnétiques (MET) permettent l'obtention d'une image qui est reprise par l'oculaire (MO) ou écran fluorescent (MET).

Réflexion : le microscope ne capte que les rayons réfléchis par les parois de la préparation. Ce type de microscopie donne une image de la surface des objets et non de leur structure interne. L'intensité étant fonction de l'orientation des parois par rapport au système optique, cela donne une image « en relief » de l'objet. Elles ne sont donc pas applicables à des objets sans relief comme les coupes de tissus ! Elles nécessitent « un éclairage latéral » de l'objet. Ce mode de microscopie est peu utilisé, il correspond aux loupes binoculaires ou stéréo microscopes, au microscope à fond noir en microscopie optique et au microscope électronique à balayage (MEB) en microscopie électronique.

3 : Conditions d'observation en microscopie :

Pour effectuer une observation en microscopie deux exigences s'imposent : l'épaisseur de l'échantillon et le contraste.

L'épaisseur de l'échantillon : pour une observation par transmission l'échantillon doit présenter une faible épaisseur afin de permettre le passage du faisceau incident des photons ou d'électrons d'où la nécessité de faire des coupes très très fines. Les coupes exigées en (MO) varient entre 2 μm à 10 μm et de 0,03 μm à 0,05 μm

Le contraste : L'observation par transmission n'est possible que si certaines régions de la coupe absorbent les photons ou les électrons plus que d'autres (effet contraste). En règle générale, les constituants cellulaires présentent des contrastes naturels faibles d'où l'utilisation de certains artifices tels que les montages optiques qui amplifient les contrastes naturels comme le microscope à contraste de phase ou des colorants vitaux sélectifs (MO) ou encore des sels de métaux lourds comme les sels de plomb (ME).

B : LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Le microscope électronique est beaucoup plus récent : le premier a été construit en 1931, par Max Knoll et Ernst Ruska, ce dernier a d'ailleurs reçu le prix Nobel de physique en 1986 pour cette invention. Puis il s'est répandu à partir des années 60. La résolution d'un microscope électronique peut atteindre 2 angströms, mais généralement les meilleurs microscopes atteignent 20 angströms seulement.

Le principe de fonctionnement d'un microscope électronique ressemble un peu à celui d'un microscope optique sauf que au lieu des photons ce microscope fonction 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 bobines électromagnétiques ("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 \AA . On aura donc accès à l'ultra structure des organites.

a) Microscope électronique à transmission :

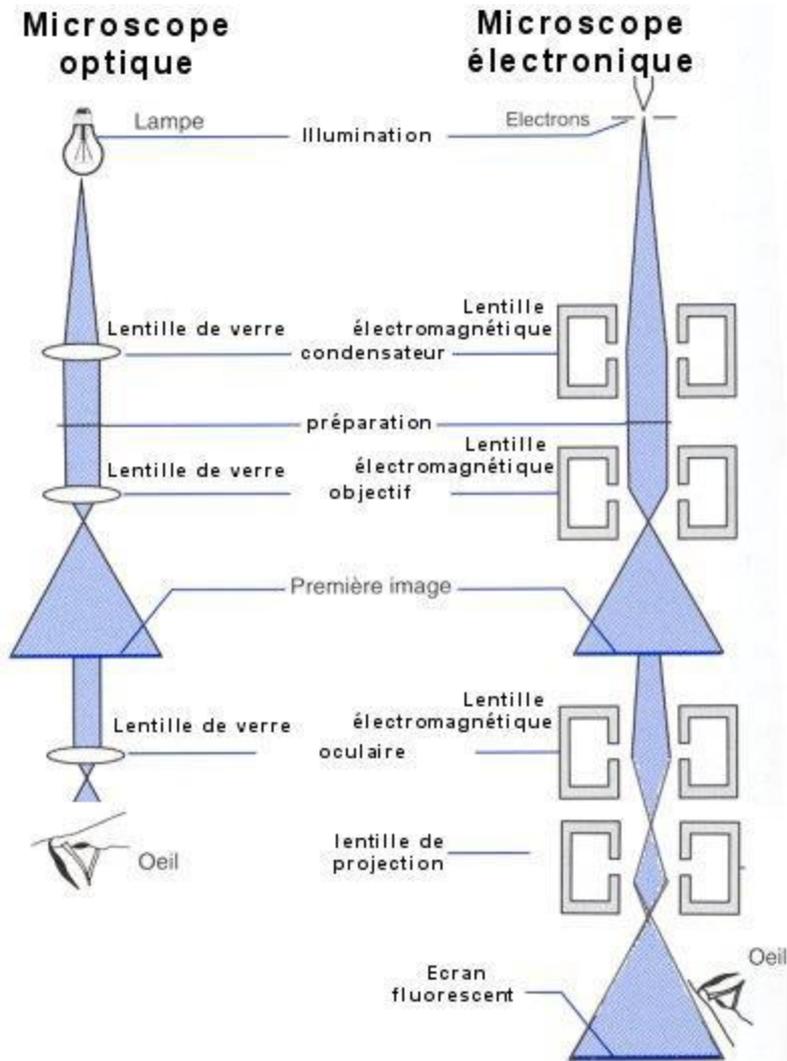
C'est la technique la plus performante. Dans son principe, elle ressemble à la microscopie optique en lumière directe. Le faisceau d'électron est émis par un canon à électron, focalisé sur la préparation à l'aide de lentilles électromagnétiques et la traverse, ils sont plus ou moins absorbée (la préparation est dite plus ou moins dense aux électrons), l'image se forme derrière la préparation sur un écran fluorescent similaire à ceux qui équipent les téléviseurs noirs et blanc. Hormis le fait que les absorbeurs d'électrons sont des métaux lourds les mêmes techniques de révélation que pour la microscopie en lumière directe peuvent être utilisées.

b) Microscope électronique à balayage (scanning) :

Bien que de résolution plus faible que la précédente, 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.



M. ELECTRONIQUE
200000 fois 10 ⁶ par les électrons capable de l'ordre de 0,05 A° sans champs magnétiques écran fluorescent résolution : 0,05µm
à fine de la cellule au niveau moléculaire pour vieux litiges (végétaux)
semble des (artefacts) apparaissent
(nm) 10 ⁻⁶ mm ou 10 ⁻⁹ m