Rapport de Techniques de Biologie Cellulaire

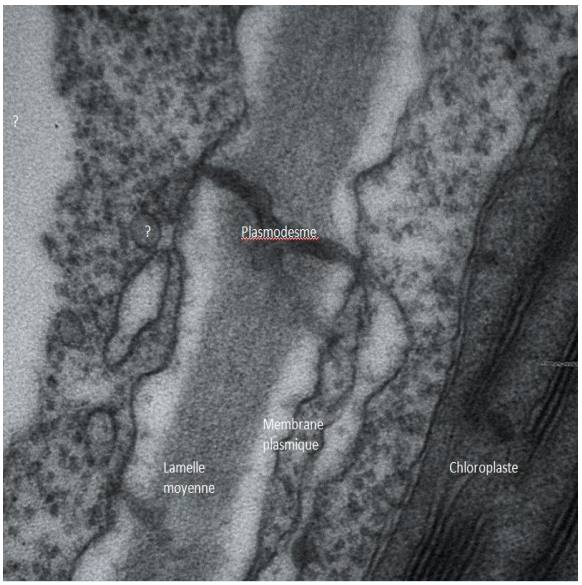
Microscopie Electronique en Transmission (MET) : Préparation et observation d'un échantillon

La microscopie électronique en transmission (MET) est une méthode combinant un déplacement sous vide d'un faisceau d'électrons à travers un échantillon très mince à un système de 3 lentilles électromagnétiques. L'image de l'échantillon va être projetée sur un écran fluorescent, permettant la visualisation d'une image grâce à une caméra. La résolution d'un tel appareil est très précise, pouvant atteindre 0,8 Ångström. Le grossissement y est également fort, pouvant atteindre X300 000. Afin d'obtenir une observation de qualité, plusieurs étapes de préparations de l'échantillon sont nécessaires. En effet, des techniques de fixation adaptées à une préservation optimale du matériel biologique ont été développées, ainsi que des techniques de microscopie qui y sont couplées (cryosubstitution, etc.).

Fonctionnement :

Préparation de l'échantillon

-Fixation et contraste : Fixation chimique (déshydratation, réticulation des molécules pour les rendre insolubles, formation de ponts intra et intermoléculaires (glutaraldéhyde)) ou physique (congélation ultra rapide qui vitrifie les structures, cryofixation), stoppe les processus biologiques (enzymatiques), permet de maintenir les cellules en l'état.
-Coloration (avant ou après inclusion) avec des métaux lourds du type acétate d'uranyle ou tétroxyde d'osmium, citrate de plomb.
-Inclusion : Imprégnation du matériel dans une résine époxy type Epon®, sous la forme de gélules.
-Coupe : Couteau en verre (coupe semi-fine, <1µm), ou en diamant (coupe fine, 50-100nm), ultra microtome 50nm.
Dépôt de la coupe sur la grille Recouverte d'un film de formavar, support de l'échantillon.



Résultats

L'obtention d'une image au MET x80 000 d'une coupe fine de feuille d'*A. thaliana*, révèle deux cellules adjacentes séparées par les différentes parties de la paroi (lamelle moyenne, paroi cellulaire et membrane plasmique), et reliées entre elle par un plasmodesme permettant des échanges symplastiques. Le réticulum endoplasmique formant les plasmodesmes apparait au MET grâce à la densité face aux électrons du cytosquelette qui le forme : actine et myosine.
Les cellules contiennent les structures subcellulaires suivantes : des chloroplastes où apparaissent des thylakoïdes formant des grana et des grains d'amidons.

Discussion

La résolution de la microscopie électronique en transmission nous a permis d'observer un échantillon, avec une précision allant jusqu'à l'ultrastructure de la cellule, et ce malgré les aberrations possibles (principal facteur limitant, avec la préparation, longue et délicate). Ici, l'échantillon de feuille d'*A. thaliana* n'a été soumis à aucun marquage préalable. Il est possible de compléter cette observation en ayant recours à l'histochimie, à des billes d'or colloïdal, etc. pour suivre un marqueur. Ceci pourrait être d'un intérêt particulier dans le cas où l'on étudierait la dynamique des plasmodesmes, ou par exemple pour étudier le mouvement intercellulaire de complexes viraux. Malgré tout pour être effective, la MET nécessite une infrastructure technique, méthodologique

Coloration négative(sur l'objet)
Coloration positive/fixation/inclusion
Immunomarquage simple et double
ISEM (immunosorbent electron microscopy)