

La microscopie

1 –La microscopie

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Elle permet de rendre visible les éléments invisibles à l'œil nu, soit par leur taille, soit par leurs couleurs.

La microscopie est un ensemble de techniques d'imagerie des objets de petites dimensions. L'unité de mesure utilisée en microscopie est le μ , μm , nm et Å . L'appareil utilisé pour rendre possible cette observation est appelé un microscope.

Le pouvoir séparateur est la capacité de distinguer deux points adjacents comme distincts. L'œil a la capacité de distinguer des particules d'un diamètre pouvant atteindre 0,1 μm . Toutefois, elles doivent être séparées entre elles d'une distance d'au moins 5 μm . Le pouvoir séparateur de l'œil est de 5 μm .

La qualité d'un microscope ne dépend pas du grossissement, mais du pouvoir séparateur, c'est-à-dire de la capacité que possède cet instrument pour séparer 2 points voisins. Rien ne sert d'agrandir une image qui serait floue

2 -Principe

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 stockée sur ordinateur pour retraitement

3 -Types de microscopie.

La microscopie est divisée en deux grands groupes :

- la microscopie optique
- la microscopie électronique

3-1 -La microscopie optique

Appelée aussi microscopie photonique. Elle consiste à grossir l'image optique d'un objet de petites dimensions en utilisant un microscope optique. Cet appareil utilise des lentilles optiques pour former l'image en contrôlant le faisceau lumineux et pour illuminer l'échantillon. Elle permet l'observation de la structure globale des cellules eucaryotes. Les meilleurs microscopes optiques sont limités à un grossissement de 2000 fois

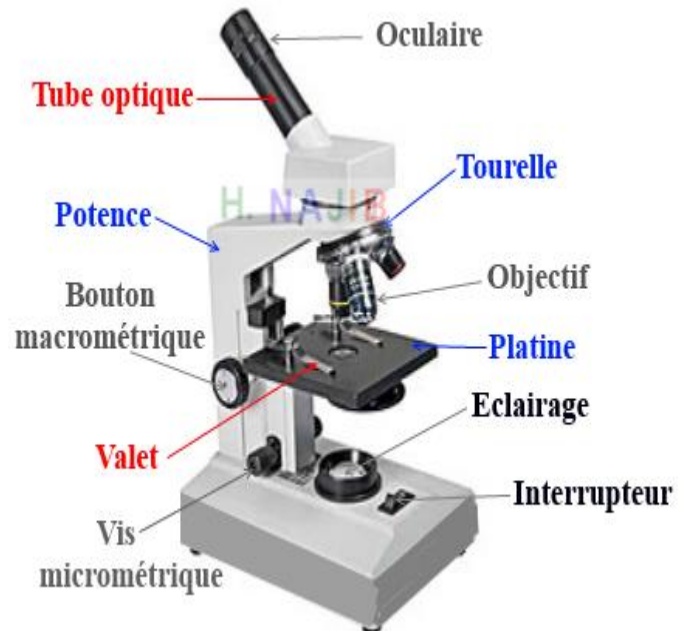
3-2 -La microscopie électronique

Un faisceau d'électrons est utilisé pour produire une image. L'objet est bombardé par un faisceau d'électrons. Le microscope électronique utilise des lentilles électrostatiques et des lentilles magnétiques pour former l'image. Le ME révèle l'ultrastructure des cellules eucaryotes et permet une observation plus poussée de la structure procaryote. La longueur d'onde d'un faisceau

d'électrons est plus courte que celle de la lumière résultant en une meilleure résolution, allant jusqu'à 2 millions de fois.



Microscope électronique

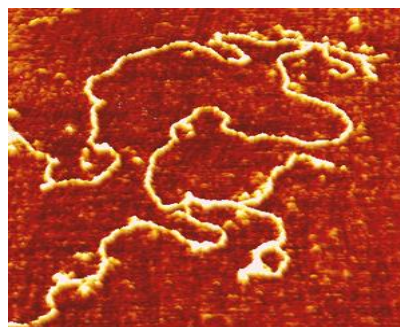


Microscope optique

3-3 -Microscopie à balayage de sonde

Les nouvelles techniques en microscopie : microscopie à balayage de sonde. Elle possède une résolution très élevée et peut être utilisée pour observer des structures très petites, et ce, jusqu'au niveau atomique.

Elle détermine les caractères de surface en balayant la surface de l'objet avec une sonde ponctuelle. Elle peut atteindre des grossissements de 100 millions et permet de voir les atomes à la surface d'un solide.



Molécule d'ADN observé par microscopie à balayage de sonde

4 –Types de microscope photonique

Il existe plusieurs types de microscopes photoniques :

Le microscope à fond clair/à fond noir

Le microscope à contraste de phase

Le microscope à fluorescence

Le microscope confocal

4-1 -Le microscope à fond clair/à fond noir

Le champ qui entoure l'échantillon apparaît noir, tandis que l'objet lui-même est brillant. Il est utilisé pour augmenter les contrastes des objets transparents et difficilement observables au MO classique. Utilisé pour observer des structures vivantes et en déplacement non colorés comme des bactéries ou des organismes unicellulaires.

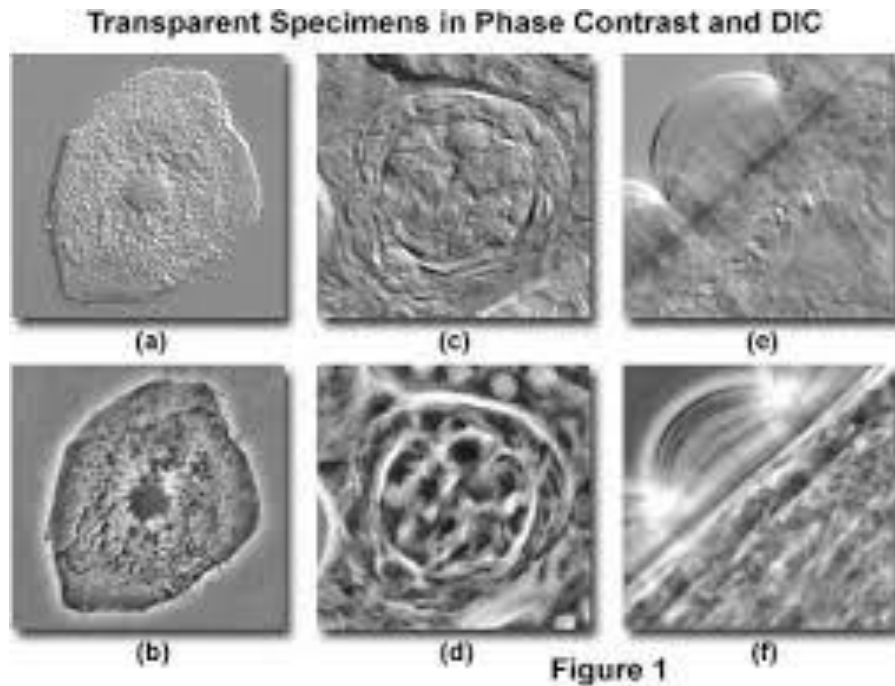


Image d'une puce d'eau observée au microscope à fond noir.

4-2 -La microscopie en contraste de phase

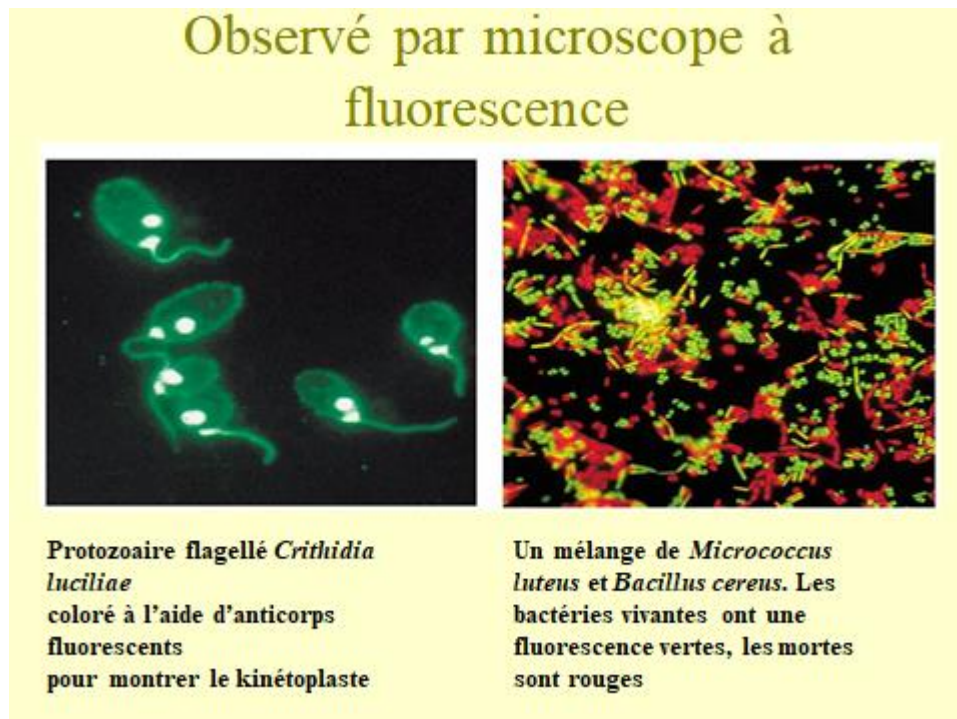
Cette technique permet d'observer les cellules sans préparation ni coloration dans leur milieu d'origine (culture cellulaire). Le principe est basé sur le fait que les structures biologiques sont transparentes (n'absorbe pas la lumière transmise), mais elles ont un indice de réfraction différent. Par exemple, le noyau d'une cellule apparaîtra sombre dans le cytoplasme environnant, le contraste est excellent.

A l'observation, on voit une image en noir et blanc où les différentes structures apparaissent bordées de blanc d'un côté et de noir de l'autre.



4-3 -La Microscopie à fluorescence

On éclaire l'échantillon avec une lumière ultra-violette, violette ou bleue. Habituellement, les échantillons sont contrastés par un colorant appelé fluorochrome. Deux colorants très utilisés sont : la rhodamine (émet une lumière rouge) et la fluorescéine (lumière verte). Elle permet d'obtenir une image de l'objet résultante de la lumière fluorescente émise par le spécimen.



4-4 -La microscopie confocale

C'est un microscope qui permet de réaliser des images de très faible profondeur de champ. En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon. On réalise une série d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle. L'objet n'est pas directement observé par l'utilisateur, mais recomposé par un ordinateur.

La plupart du temps, on utilise un laser comme source de lumière. Un rayon laser focalisé touche un point de l'échantillon. Un ordinateur compile les images générées par chaque point afin de reconstruire une image tridimensionnelle.

5 –Types de microscope électronique

Il existe deux variantes de la microscopie électronique :

- La microscopie à transmission
- La microscopie à balayage

5-1 -La microscopie électronique à transmission

Elle utilise comme rayonnement des électrons. L'observation est sous ultravide. Les échantillons sont sous forme de lames extrêmement fines (50 nanomètres). L'image obtenue peut être vue sur un écran. L'échantillon apparaît blanc sur un fond sombre. Les régions plus épaisses de l'échantillon diffractent plus d'électrons et apparaîtront plus sombres.

Dans son principe, elle ressemble à la MO : les électrons sont diffractés lorsqu'ils traversent l'échantillon. Le faisceau d'électrons est focalisé par des lentilles magnétiques pour former une image visible agrandie de l'échantillon sur un écran fluorescent.

5-2 -La Microscopie électronique à balayage

Elle utilise des électrons. L'observation est sous ultravide. Ce microscope produit une image tridimensionnelle 3D de la surface avec une grande profondeur de champ.

Utilisée surtout pour étudier la surface des cellules et des tissus plutôt que les organites subcellulaires. Produit une image à partir des électrons réfléchis par la surface de l'objet plutôt qu'à partir des électrons transmis. L'image produit une impression de relief avec des zones claires et des zones d'ombres.

Étape de préparation des échantillons en vue d'être observés par microscope :

Déroulement des différentes étapes de traitement et de préparation des échantillons tissulaires :

Echantillons	Quelques mm ³ H.O	Maximum 1mm ³ H.E
Fixateurs utilisés (mélange d'agents chimiques)	Formol. Acide picrique. Le sublimé (mélange formole et acide picrique sont les plus utilisés) mélange de Bouin. mélange de Hollande. la durée de fixation 2à8 jours (taille de l'échantillon)	Glutaraldéhyde. Permanganate de potassium. durée de fixation : quelque heures avec des conditions rigoureuses de pH. de température. d'osmolarité et parfois de la lumière.
Post-fixation	Pas de post-fixation	par le tétraoxyde d'osmium pour stabiliser les lipides.
Déshydratation	Avec des solution d'alcool à différents ° (degrés croissants)	Avec des solution d'alcool à différents ° (degrés croissants)
Milieu d'inclusion (paraffinage)	Dans la paraffine liquide à 56°C et a l'air ambiant pour le refroidissement ensuite	Epon, Araldite, durcupan, hetacrylate. La plus actualisée et plus utilisée = Résine Epoxy
Confection des coupes	- Bloc de paraffine au microtome -Les épaisseurs des coupes varient de 4à15µm -Il se forme un ruban de coupes récupéré sur une lame -Le ruban doit être déplié à l'eau gélatinée sur une lame -La lame est placée sur une plaque chauffante : -C'est le déparaffinage (on doit éliminer la paraffine pour faciliter le passage du colorant et donc la coloration du tissu)	- Bloc de résine Epoxy à l' ultramicrotome -Les épaisseurs sont de 30nm environ -Coupes ultrafines - Ruban de coupes en forme pyramidale récupéré dans de l'eau. --Le ruban flotte sur l'eau -La grille récupère les différentes pyramides du tissu -Les coupes seront colorées
Colorants	Soit des colorants naturels Soit des colorants synthétiques Ce sont des sels neutres comportant un radical acide et un radical basique Si la partie colorante est la base : le colorant est basique Si elle est acide : le colorant est acide. Les structures fixant les colorants B seront Basophile ≠ Basophobe Les structures fixant les colorants A seront acidophiles ≠ acidophobe Prise de photos La couleur des divers constituants n'a pas de signification particulière : càd exp : le tissu conjonctif peut se colorer en bleu (Masson), en orange (safran), en vert (Prenant) etc.	Les sels de métaux lourds (acétate d'uranyle, citrate de plomb) Acétate d'uranyle se fixe sur les nucléoprotéines dans le noyau, sur le nucléole et les ribosomes (ADN ribosomal) Le citrate de plomb sur la membrane plasmique et les membranes des organites. Les sels fixés absorbent les e- et renforceront le contraste sur l'écran fluorescent