



Département du Vivant et de l'Environnement
Parcours : Licence en Toxicologie (L3)



Matière: Techniques d'Analyse **Microscopie optique**

- La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques,
- Le principe : une onde envoyée sur la préparation ou émise par la préparation,
- Cette onde est captée par un objectif qui la concentre puis 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,
- I. Le microscope optique (photonique)
- II. le microscope électronique (utilise des électrons).

Les principales techniques de microscopie optique:

Principe: la préparation est éclairée par une lampe,

Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

- en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière:

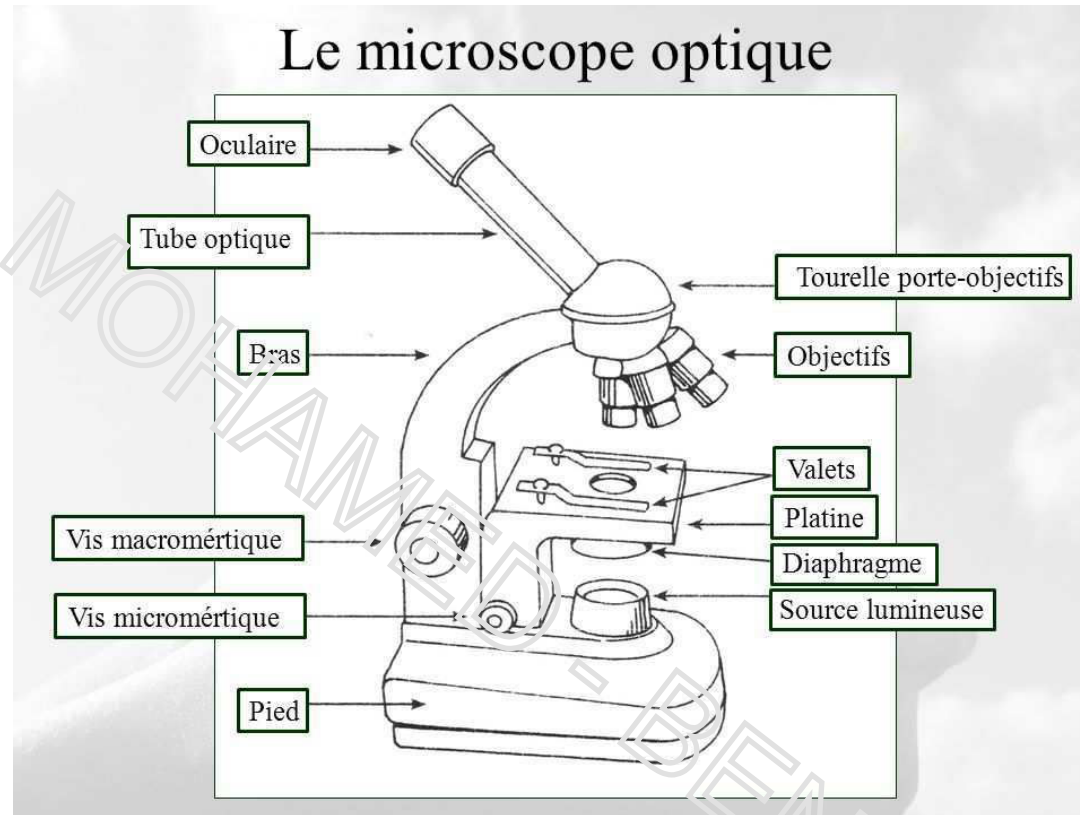
C'est la **microscopie en lumière directe**,

- en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux:

C'est la **microscopie en contraste de phase**,

- en émettant de la lumière (dont la longueur d'onde est différente de celle de la lampe d'éclairage):

C'est la **microscopie à fluorescence**.



Avantages du microscope optique:

- Donner une vue générale des tissus et des cellules
- Permettre l'examen de cellules vivantes

Inconvénients:

Le grossissement maximal est pas plus de 1000 fois.

Caractéristiques du microscope optique :

- Le **grossissement** = puissance de l'objectif x puissance de l'oculaire
- Le **pouvoir de résolution** : désigne sa capacité à séparer des détails très voisins.

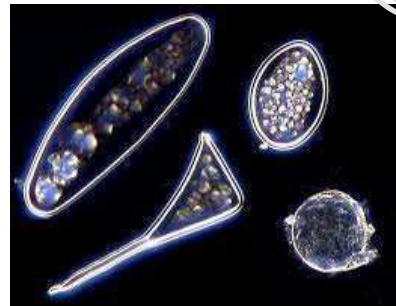
Types de microscopes optiques :

1. Microscope à fond noir:

- le fond du champ d'observation est noir
- La source de lumière est **oblique** par rapport à la préparation cellulaire
- La préparation est donc illuminée sous une incidence **rasante**
- Seul les rayons réfléchis sont captés par l'objectif
- Le moindre objet apparaît brillamment éclairé

Inconvénients:

- Les objets observés devenant des sources lumineuses, leurs formes et dimensions ne peuvent pas être correctement appréciés.



Exemples d'imagerie obtenues par le microscope à fond sombre

2. Microscope à contraste de phase:

- Quand le bord d'une structure produit une **diffraction** suffisante la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Le noyau d'une cellule par exemple apparaîtra sombre dans le cytoplasme environnant.

Avantages:

Permet de visualiser une croissance cellulaire vivante sans usage des colorants

Inconvénients:

Cette technique ne peut être utilisée avec les objets épais.

3. Microscope à fluorescence :

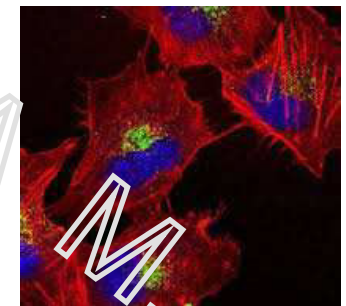
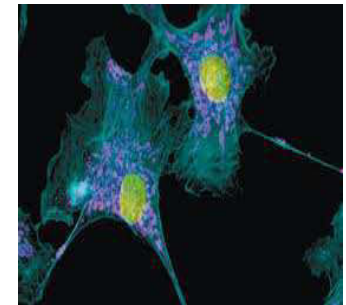
Les molécules fluorescentes absorbent des radiations à une longueur d'onde donnée puis émettent d'autres radiations de longueur d'onde plus élevée.

Ce microscope ressemble au microscope optique ordinaire, mais muni d'une **source d'UV** (lampe) et d'un système de **filtre** qui permet de **choisir la longueur d'onde des UV appropriés** pour chaque substance fluorescente utilisée.

Souvent utilisé pour détecter les protéines spécifiques ou d'autres molécules rendues fluorescentes par couplage à un fluochrome (Fluorescéine, fluoresce en vert, Rhodamine en rouge, substances largement utilisées dans la biologie cellulaire).



**Exemple d'imagerie
à contraste de phase**



**Exemples d'imagerie
à fluorescence.**