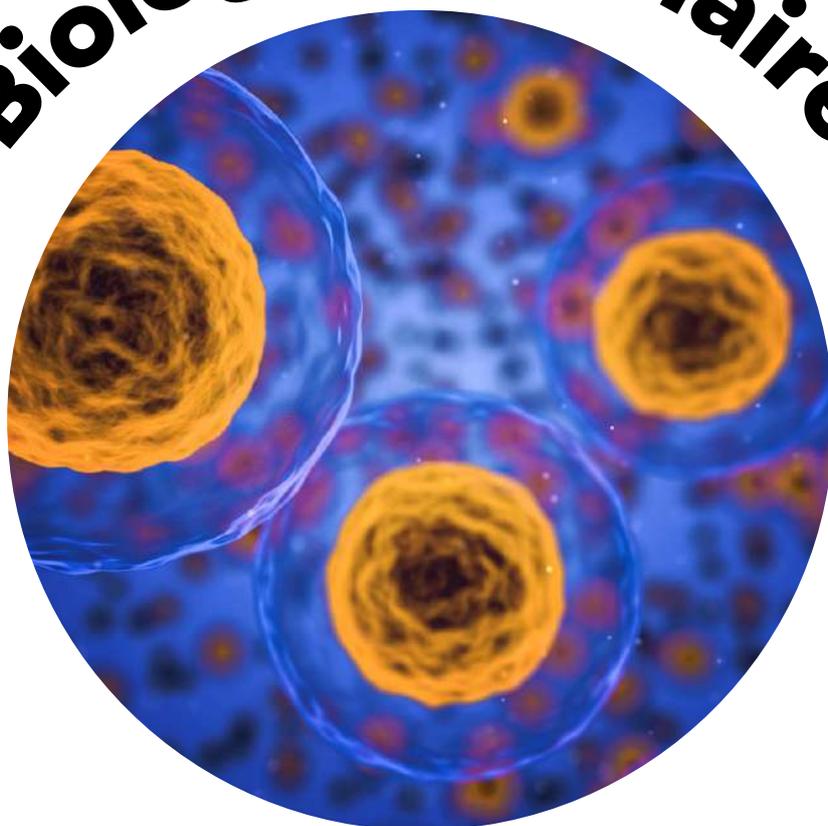


# Biologie Cellulaire



SCIENCES DE LA  
VIE ET DE LA TERRE



**Shop**



- Cahiers de Biologie + Lexique
- Accessoires de Biologie



**Etudier**



Visiter [Biologie Maroc](http://www.biologie-maroc.com) pour étudier et passer des QUIZ et QCM en ligne et Télécharger TD, TP et Examens résolus.



**Emploi**



- CV • Lettres de motivation • Demandes...
- Offres d'emploi
- Offres de stage & PFE

# Travaux Dirigés de Biologie Cellulaire

TD n° 1

Compléments sur les microscopes

# Les différents types de microscopes photoniques

A. Le microscope à fond noir

B. Le microscope polarisant

C. Le microscope à contraste de phase

D. Le microscope interférentiel différentiel (DIC)

E. Le microscope en fluorescence

F. Le microscope confocal

# A. Le microscope à fond noir

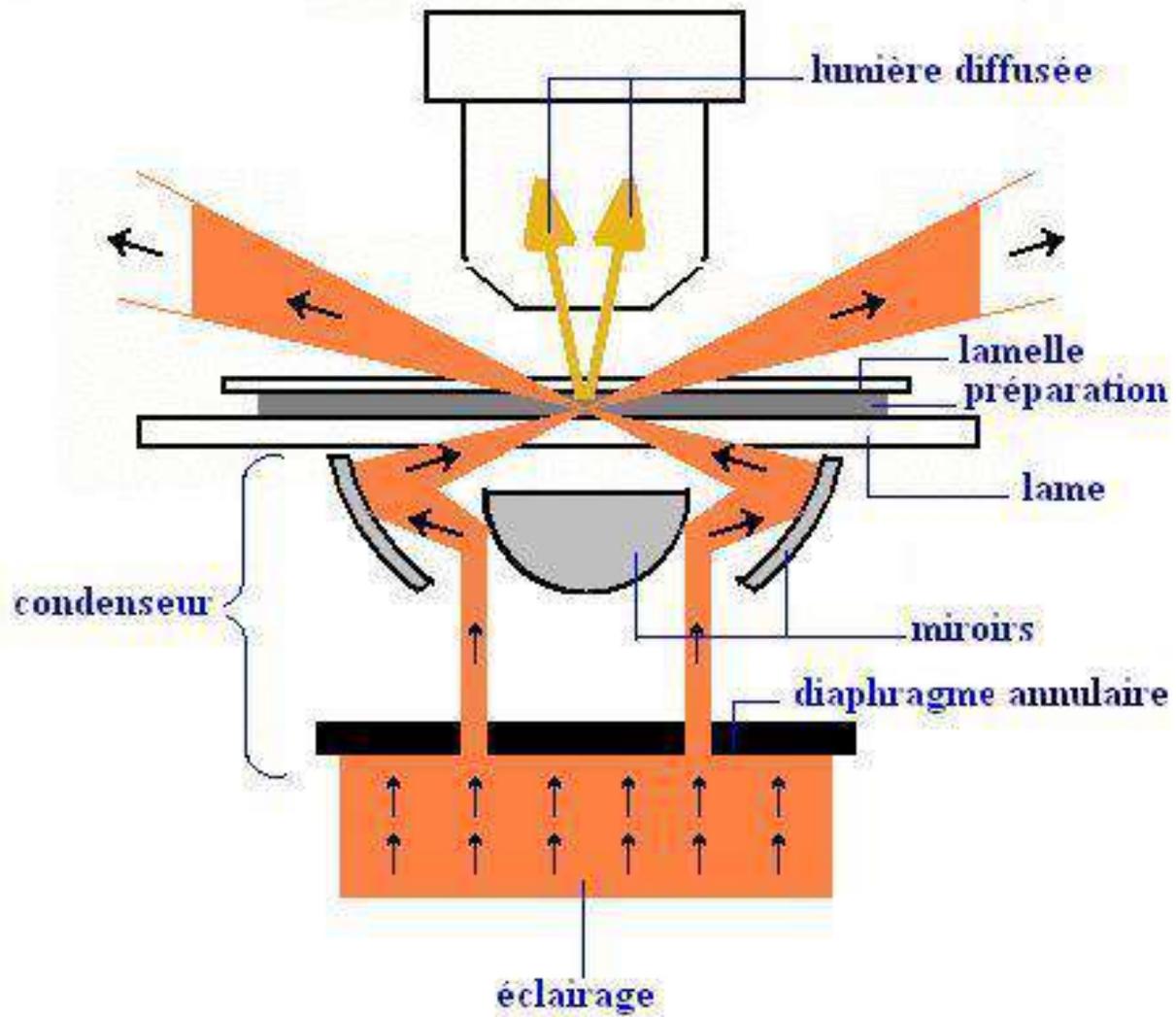
- l'image est créée par la diffraction de la lumière.
- la lumière n'arrive pas à l'objectif d'où le fond noir.
- La microscopie à fond noir est adaptée aux échantillons non colorés, sans préparation). Elle permet d'observer des structures vivantes et en déplacement comme des bactéries ou des organismes unicellulaires.

## 1. Principe

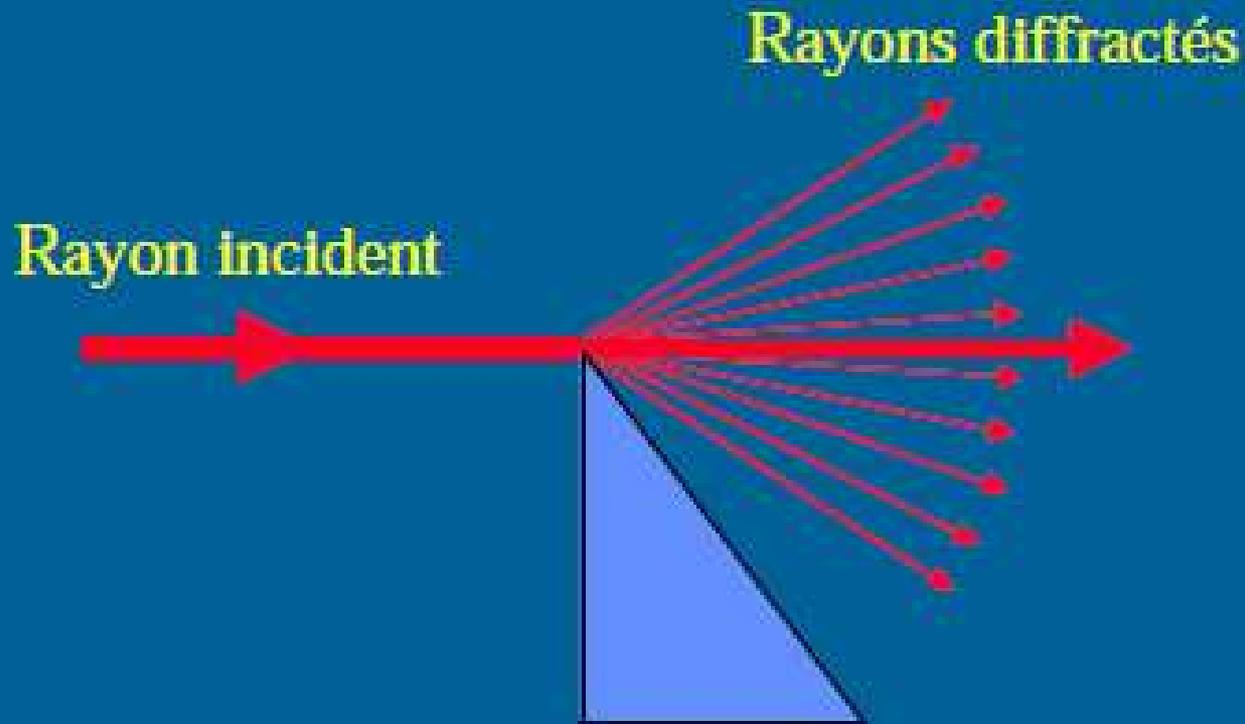
- 1.Éclairage par un condenseur à fond noir
- 2.Aucune lumière ne pénètre dans l'objectif
- 3.Observations des contours de la cellule par diffraction

## 2. Applications:

Bactériologie

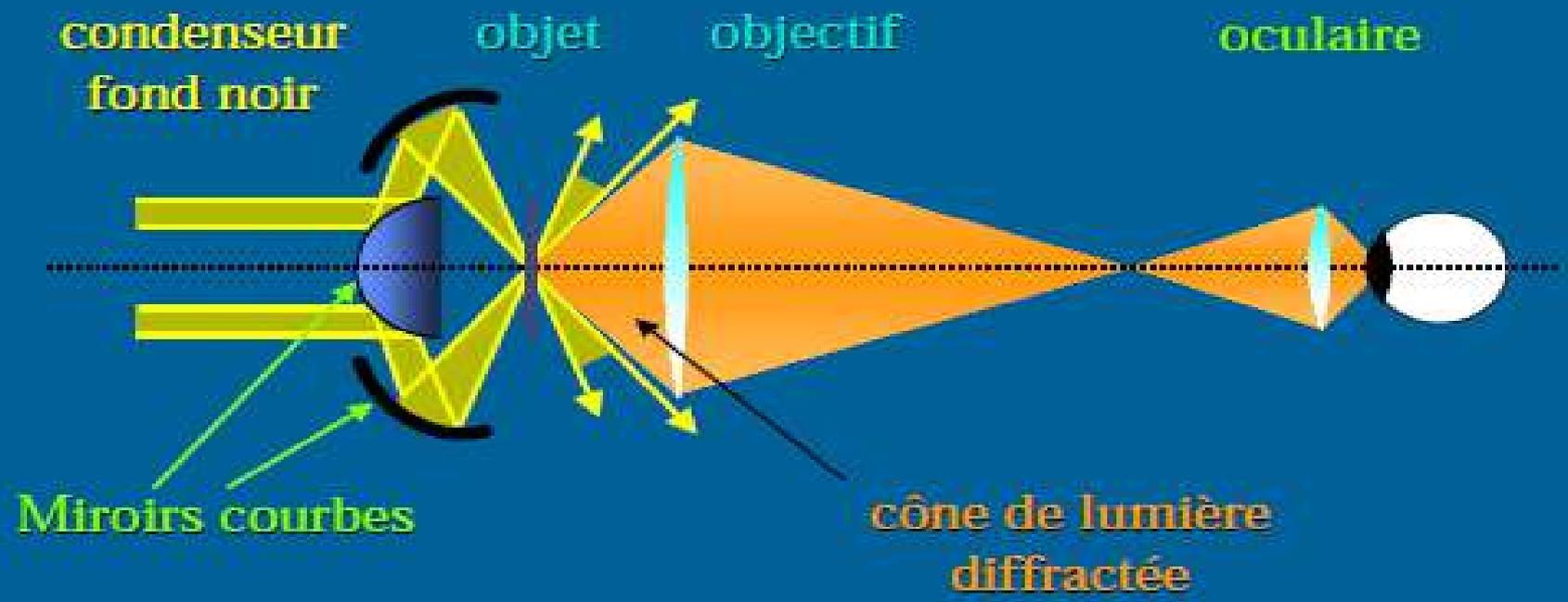


# *Diffraction - Dispersion de la lumière*

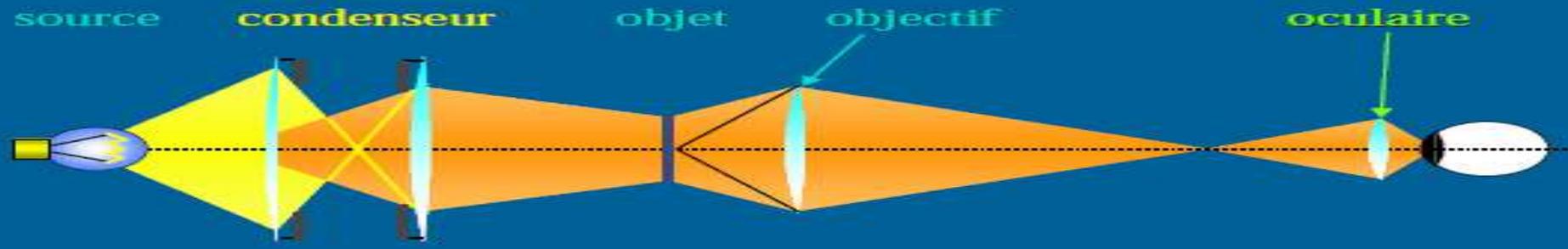


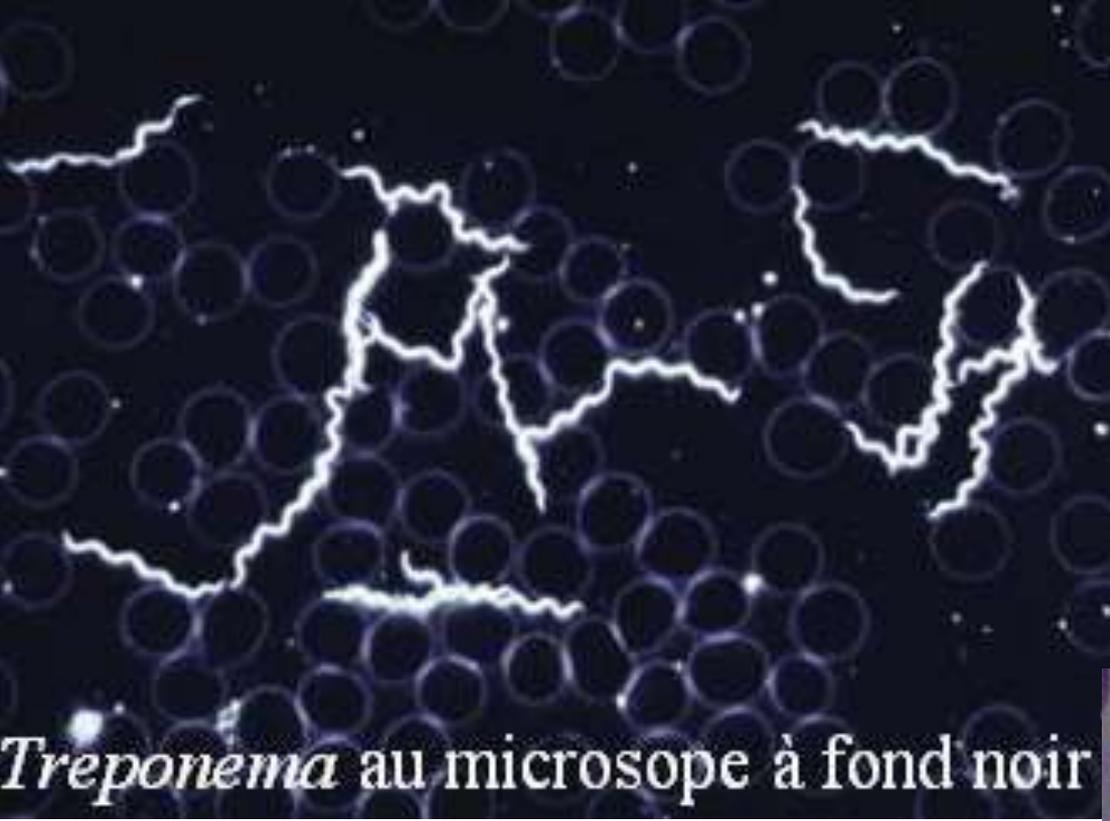
Avec le microscope à fond noir, seuls les rayons lumineux diffractés par l'objet concourent à la formation de l'image.

# *Microscope en fond noir*



# *Microscope en transmission*





*Treponema* au microscope à fond noir

**Globules rouges et blanc**  
**Obj. 40x - fond noir léger**



## B. Le microscope polarisant

### 1. Principe

La lumière polarisée, contrairement à la lumière naturelle, est une lumière qui vibre dans une seule direction.

Pour obtenir une polarisation de la lumière, la lumière normale est filtrée par des dispositifs qui ne laissent passer qu'une seule catégorie de vibrations parmi toutes celles qui la composent. Deux lentilles sont placées sur le trajet de la lumière, l'une sur le condenseur (**polariseur**), l'autre sur l'oculaire (**analyseur**).

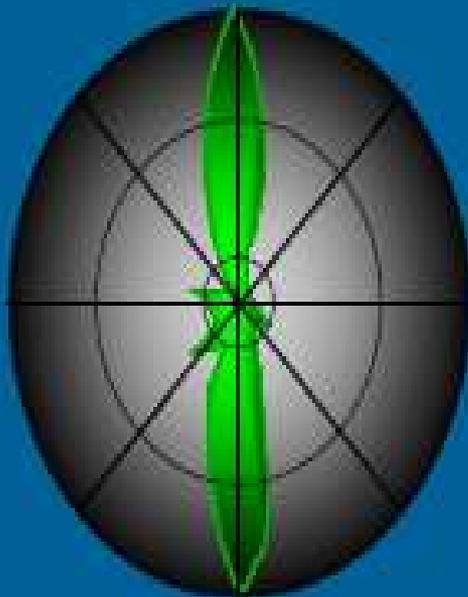
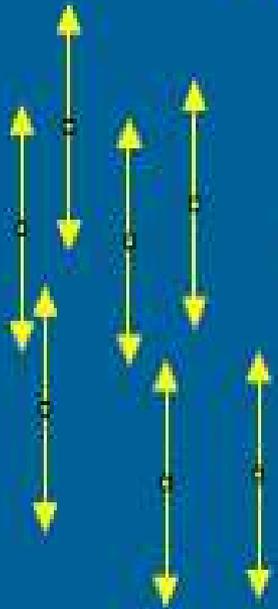
### 2. Applications

Observation des régions biréfringentes (structures cristallines et semi-cristallines).

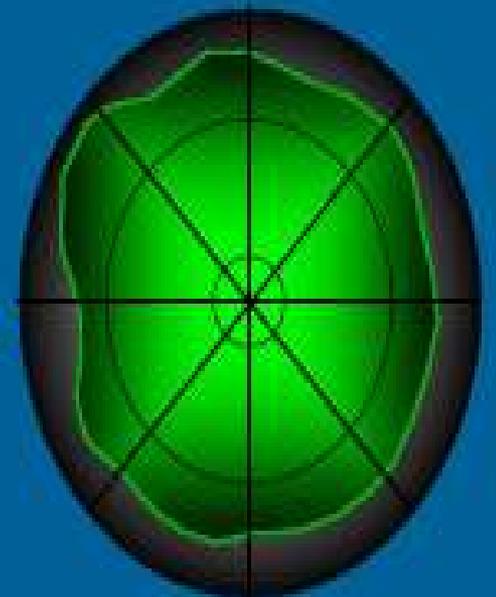
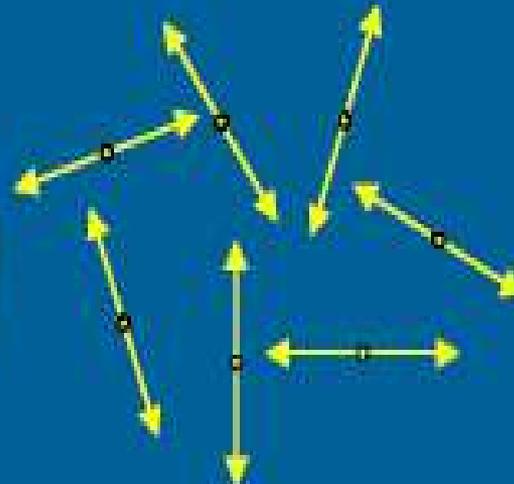
La théorie ondulatoire de la lumière prétend que celle-ci, à l'état naturel, vibre de façon aléatoire dans toutes les directions qui sont perpendiculaires à son axe de propagation.

Le microscope polarisant offre la possibilité de sélectionner le plan de vibration des rayons lumineux, et d'orienter l'objet à volonté par rapport à ce plan.

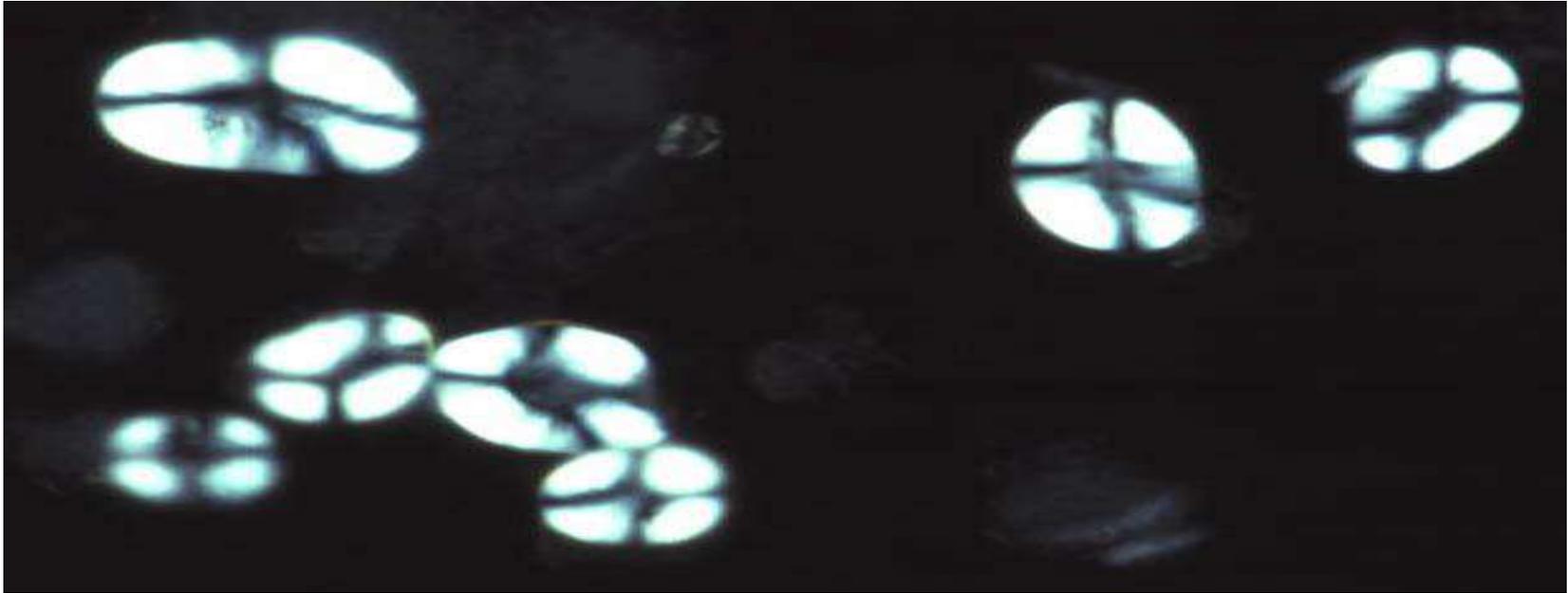
Faisceau polarisé



Faisceau non-polarisé



- L'utilisation la plus générale du microscope polarisant est d'ordre **minéralogique**.
- Il permet en effet, par étude des propriétés optiques d'une lame mince de roche, d'en déterminer les divers constituants, qui, suivant leur nature et le plan de vibration des rayons lumineux, prennent une couleur déterminée.



*Des grains d'amidon observés au microscope polarisant présentent le phénomène de la croix noire.*

*Cela montre que les molécules d'amidon sont orientées de manière rayonnante à partir d'un point central, le hile.*

## C. Le microscope à contraste de phase

En microscopie, on peut distinguer deux catégories d'objets: les *objets d'amplitude* et les *objets de phase*.

- Les corps plus ou moins colorés ou noirâtres, que ce soit naturellement ou après un traitement spécifique, constituent la catégorie des **objets d'amplitude**.

Ce sont ceux que l'on étudie à l'aide du microscope à fond clair.

- Au contraire, les objets transparents, difficilement observables en fond clair, font partie des **objets de phase**. Ce sont ceux qu'on observe par contraste

## C. Le microscope à contraste de phase

Il utilise le fait que lorsque la lumière traverse la cellule, elle rencontre des structures qui vont dévier ses ondes, donc celles-ci vont sortir soit en phase, soit déphasées.

Cette différence sera à l'origine d'un léger contraste qui fera apparaître les différentes structures intracellulaires qui possèdent des indices de réfraction différents.

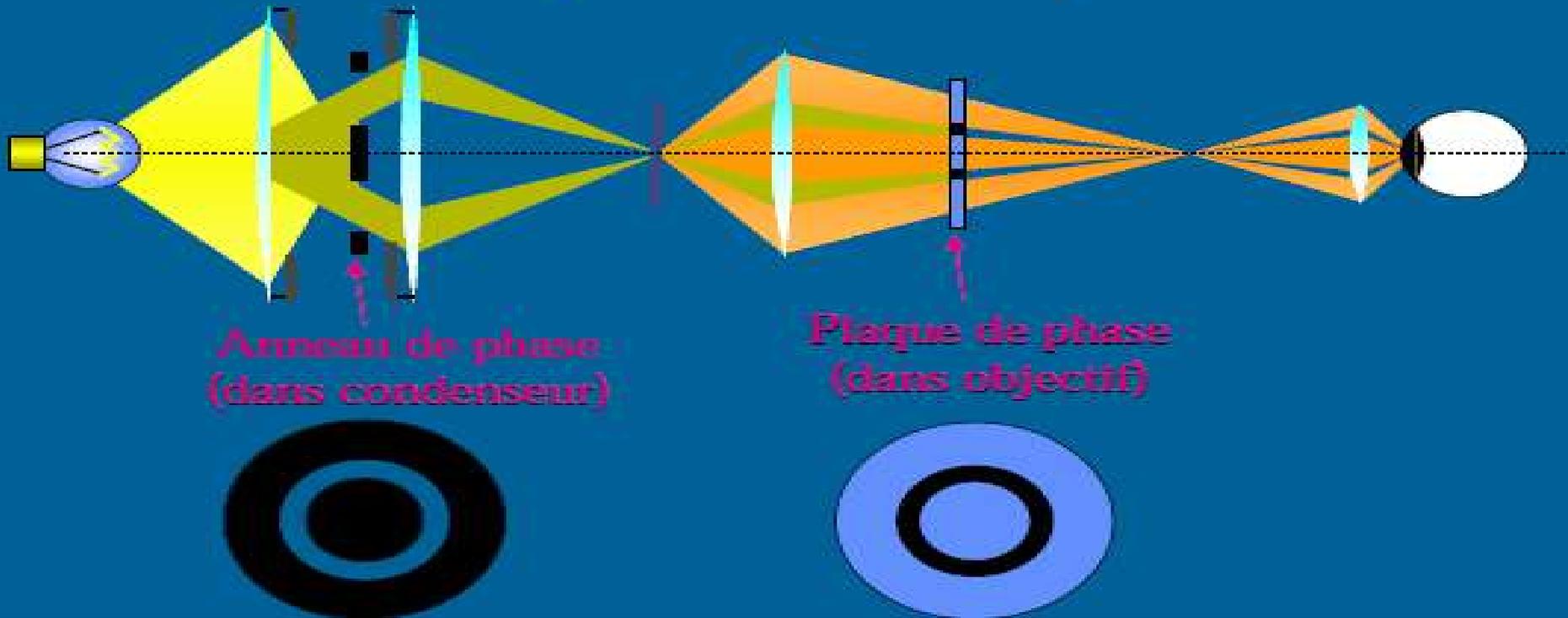
### 1. Principe

- a. Objectif avec anneau de phase intégré
- b. Modification de la phase des rayons lumineux en variation d'intensité lumineuse

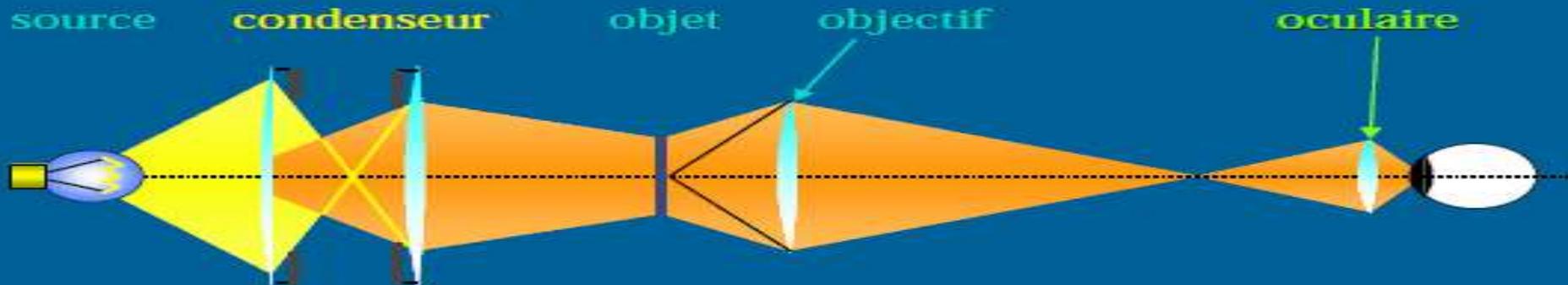
### 2. Applications

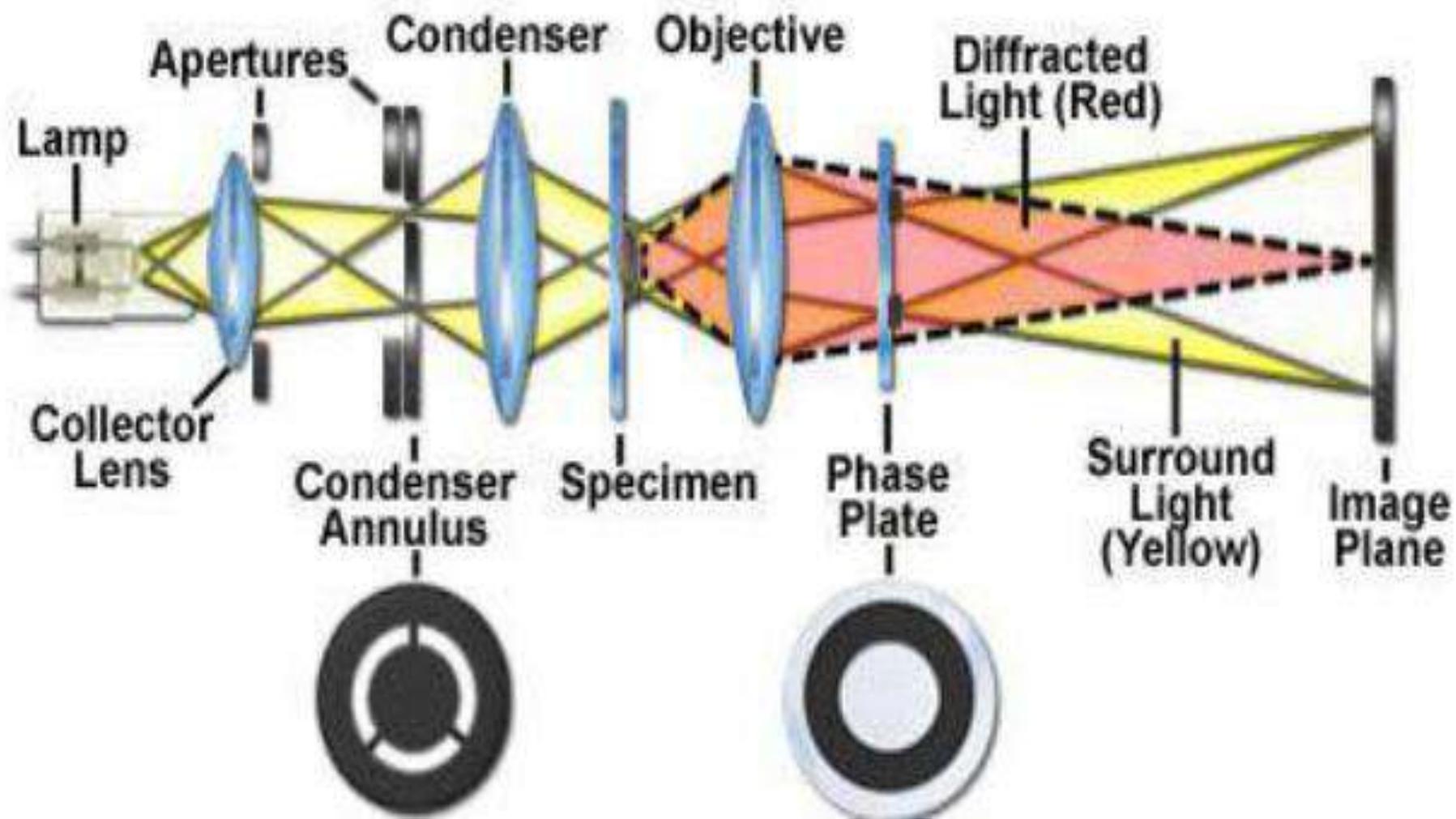
- a. Observation de cellules vivantes

## *Microscope à contraste de phase*



## *Microscope en transmission*





## Microscopie à contraste de phase

Il y a un phénomène de halo, c'est-à-dire qu'on voit une ligne blanche autour des reliefs même si l'image reste plate. Il n'y pas de réel relief mais une impression de relief dû au contraste de l'image.

Le contraste de phase donne du contraste à des objets/éléments qui n'en ont pas.



Exemple : cellules en culture dans une boîte.

## D. Microscopie à contraste interférentiel différentiel (DIC)

Appelée aussi technique Nomarski.

### 1.Principe

- utilise de la lumière polarisée avec un jeux de filtres spéciaux.
- donne une vision en trois dimensions d'un objet translucide.
- les images sont observées avec un relief ombré.

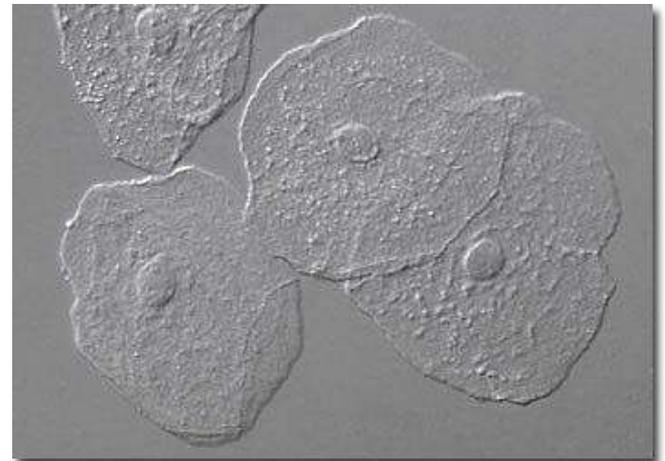
### 1.Applications

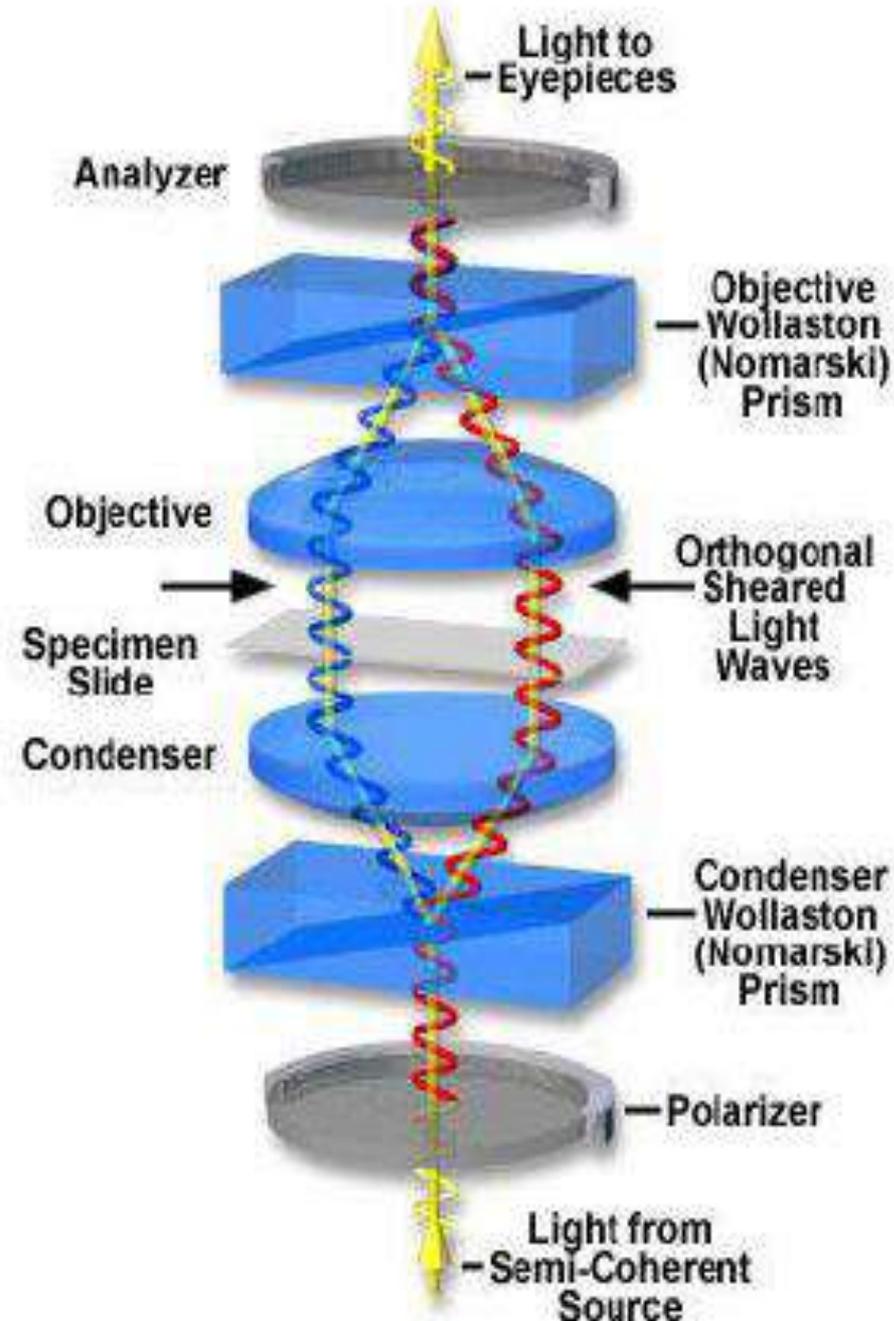
Observation de cellules vivantes

Contraste de phase

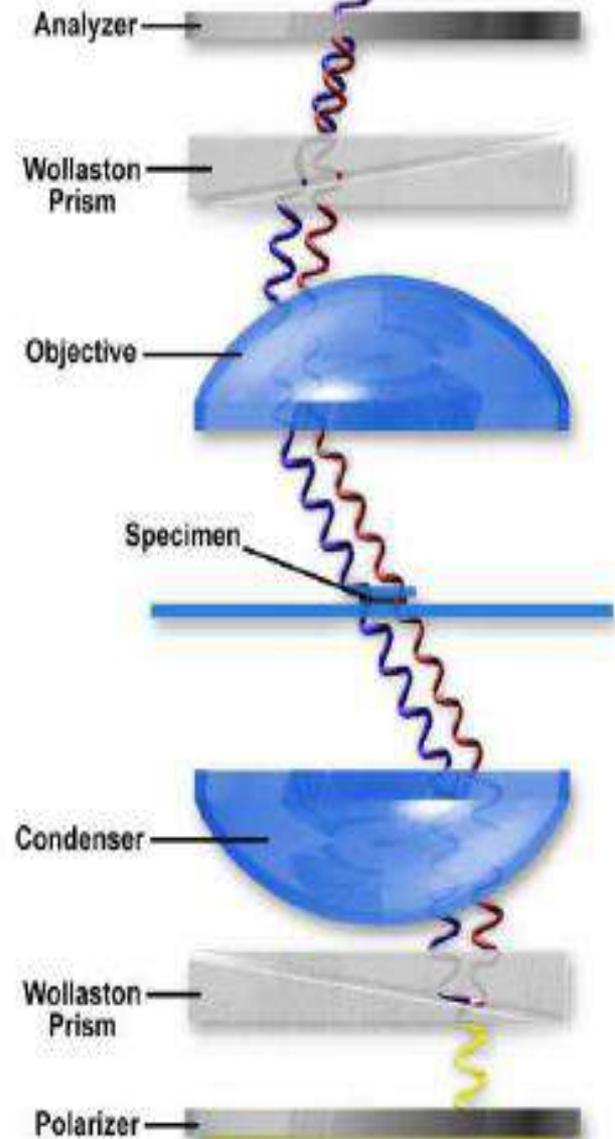


Contraste interférentiel





## Differential Interference Contrast Microscopy



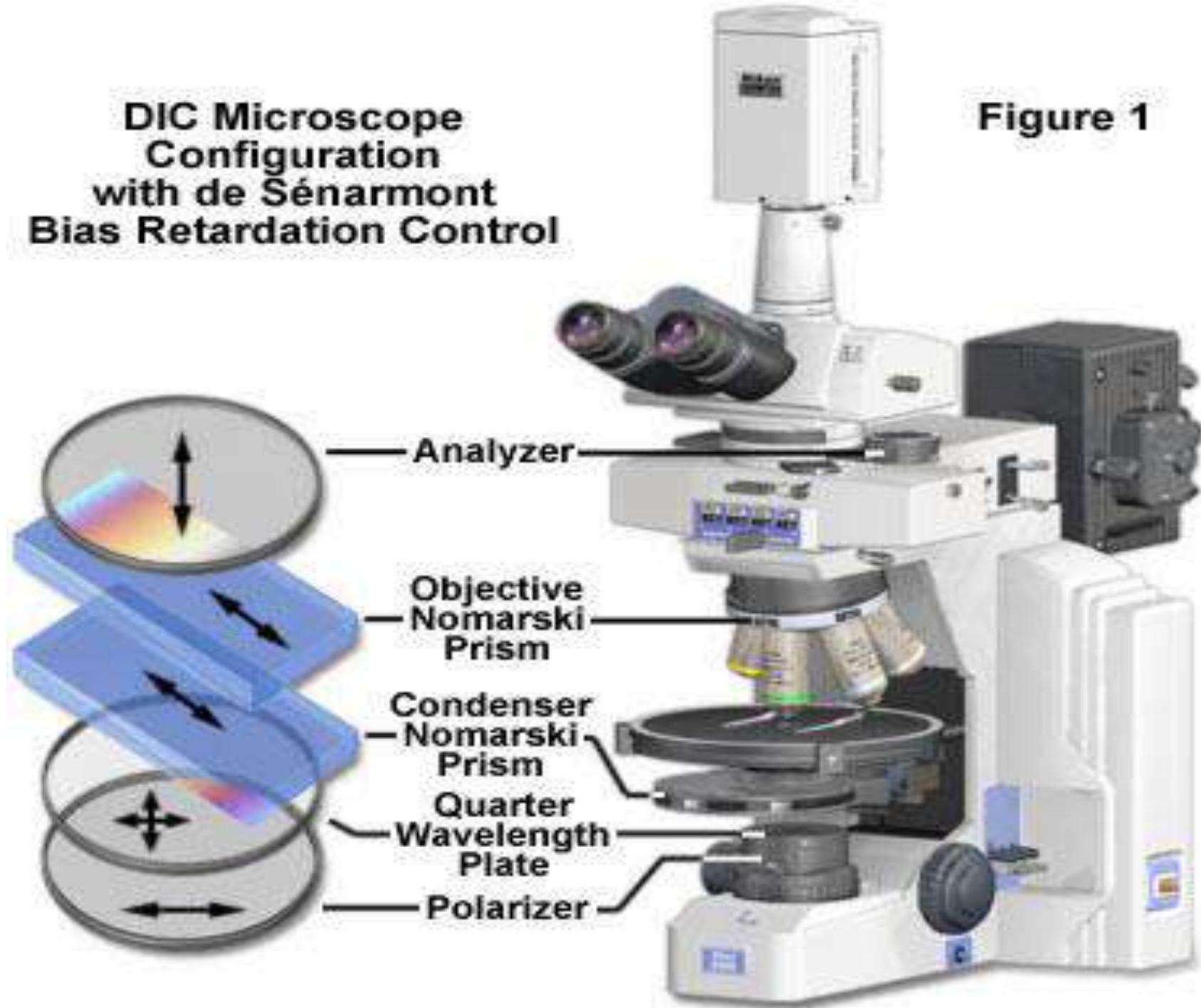
On éclaire l'échantillon avec une lumière séparée en deux polarisations à l'aide d'un prisme de Wollaston.

Ces deux rayons vont traverser l'échantillon en passant par des chemins qui peuvent être un peu différents, puis ils seront combinés à nouveau par un deuxième prisme pour former des interférences.

Ces interférences révèlent les structures intracellulaires, en particulier les membranes (qui présentent souvent une forte variation d'indice de réfraction).

**DIC Microscope  
Configuration  
with de Sénarmont  
Bias Retardation Control**

**Figure 1**





LM | 25  $\mu$ m

**Differential interference contrast (DIC) microscopy.**

## E. Le microscope en fluorescence

### 1. Principe de la fluorescence

#### 1. C'est l'émission de lumière suite à l'absorption de photons:

Les molécules fluorescentes (endogènes, exogènes) absorbent la lumière d'une longueur d'onde spécifique ( $\lambda$  d'absorption) et émettent une lumière différente ( $\lambda$  d'émission)

#### 2. Différents types de fluorescence

*1. Primaire : produite naturellement par certaines substances biologiques (ex : chlorophylle)*

*2. Secondaire : obtenue artificiellement en liant un composé non fluorescent avec un composé fluorescent (fluorochromes)*

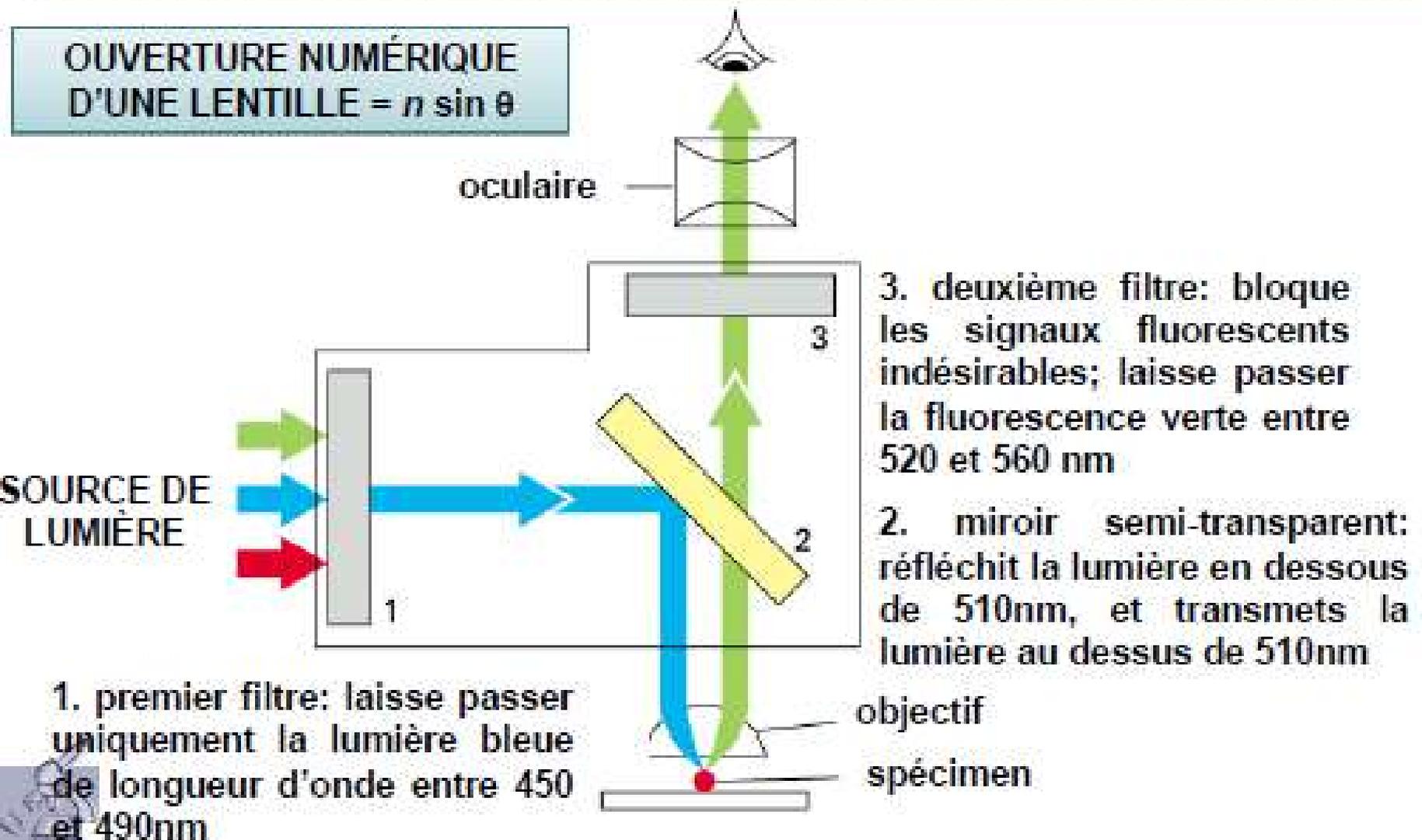
### 2. Les microscopes à fluorescence

a. A lumière transmise

b. A lumière réfléchie (épifluorescence)

# Le microscope à fluorescence augmente la sensibilité de détection d'un signal

OUVERTURE NUMÉRIQUE  
D'UNE LENTILLE =  $n \sin \theta$



Acquisition d'images  
photos classiques

Ou photos  
numériques

oculaires

condenseur  
et sa tourelle

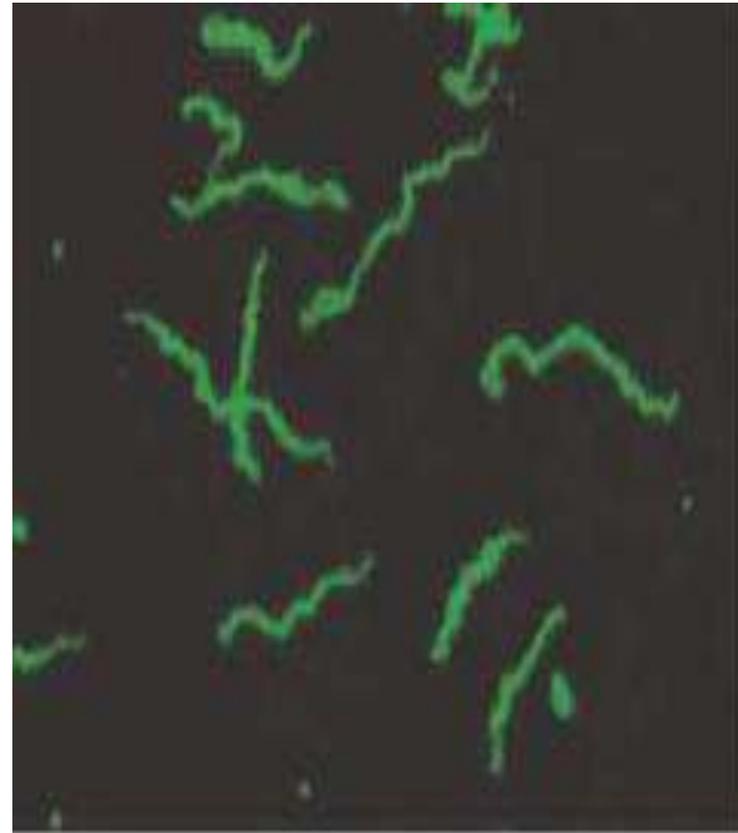
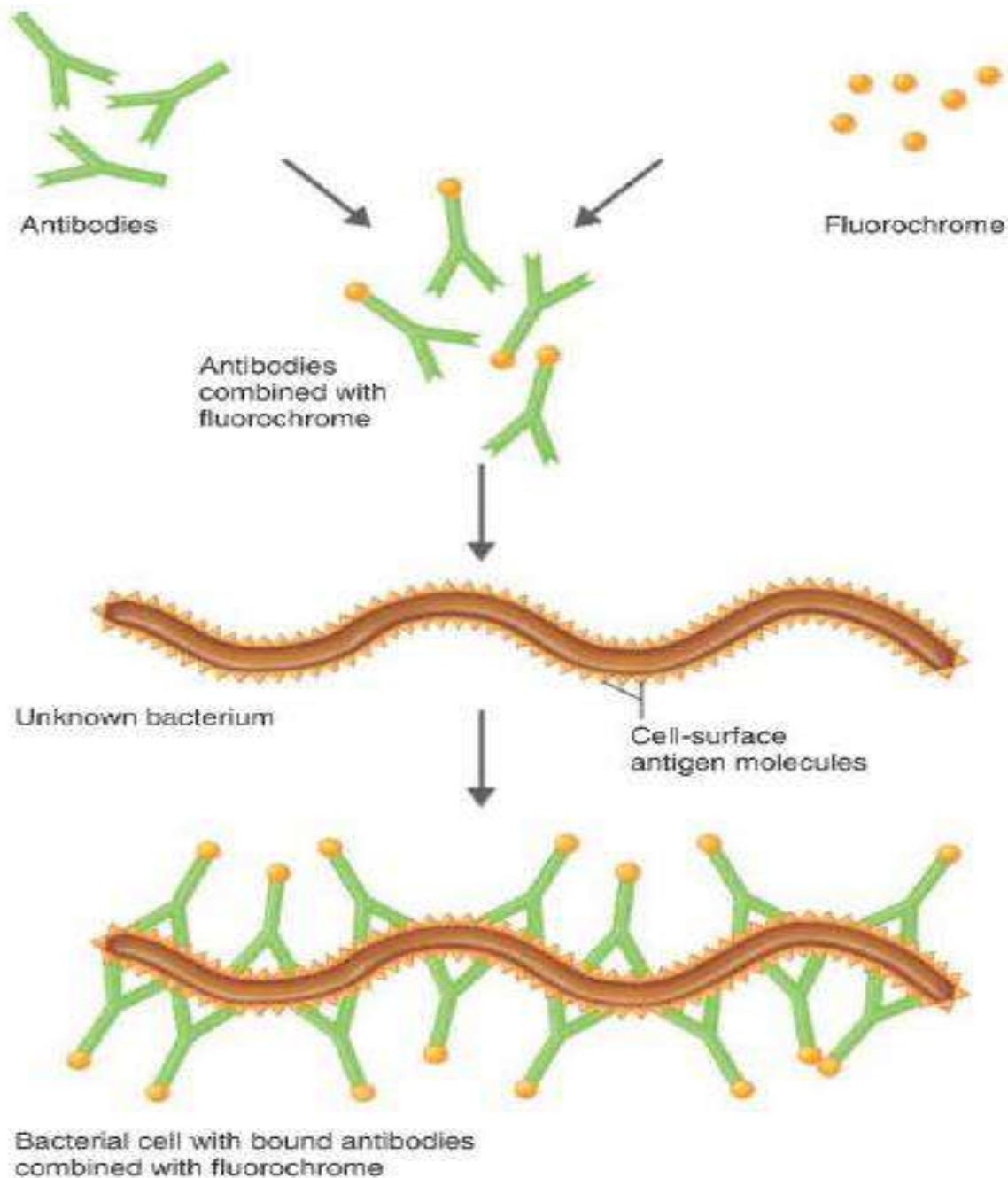
Objectifs sur  
le revolver

platine orientable

condenseur  
et sa tourelle

lampe  
halogène  
tungstène



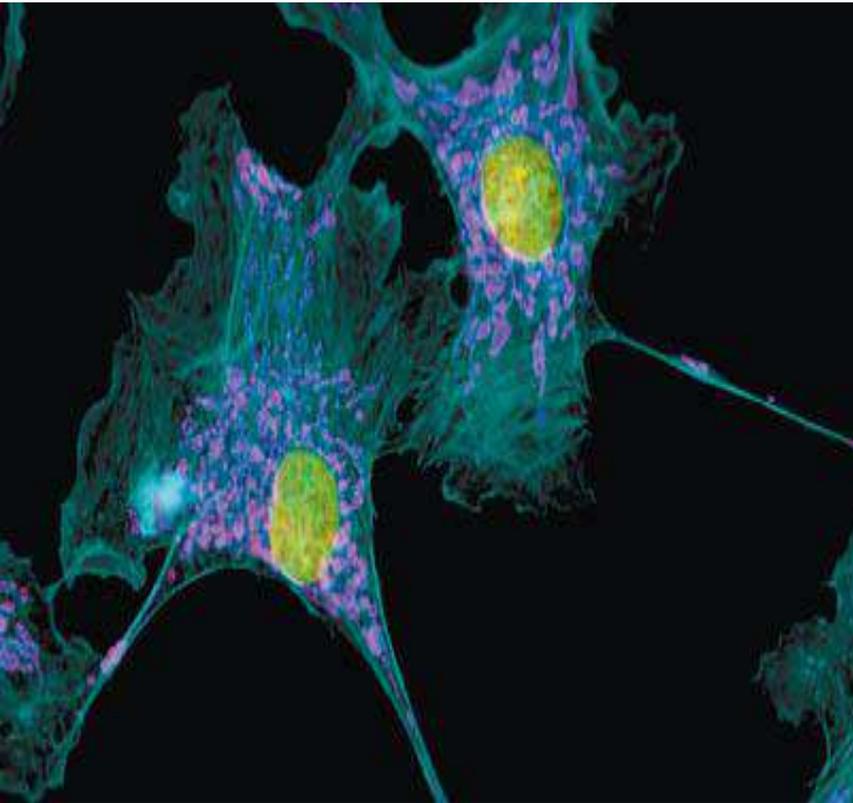


Bacterial cell with bound antibodies combined with fluorochrome

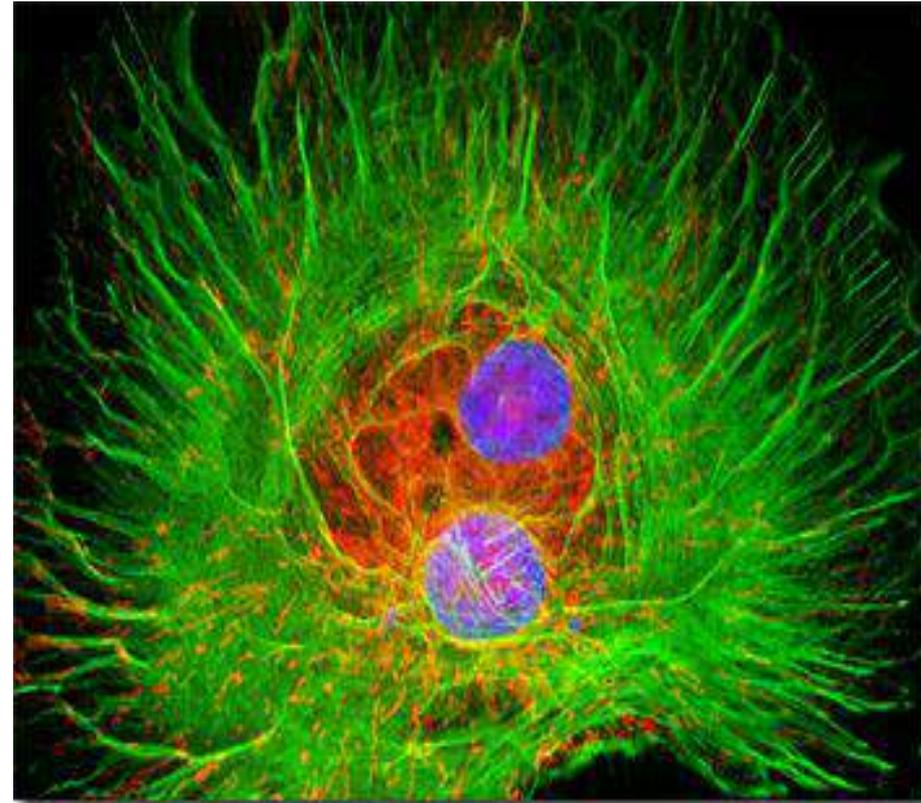
(a)

### 3. Applications :

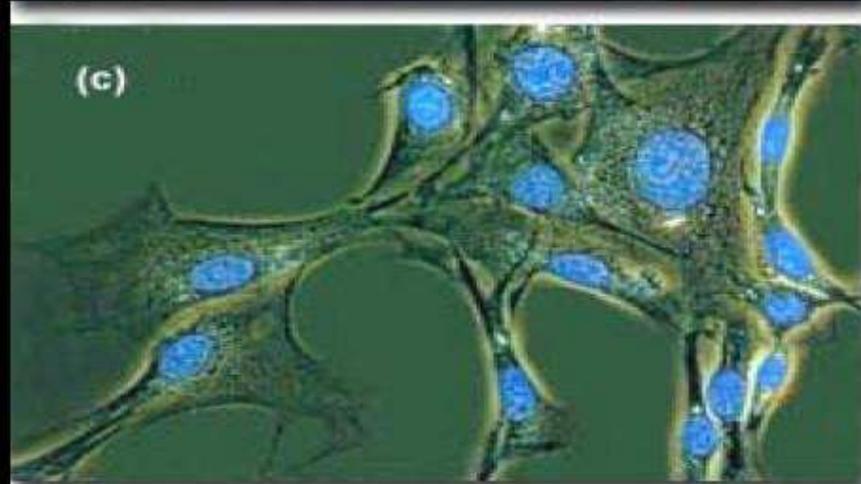
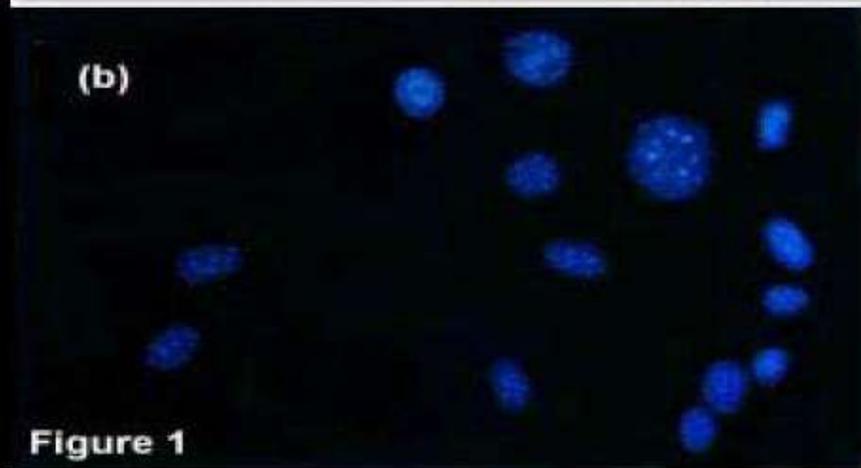
- observation de cellules vivantes → Etude de la **physiologie cellulaire**.
- **Bactériologie** (cytométrie sur filtre)
- **Immunofluorescence** (diagnostic clinique: pathologie)



M. en fluorescence



M. en épi-fluorescence



**Combinaison (c) de la  
microscopie à contraste de  
phase (a) et à  
épifluorescence (b) pour  
améliorer la visualisation  
de cellules (l'ADN du  
noyau en (b) est coloré  
spécifiquement avec un  
agent fluorescent)**

Figure 1

# F. Le microscope confocal

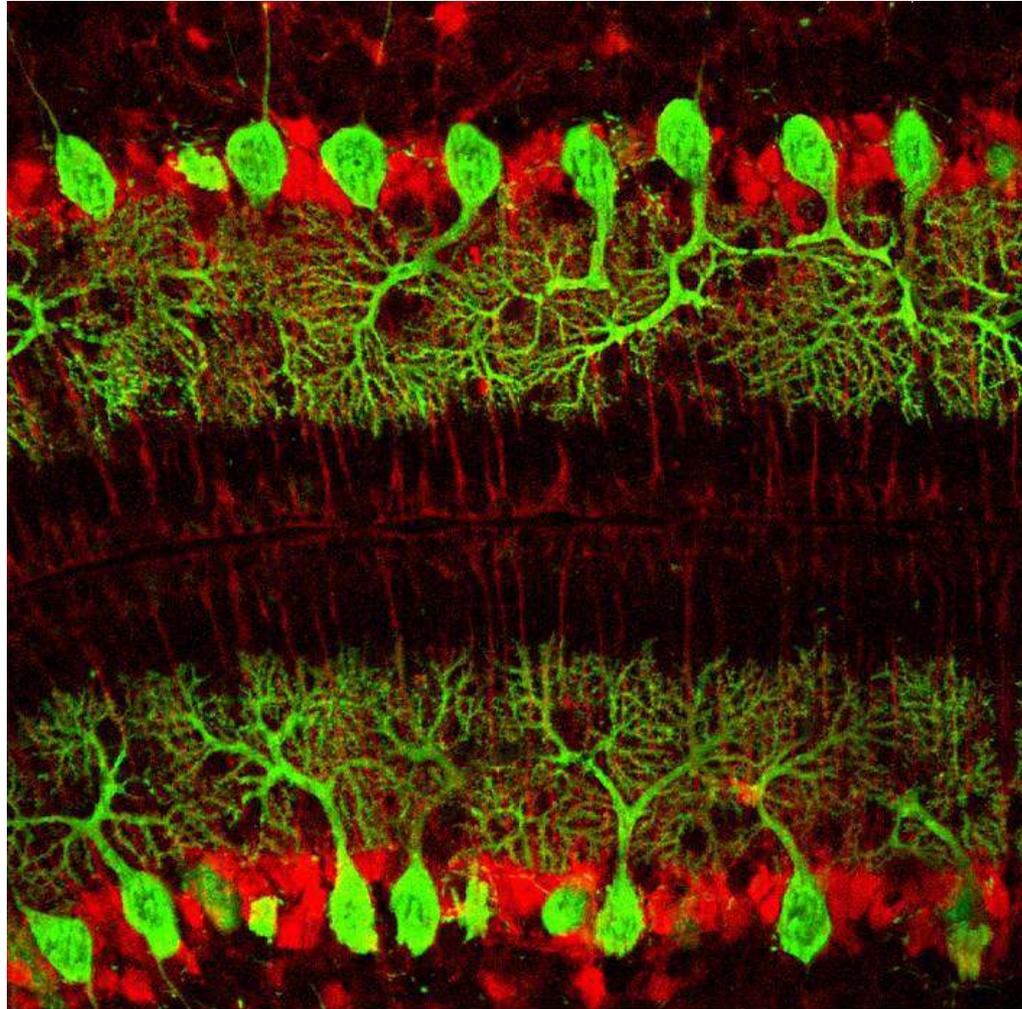
résulte des progrès récents

## 1. Principe

Ce microscope permet de collecter l'image réfléchie au niveau d'un plan focal et d'éliminer les images du dessus (dessous) de ce plan par balayage laser.

## 2. Caractéristiques

- Réalisation de coupes optiques
- obtention d'images d'une netteté exceptionnelle



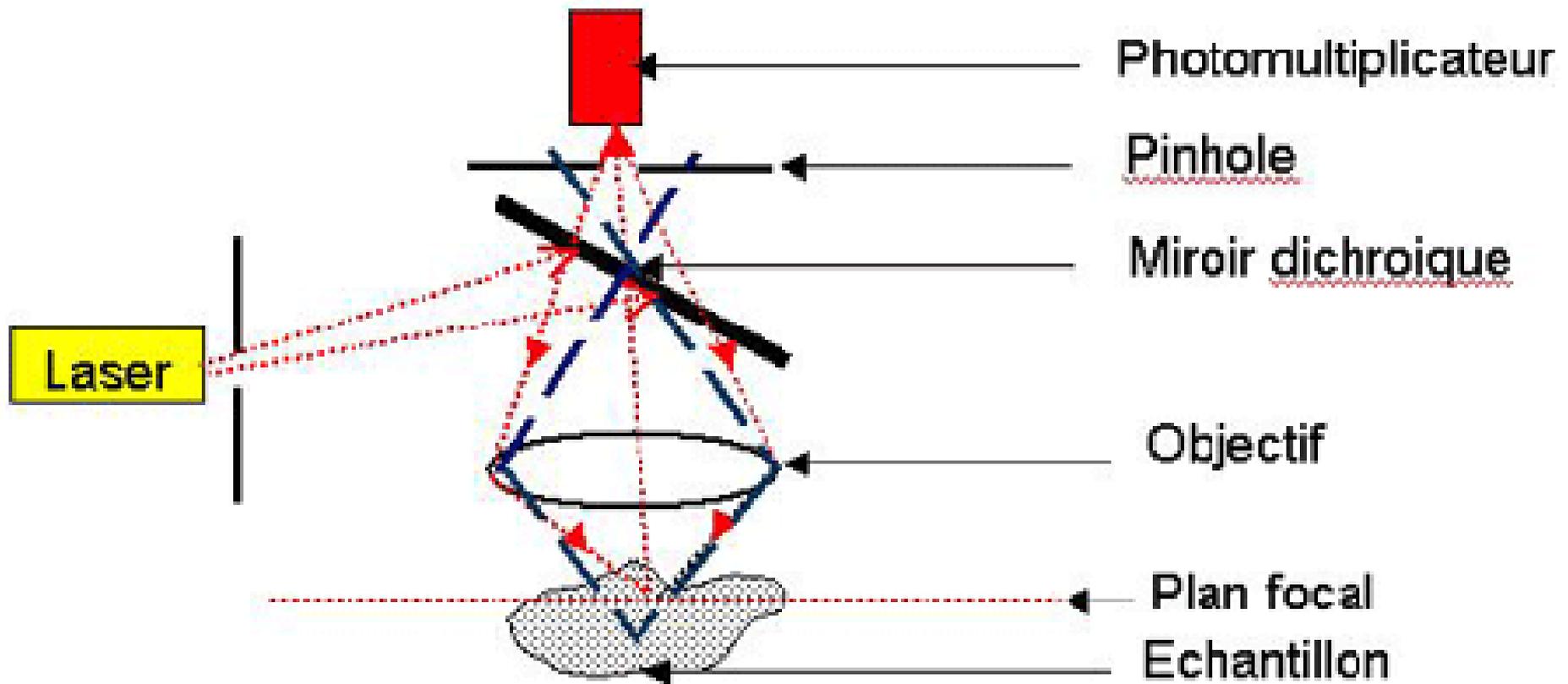
**Coupe de cervelet de souris.**

Vert	Calbindine (Alexa488)	Excitation : 488nm - Collection : 500/535
Rouge	S100b (Cy3)	Excitation : 543nm - Collection : 550/630

(Acquisition séquentielle, ligne par ligne)

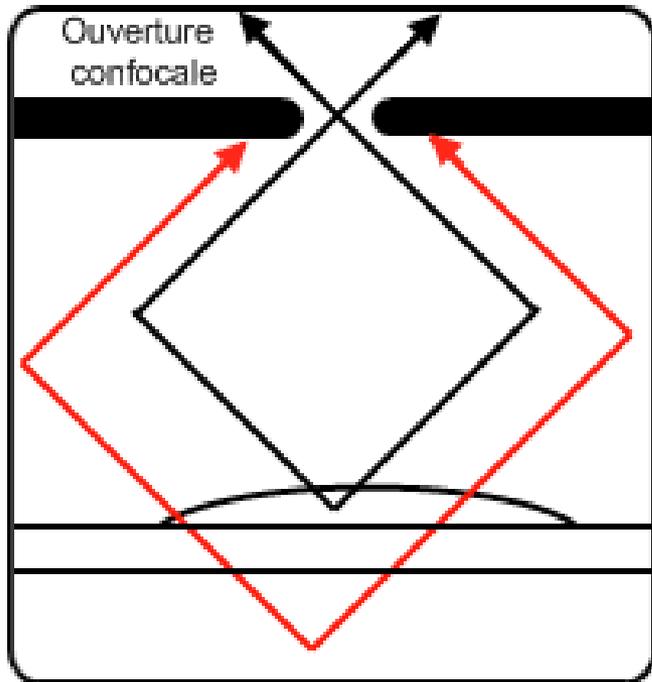
Les deux molécules sont des calcioprotéines. La calbindine met en évidence les cellules de Purkinje, tandis que la S100b marque les cellules de la glie de Bergmann.

- Source lumineuse : un **laser** qui balaye rapidement le spécimen dans toute son épaisseur et sa largeur.
- Les images produites sont enregistrées par un **ordinateur**
- Forme une *image composite* de l'ensemble de la cellule
- Visualisation de **l'aspect tridimensionnel** de la cellule



- ..... Trajet optique focal
- - - Trajet optique non focal

**Principe du microscope confocal**

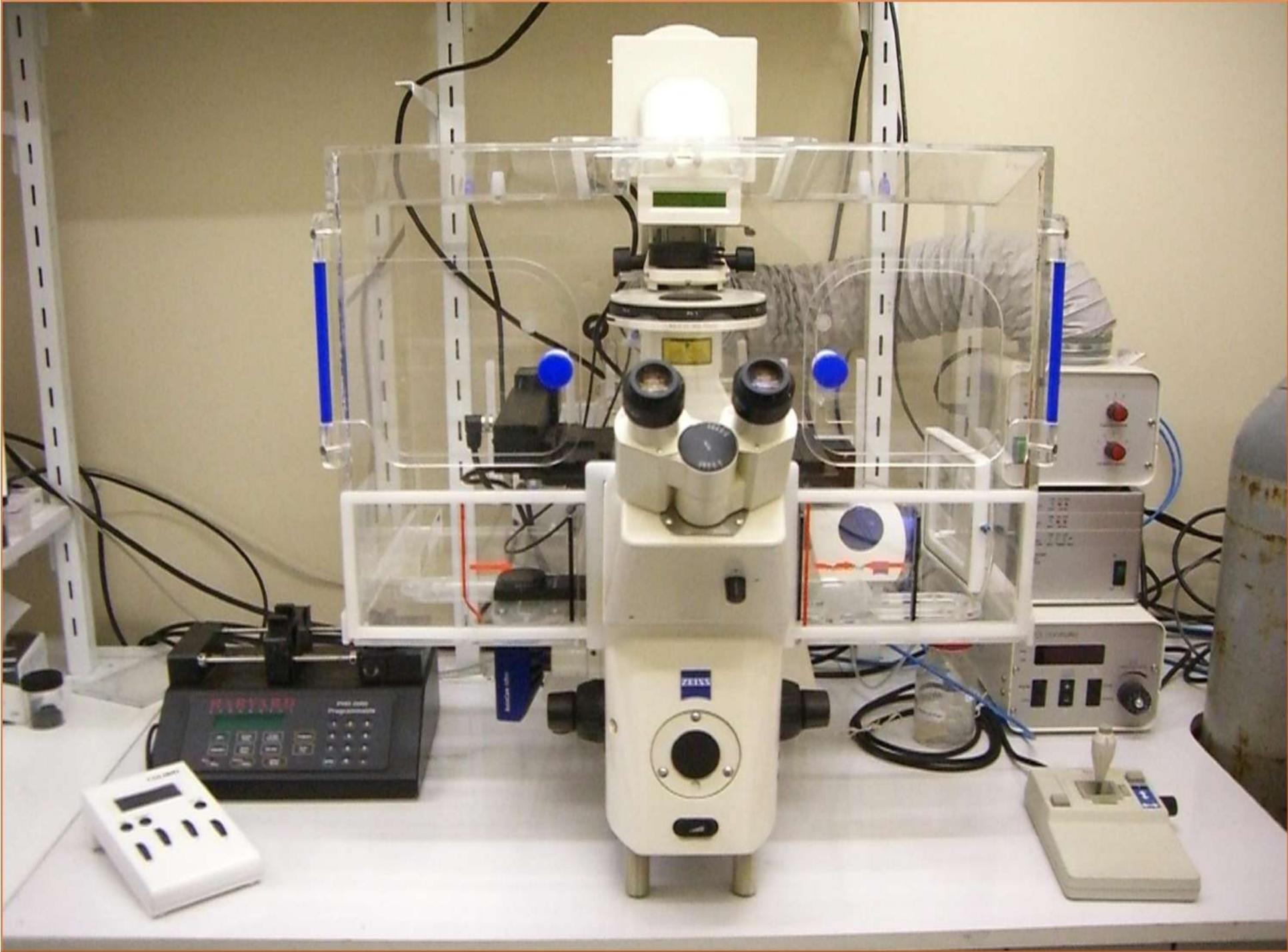


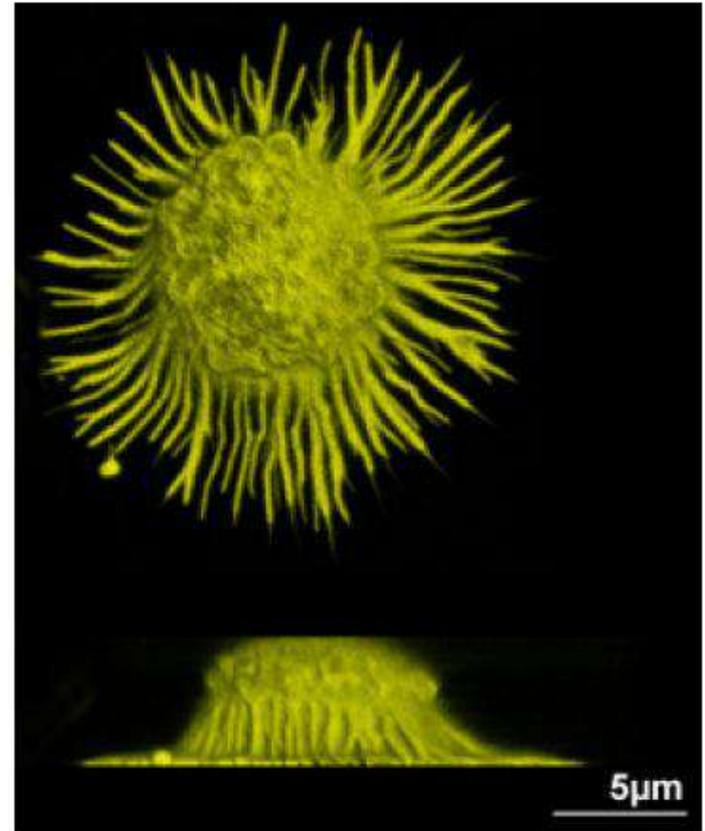
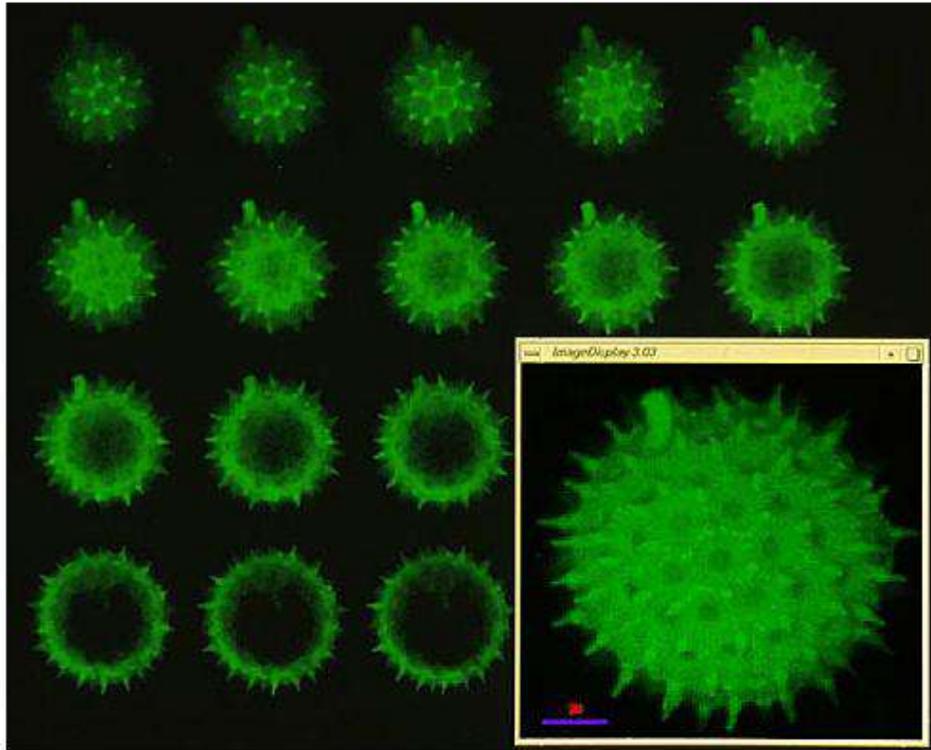
- Le microscope confocal ne recueille que la lumière émise au point sur lequel on s'est focalisé.

- La lumière émise va traverser l'ouverture d'un **diaphragme (ouverture confocale)** qui ne laissera traverser que la lumière venant d'un point précis.

- Le laser va balayer l'objet point par point sur un plan, puis par plan successif.

- Un ordinateur va recréer l'image finale. En chaque point, l'image sera nette.





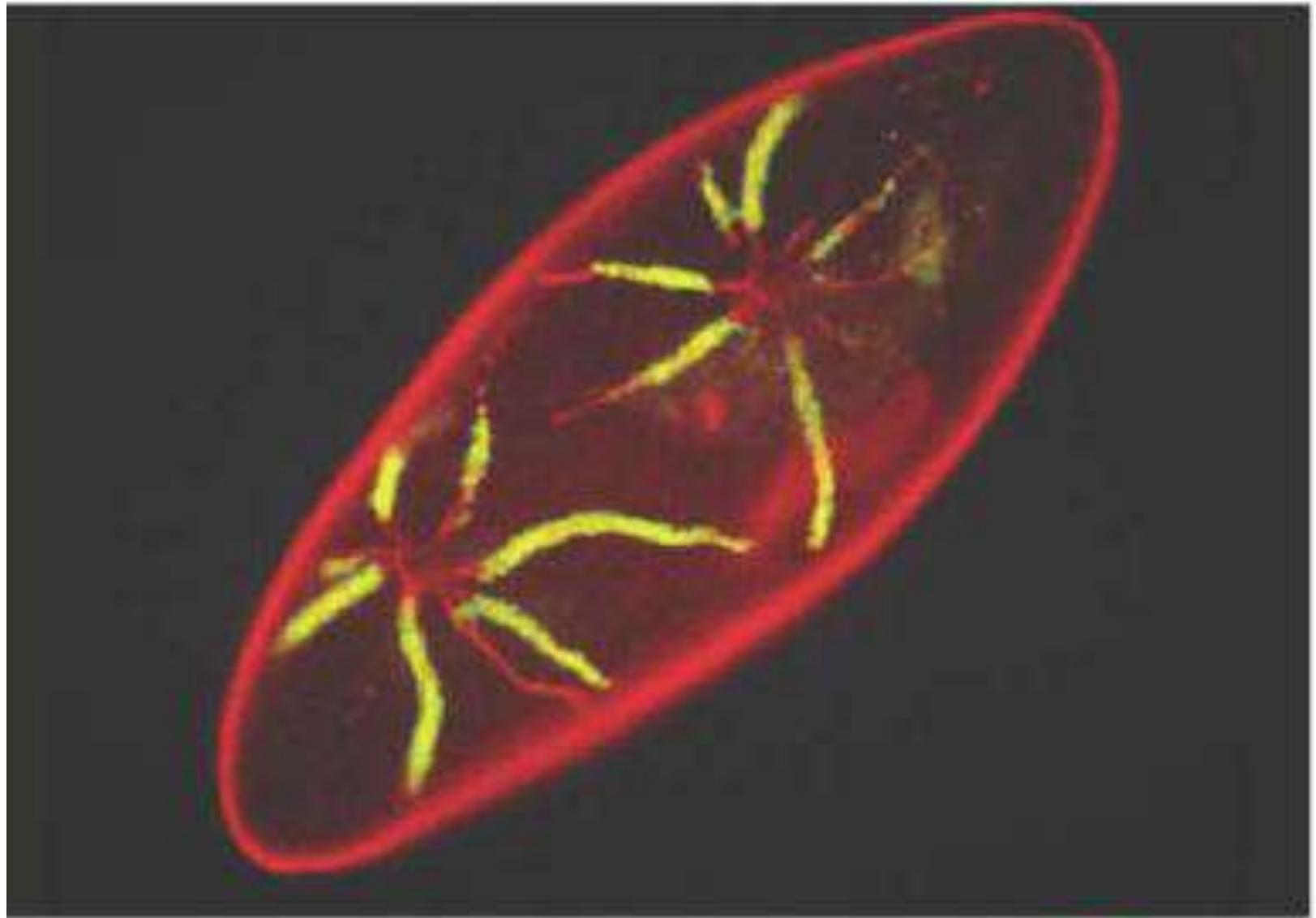
Images obtenues à l'aide de la microscopie confocale  
à balayage

# Applications de la microscopie confocale

## **-Biologie cellulaire:**

Neurobiologie, biologie moléculaire.

- Visualisation de l'**aspect tridimensionnel** de la cellule, et examen de l'intérieur des cellules
- Etude de la physiologie cellulaire et de la biologie moléculaire (exple: la concentration de l'ATP et les ions calcium)
- **Neurologie**
- **Immunologie**
- **Cancérologie**
- **Génétique**
- .....



CF

20  $\mu\text{m}$

# Les différents types d'observation en microscopie optique

## En lumière transmise

Observation en fond clair

Tissu contrasté, coloré ou non

Observation en fond noir

structures fines et/ou réfléchissant la lumière

Observation en contraste de phase

Tissu peu contrasté, très peu coloré ou non

Observation en lumière polarisée

(coupes fines)

Tissu à propriétés biréfringentes

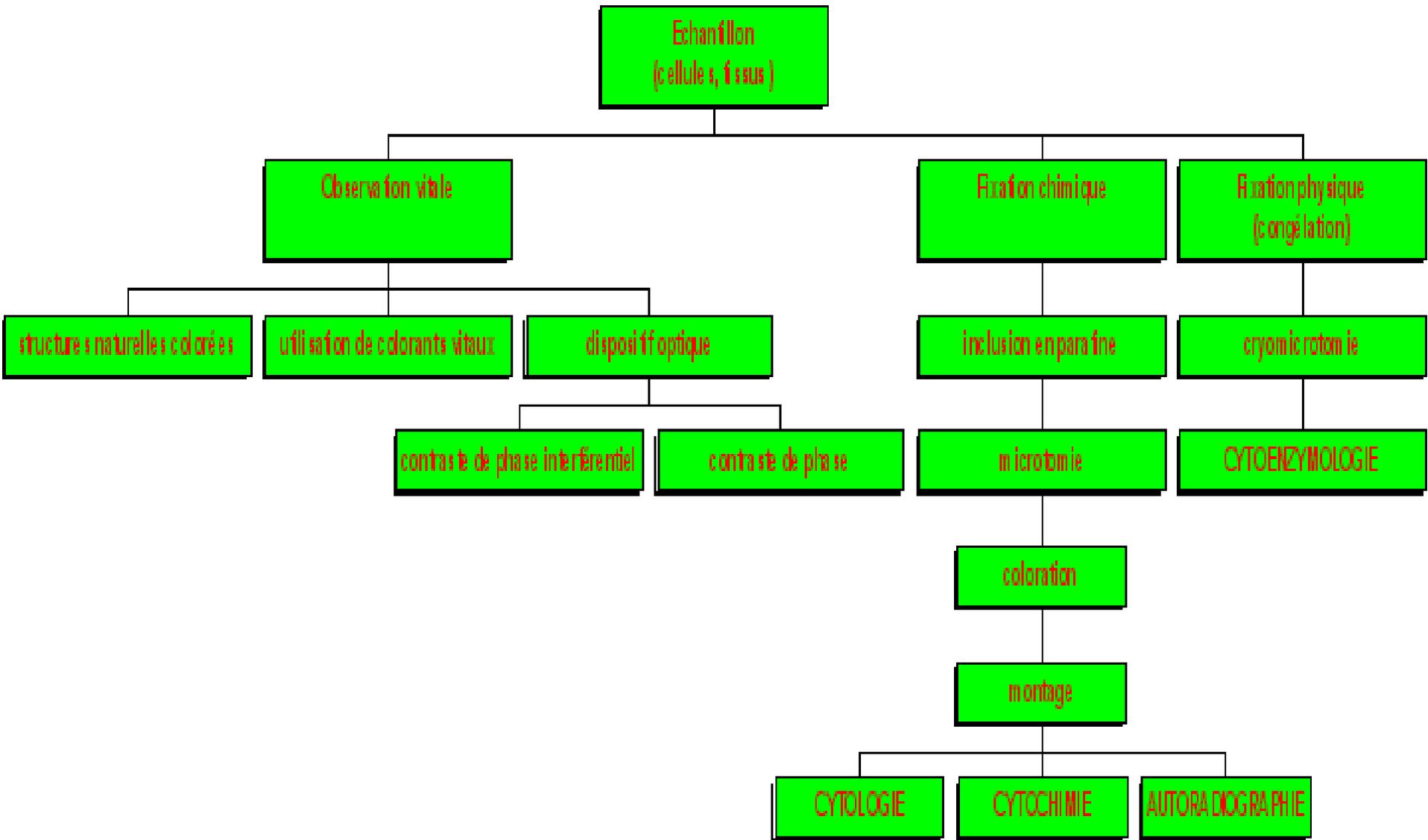
Observation en DIC (contraste interférentiel différentiel)

cellules vivantes ou fixées non colorées

## En épifluorescence

structures ou produits autofluorescents ou marqués par des sondes fluorescentes

Type	principe	nécessite	Cellules vivantes	Cellules fixées
Champs clair	Absorption de la lumière visible	Coloration absorbant la lumière sur échantillon mince	non	oui
Fluorescence	Emission de lumière par molécules fluorescentes	Marquage des cellules par molécules fluorescente	oui	Oui
Contraste de phase	Variation d'épaisseur et d'index de réfraction	Cellules plates	Oui	oui
microscopie en contraste interférentiel (Nomarski)	Gradient d'index de réfraction dans le spécimen	Aucune limitation	oui	Oui
Champs noir	Dispersion de la lumière	Spécimen mince, simple	Oui	Oui
Polarisation	Différence d'index de réfraction pour des faisceaux perpendiculaires de lumière polarisée	Éléments biréfringents (ordonnés le long d'un axe linéaire)	Oui	oui



# Bon courage



## LIENS UTILES 🙌

Visiter :

1. <https://biologie-maroc.com>

- Télécharger des cours, TD, TP et examens résolus (PDF Gratuit)

2. <https://biologie-maroc.com/shop/>

- Acheter des cahiers personnalisés + Lexiques et notions.
- Trouver des cadeaux et accessoires pour biologistes et géologues.
- Trouver des bourses et des écoles privées

3. <https://biologie-maroc.com/emploi/>

- Télécharger des exemples des CV, lettres de motivation, demandes de ...
- Trouver des offres d'emploi et de stage

