

MICROSCOPIE

II/ MICROSCOPE CONFOCAL

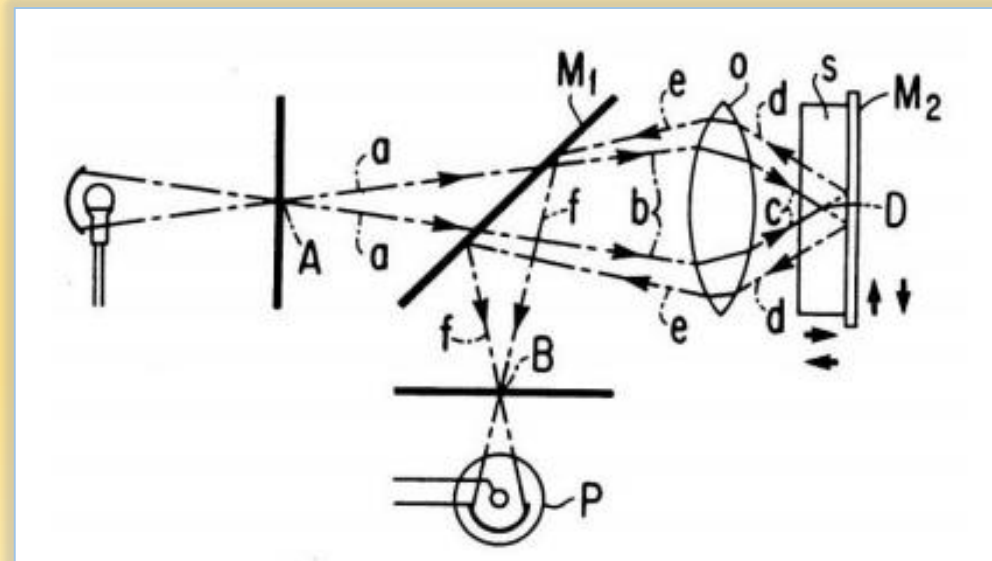
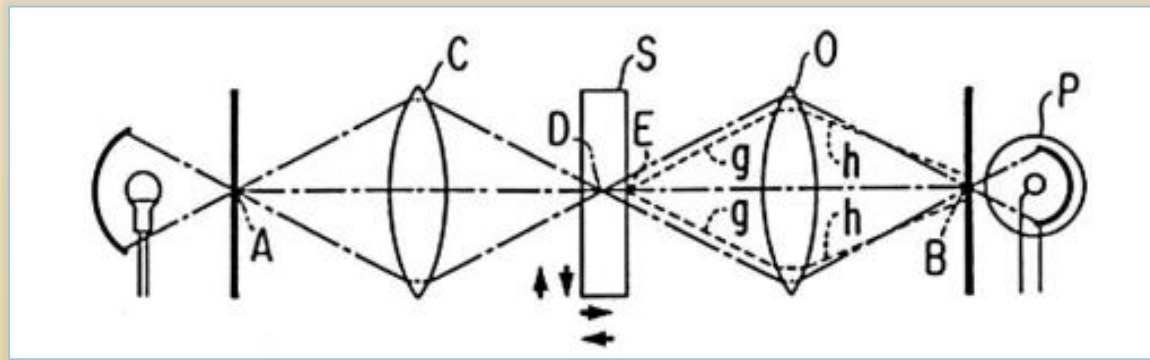


III/ COMPARAISON CONFOCAL AVEC MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION ET MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE



I/ Microscope Confocal

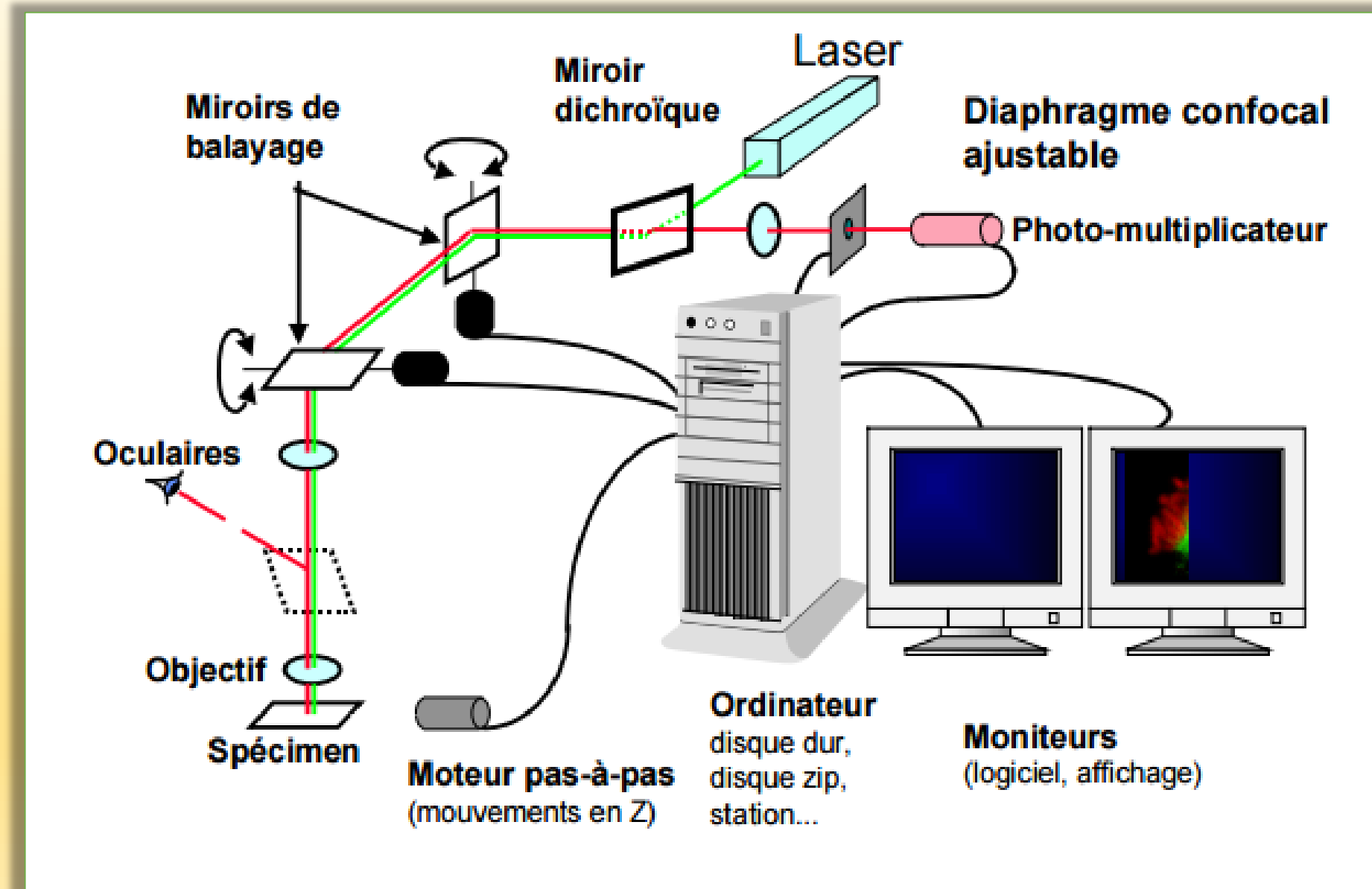
Prototype de Marvin MINSKY et breveté en 1957



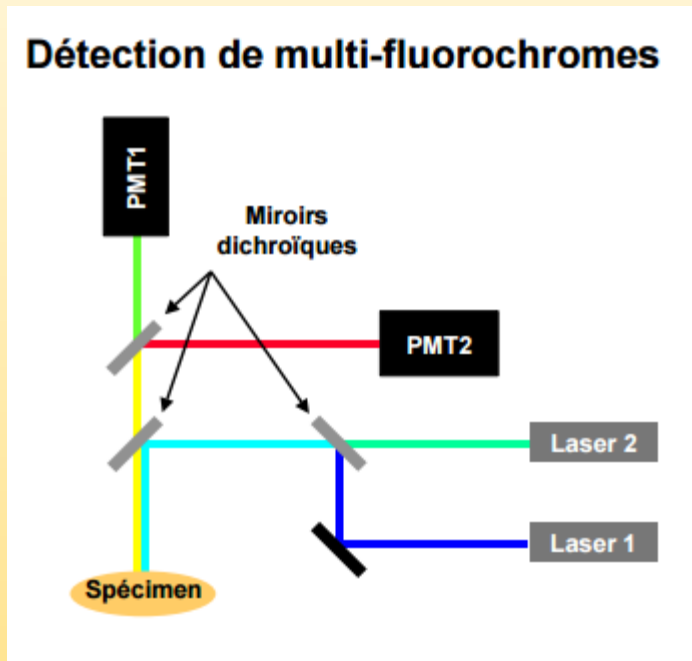
Principe



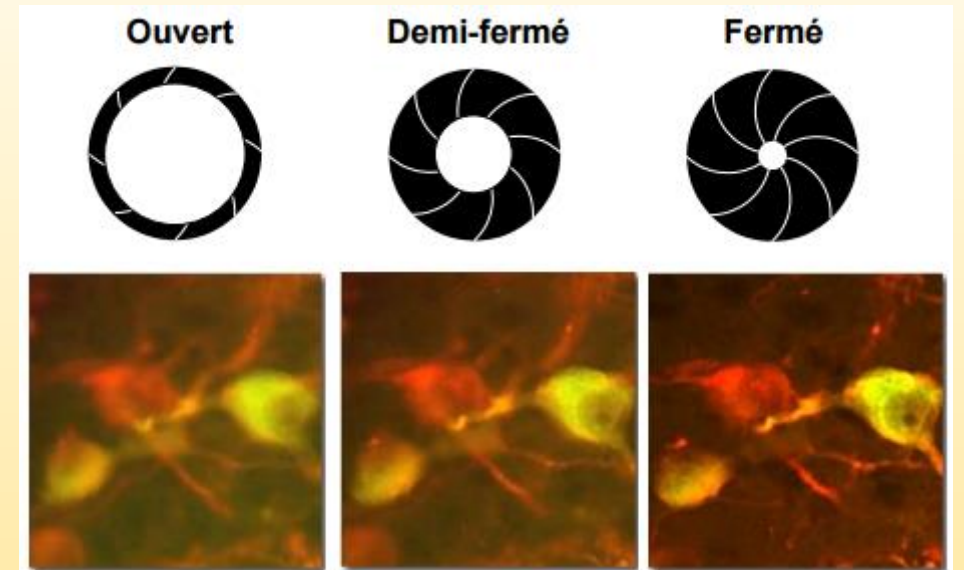
Microscope confocal- FONCTIONNEMENT



MIROIR DICHROIQUE



STENOPE



ECLAIRAGE LASER

Lasers UV (autour de 405nm) → exciter les fluorochromes spécifiques de l'ADN

Laser : unidirectionnel, fréquence pure

TRAITEMENT DE L'IMAGE

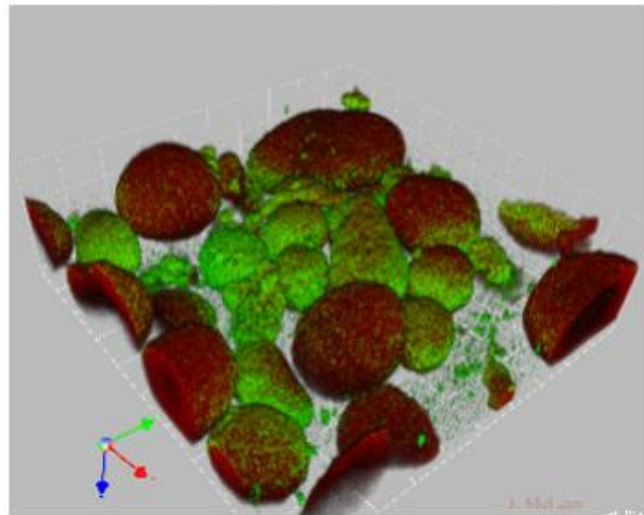
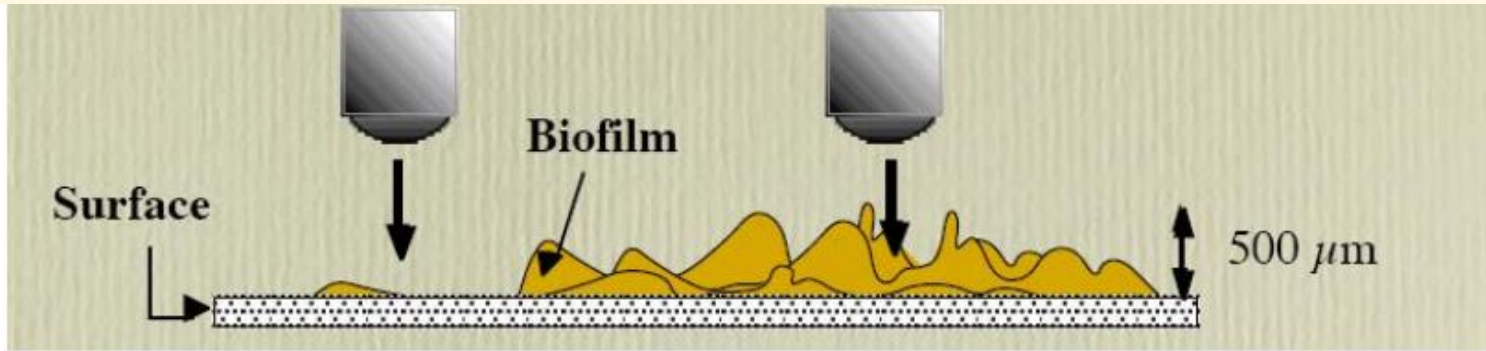
Reconstitution des images en 2D → connections des éléments d'une même image

Avantages

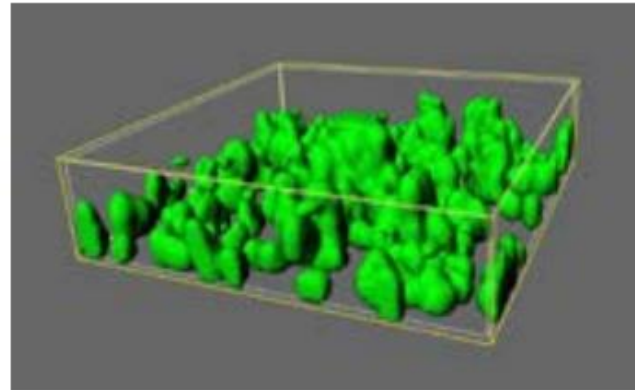
- Pouvoir observer une zone épaisse sans avoir de parties floues
- Permet le balayage en Z
- Avoir une image de l'objet en relief, selon le plan focal choisi (2D et 3D)
- Analyse en temps réel de phénomènes dynamiques
- Analyse de matériel vivant

Inconvénients

- Effets phototoxiques induits par l'excitation laser → cellules détériorées, mortes
- Difficulté du laser à pénétrer dans l'épaisseur de la préparation

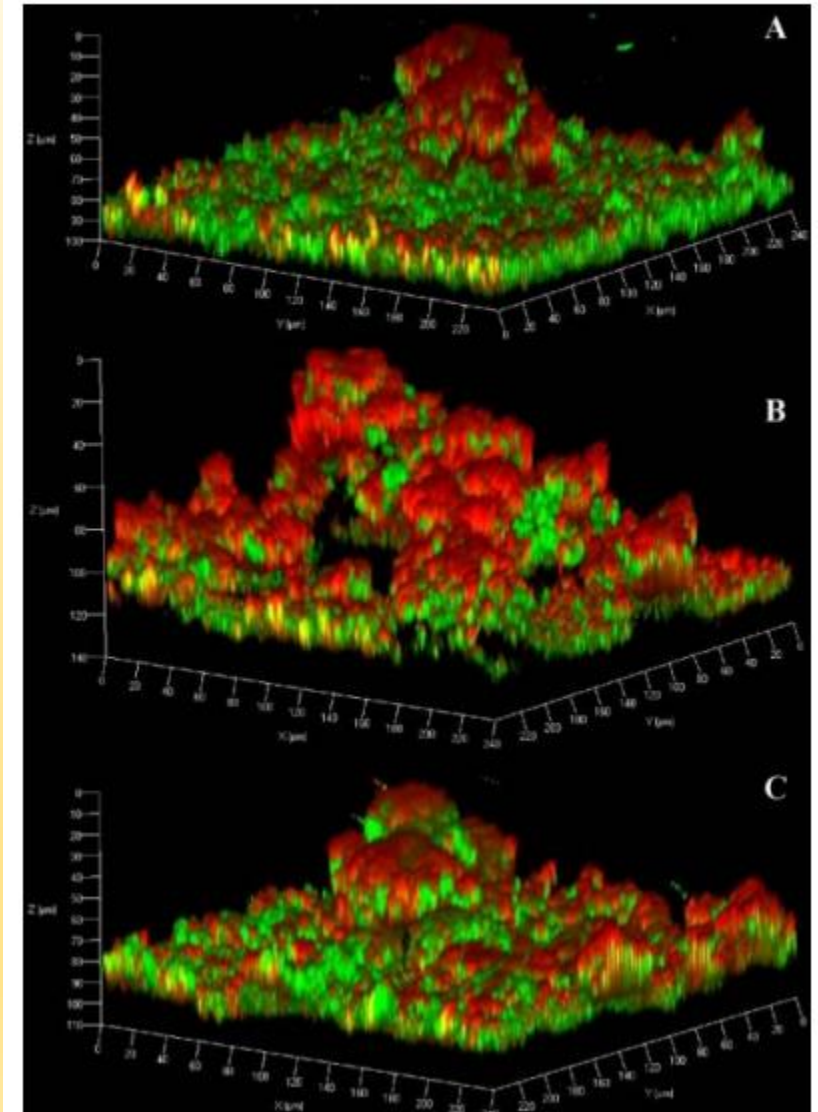


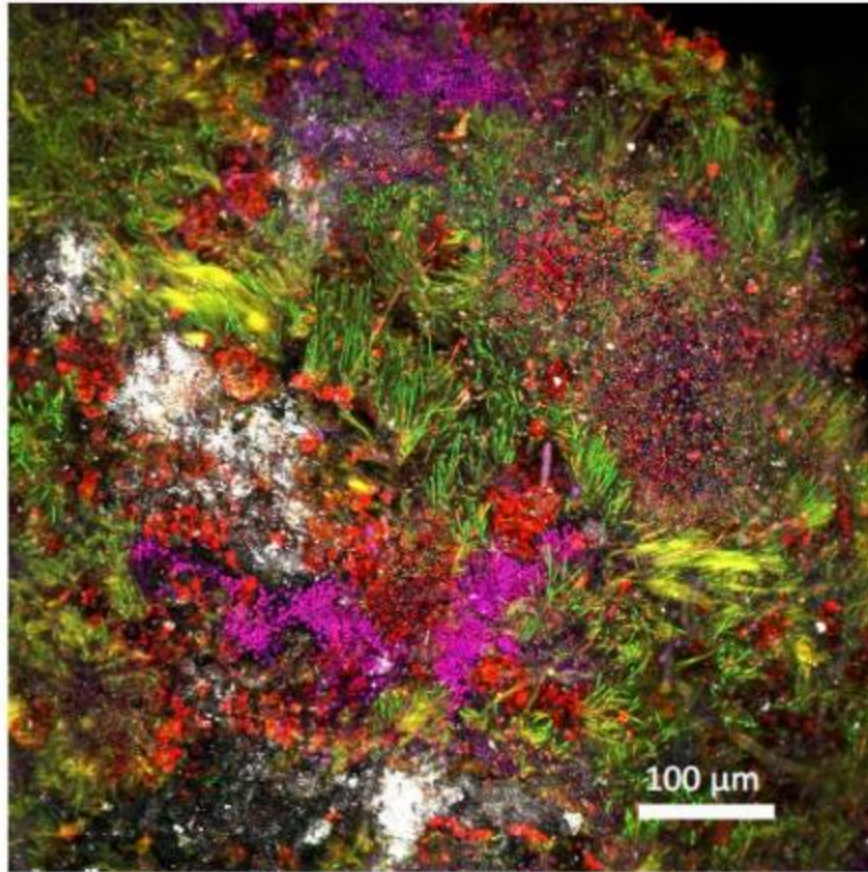
Developing biofilm of *Shewanella oneidensis* MR-1. The three-dimensional structure of biofilms is revealed by live imaging using confocal microscopy. Red color indicates cellular DNA and green color indicates extracellular polysaccharides. Each unit represents 40 microns



Green Fluorescent Protein expressing *S. aureus* strain shown by 3-D reconstruction of a confocal image after several hours of biofilm growth (courtesy of Dr S. Clement). http://www.genomic.ch/research_biofilm.php

S. aureus. Biofilms formés par différents mutants. Marquage Syto-red (vert, cellules vivantes) et Toto-3 (rouge, cellules mortes et ADN)





TRENDS in Microbiology

Figure 1. Maximum intensity projection of a multichannel dataset showing a complex river biofilm landscape. The sample was stained for nucleic acids, lectin-specific glycoconjugates, and β -D-glucans (with a 1-3 or 1-4 linkage). For multichannel imaging of reflection, autofluorescence and fluorescence staining the data were recorded in five separate detector channels in combination with colocalization. Color allocation: green, nucleic acids; red, glycoconjugates; blue, algae; pink, cyanobacteria; yellow, β -D-glucans; white, reflection.

Enormément de progrès dans cette technique ces dernières années



Progrès dans la diversité des fluorochromes : permet de voir des systèmes très hétérogènes et très complexes pour une grande variété de préparation d'échantillons

II/ MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Final image can be displayed on fluorescent screen or photographed.



Electron gun

Specimen holder

Fluorescent screen

© William Ormerod/Visuals Unlimited

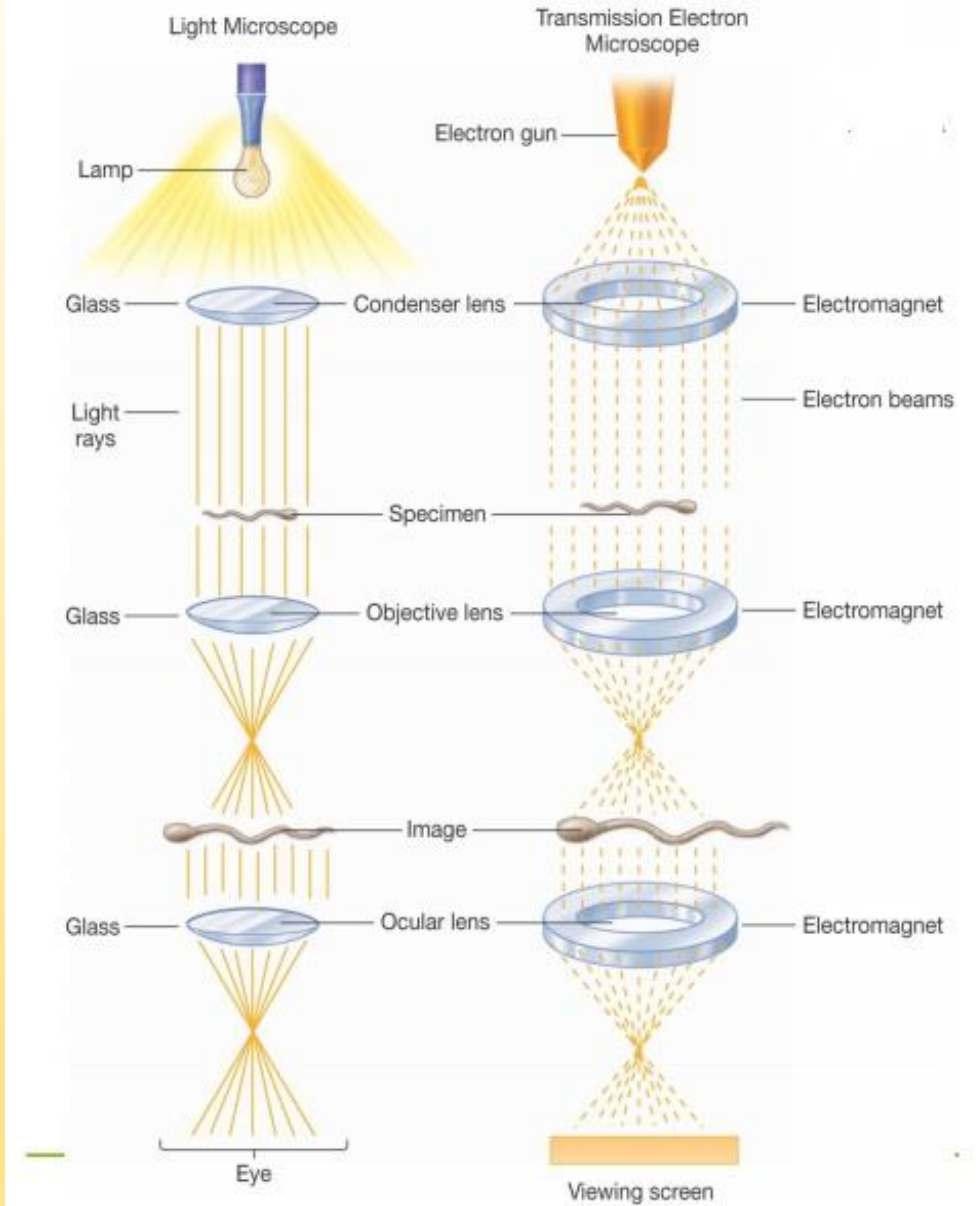


Schéma du principe de la microscopie électronique

PREPARATION DES ECHANTILLONS :

- 1/ fixation (maintenir l'échantillon dans un état morphologique aussi proche possible de l'état naturel)
- 2/ déshydratation
- 3/ inclusion (imprégnation de l'échantillon dans une résine) : voire des mini-coupes sont réalisées
- 4/ traitement de l'échantillon (traiter avec des atomes lourds pour améliorer le contraste)

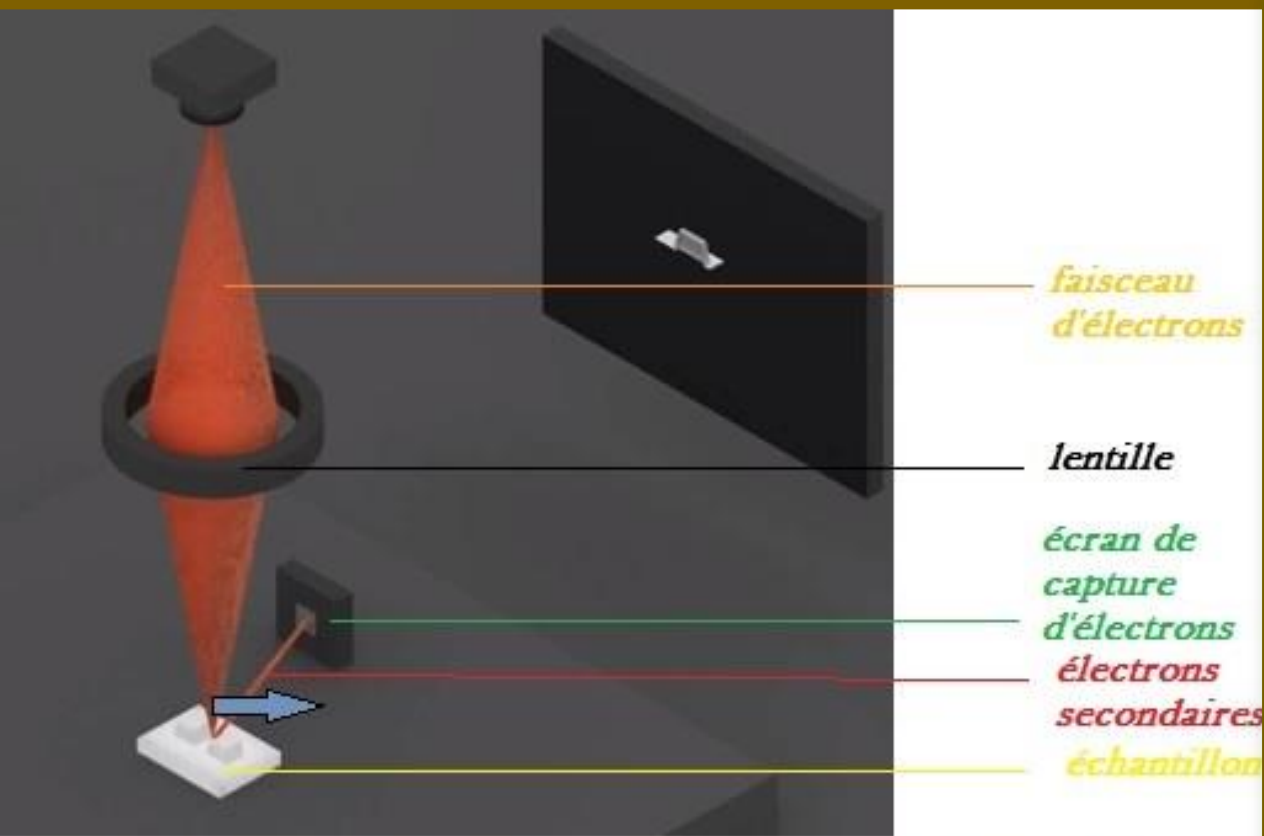
Avantages

- Faisceau d'électrons : mieux focalisé que la lumière ET sa longueur d'onde est environ 100 000 fois plus petite que celle de la lumière visible
- Résolution d'un microscope électronique très supérieure à celle d'un microscope optique. La résolution est de l'ordre de 0,5 nm (résolution atomique) et le grandissement de 2.000 à 1.500.000.

Inconvénients

- Préparation des objets longues et complexes
- Technique destructive (on observe les cellules après fixation, donc mortes). Pas facile de garder les structures intactes
- Petits volumes sondés
- Observation des échantillons dans une chambre à vide

COMPARAISON MEB / MET



 : balayage du faisceau d'électrons pour avoir la totalité de l'échantillon

Schéma représentant le principe du MEB

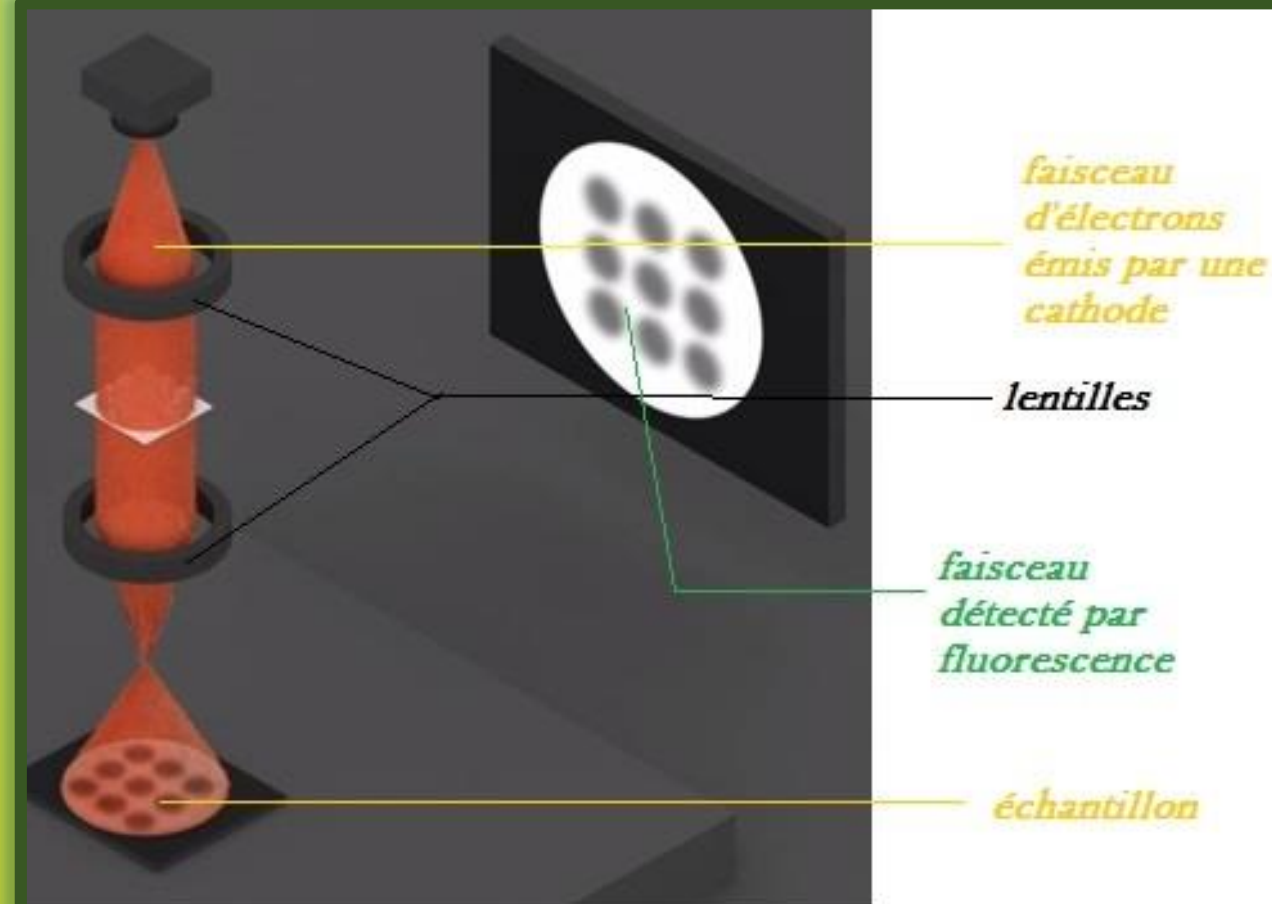
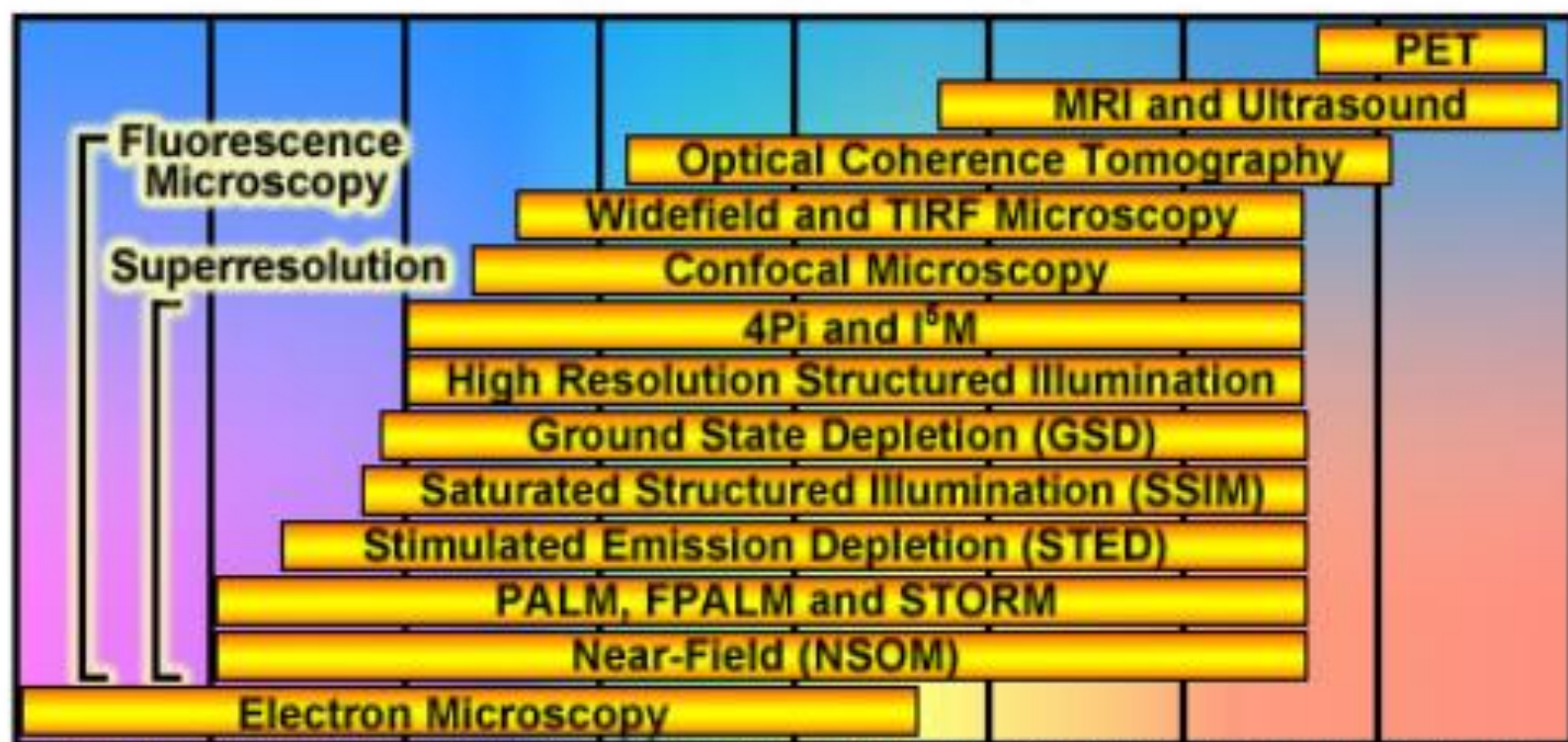
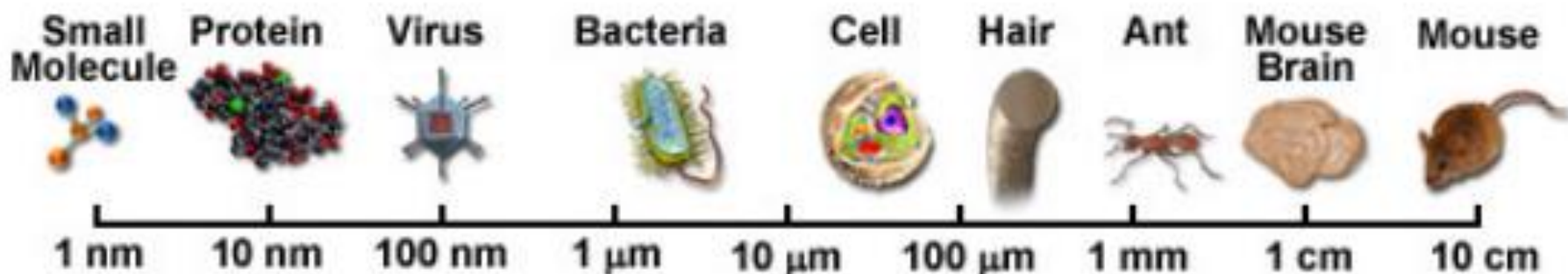
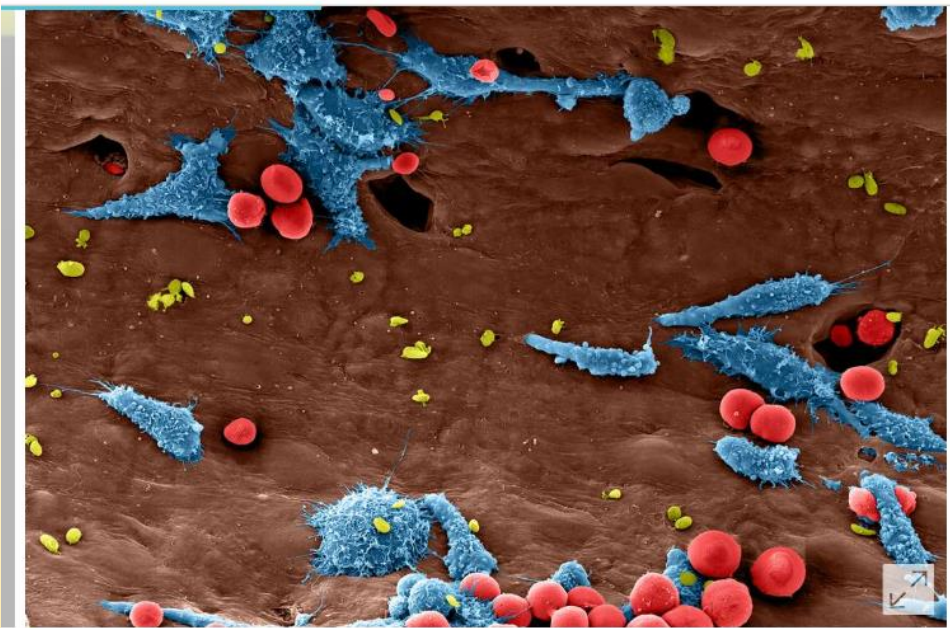


Schéma représentant le principe du MET

Spatial Resolution of Biological Imaging Techniques

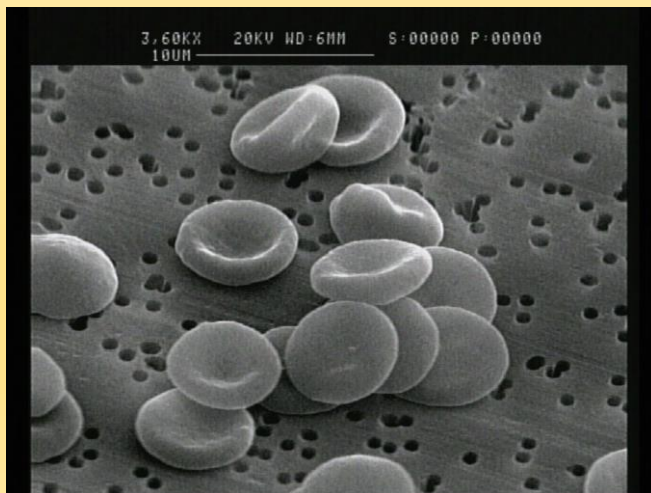




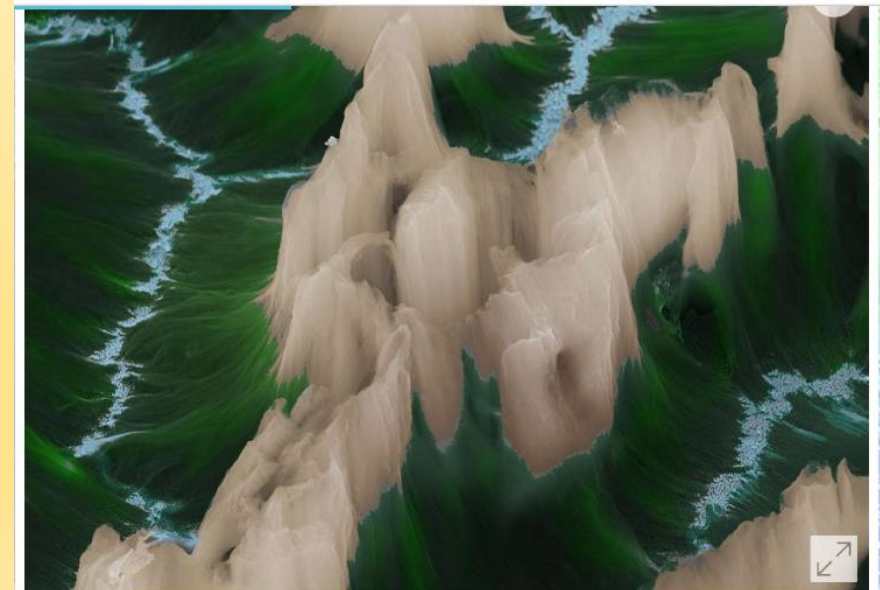
Des macrophages en pleine action Cette image représente des macrophages (en bleu) dans une veine du foie chez la souris. Ces cellules immunitaires sont en train de manger des bactéries (en jaune), un processus connu sous le terme de phagocytose. Les macrophages jouent ainsi un rôle essentiel lors d'une infection. Sur l'image, on peut également apercevoir des globules rouges qui circulent dans les vaisseaux sanguins. Grossissement : x 598 © FEI, Flickr



On pourrait presque croire cet animal tout droit sorti d'un film fantastique. En réalité il s'agit d'une espèce de ver sous-marin grossi 525 fois par un microscope électronique. © Philippe Crassous, FEI, Flickr



Globules rouges au microscope électronique



Des Dolomites de silice Cette image ressemble étrangement à un paysage des Dolomites, mais c'est en réalité le résultat d'une gravure sur du métal à l'aide de silicium. Les structures nanométriques beiges qui ressemblent à des pics montagneux sont des paquets de silicium sortis de la plaque de métal (en vert) au cours de la gravure. Grossissement : x 15.000 © FEI, Flickr