MICROSCOPIE OPTIQUE THEORIQUE ET APPLIQUEE AUX SCIENCES BIOMEDICALES

SOMMAIRE

Introduction 1
1 La microscopie optique (photonique) à fond clair 3
1.1 Principe du microscope optique composé 3
1.2 Principaux éléments du microscope à fond clair 6
1.2.1 La partie mécanique 6
1.2.2 Les parties optiques 7
2 La formation de l'image 7
2.1 Selon l'optique géométrique 7
2.1.1 Trajet des rayons d'éclairage 7
2.1.2 Trajet des rayons de formation de l'image 9
2.2 Selon l'optique physique 9
2.2.1 Quelques notions sur les ondes électromagnétiques visibles 9
2.2.2 Interférence 10
2.2.3 Diffraction 11
2.2.4 Théorie d'Abbe 12
3 Connaître et utiliser les différents éléments du microscope optique 13
3.1 Les objectifs 13
3.1.1 Limite de séparation et pouvoir séparateur 13
3.1.2 Ouverture numérique 14
3.1.3 Aberrations 16
3.1.4 Autres caractéristiques 16
3.1.5 Objectifs corrigés à l'infini 17
3.2 Le condenseur du microscope photonique à fond clair 18
3.3 Les oculaires 19
3.3.1 Principales caractéristiques 19
3.3.2 Oculaire micrométriques et mesure au microscope 20
3.4 Collecteur et source de lumière 20
3.5 L'éclairage de Köhler et l'utilisation du microscope photonique à fond clair 21

4 Les autres techniques microscopiques photoniques utilisées en sciences biomédicales 22
4.1 La microscopie à fond noir 22
4.1.1 Principe 22
4.1.2 Elément optique spécifique 22
4.1.3 Domaine d'utilisation 23
4.2 La microscopie en contraste de phase 23
4.2.1 Principe 23
4.2.2 Eléments optiques spécifiques 24
4.2.3 Domaine d'utilisation 24
4.3 La microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel (DIC) 24
4.3.1 Principe 25
4.3.2 Domaine d'utilisation 25
4.4 La microscopie à fluorescence (classique) 26
4.4.1 Principe 26
4.4.2 Eléments optiques spécifiques 26
4.5 La microscopie confocale (à balayage laser) 26
Annexes 28
Liste simplifiée des principaux sigles inscrits sur le corps des objectifs (extrait du site Le microscope optique à fond clair par Jean-Pierre GAVERIAUX) 28
Longueur du tube optique et principe de la correction à l'infini des microscopes récents 29
Les couleurs (Extrait de http://www.iconeoclaste.com/index.php) 29
L'utilisation du microscope photonique à fond clair 30
Références bibliographiques 34
Ouvrages 34
Ressources numériques 34
Documents en ligne 34
Sites de fabricants de matériel pour la microscopie optique (liste non exhaustive) 34

MICROSCOPIE OPTIQUE THEORIQUE ET APPLIQUEE AUX SCIENCES BIOMEDICALES

INTRODUCTION

La ***microscopie*** permet grâce à l'utilisation de microscopes d'observer des objets trop petits pour être vus à l'œil nu en fournissant des images agrandies de ces derniers.

Anciennement deux grandes classes d'instruments de microscopie étaient décrites selon la nature plutôt ondulatoire (notion de longueur d'onde lambda) ou corpusculaire (photons, électrons ...) des faisceaux de radiations[1] utilisés pour former ces images agrandies. Aujourd'hui cette classification simplifiée ne tient plus ; certains instruments utilisent les propriétés des ondes acoustiques, d'autres l'existence de nuages d'électrons au voisinage des surfaces conductrices (effet tunnel), ou bien encore les champs de forces attractives entre corps proches (force atomique) ou les propriétés des ondes lumineuses dites évanescentes.

En ***microscopie optique*** l'utilisation d'ondes du domaine du visible, de l'ultraviolet et du proche infrarouge nécessite de prendre en considération à la fois les aspects ondulatoires et corpusculaires de ces radiations électromagnétiques dans la formation de l'image.

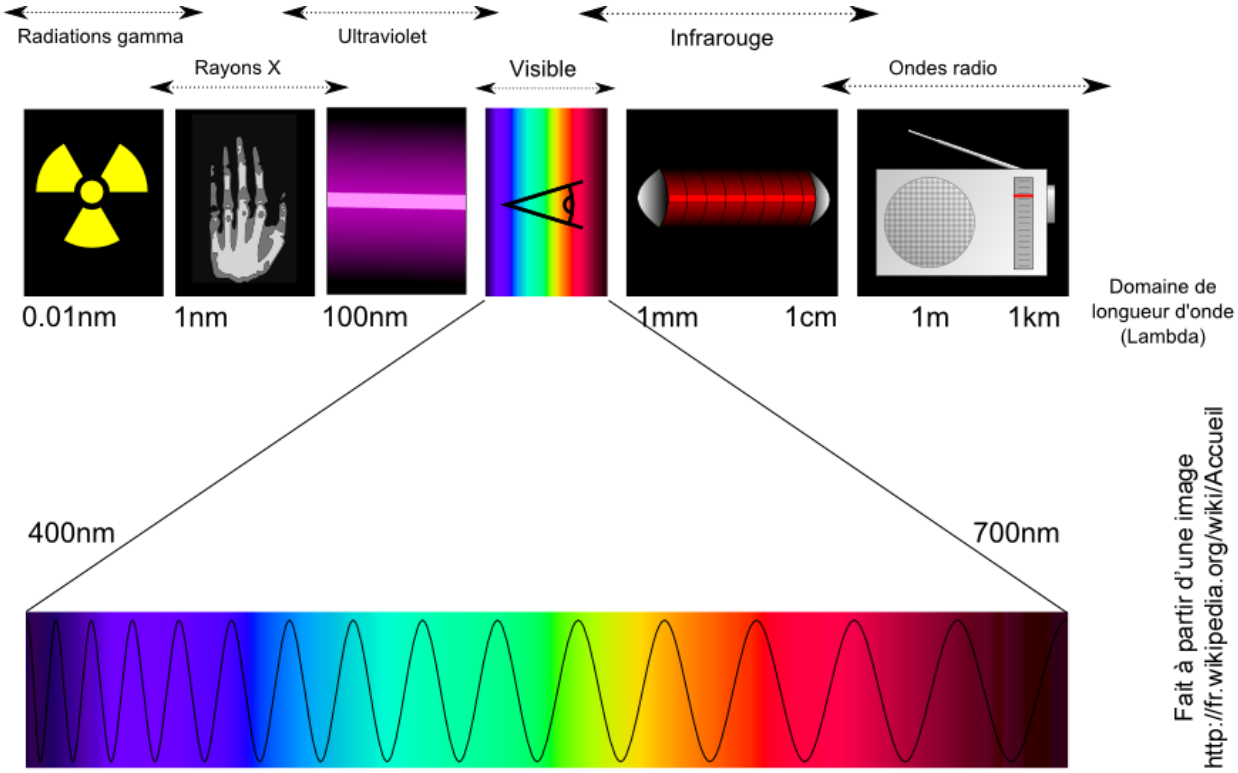


FIGURE 1 : SPECTRE DES ONDES ELECTROMAGNETIQUES

Ainsi nous verrons que ***l'optique géométrique***[2] qui ne prend pas en compte la dualité ondulatoire et corpusculaire de la lumière ne permet pas d'expliquer complètement la formation de l'image d'objet microscopique ; C'est ***l'optique ondulatoire*** (ou optique physique) qui a permis au physicien Ernst ABBE[a] de concevoir les systèmes optiques retrouvés dans nos microscopes modernes.

[1] La nature corpusculaire est la « caractéristique » principale des radiations de petite longueur d'onde alors que la nature ondulatoire caractérise les radiations de grande longueur d'onde.

[2] En optique géométrique : a. les rayons lumineux restent indépendants les uns des autres (pas d'interaction entre eux) ; b. dans un milieu homogène, transparent et isotrope, les rayons lumineux sont des lignes droites ; c. à la surface de séparation de deux milieux, les rayons lumineux obéissent aux lois de Snell-Descartes (pour la réflexion et la réfraction) et suivent le principe du retour inverse (réciprocité source - destination)

Enfin nous verrons que malgré la diversité des techniques misent en œuvre dans le domaine des sciences biomédicales (microscopie photonique à fond clair, à fond noir, à contraste de phase et à fluorescence pour les principales), le ***microscope optique*** est toujours constitué des éléments suivants:

- une ***optique d'éclairage*** (source et un dispositif de focalisation de rayonnement lumineux sur l'objet;
- une ***optique de formation de l'image*** (association de plusieurs lentilles assurant la fonction d'agrandissement);
- un ***détecteur*** permettant ***l'observation ou l'enregistrement*** de l'image (œil, écran, caméra, appareil photographique, …) ;
- une ***partie mécanique*** de précision (permettant le déplacement et le positionnement précis de l'échantillon microscopique).

En biologie, l'échantillon est le plus souvent partiellement transparent à la lumière et est positionné entre l'optique d'éclairage et l'optique de formation de l'image ; on parle ***d'observation en transmission (diascopie)***. Autour de ce principe général, les microscopes modernes peuvent présenter une grande variété d'éclairements et de modes d'observation.

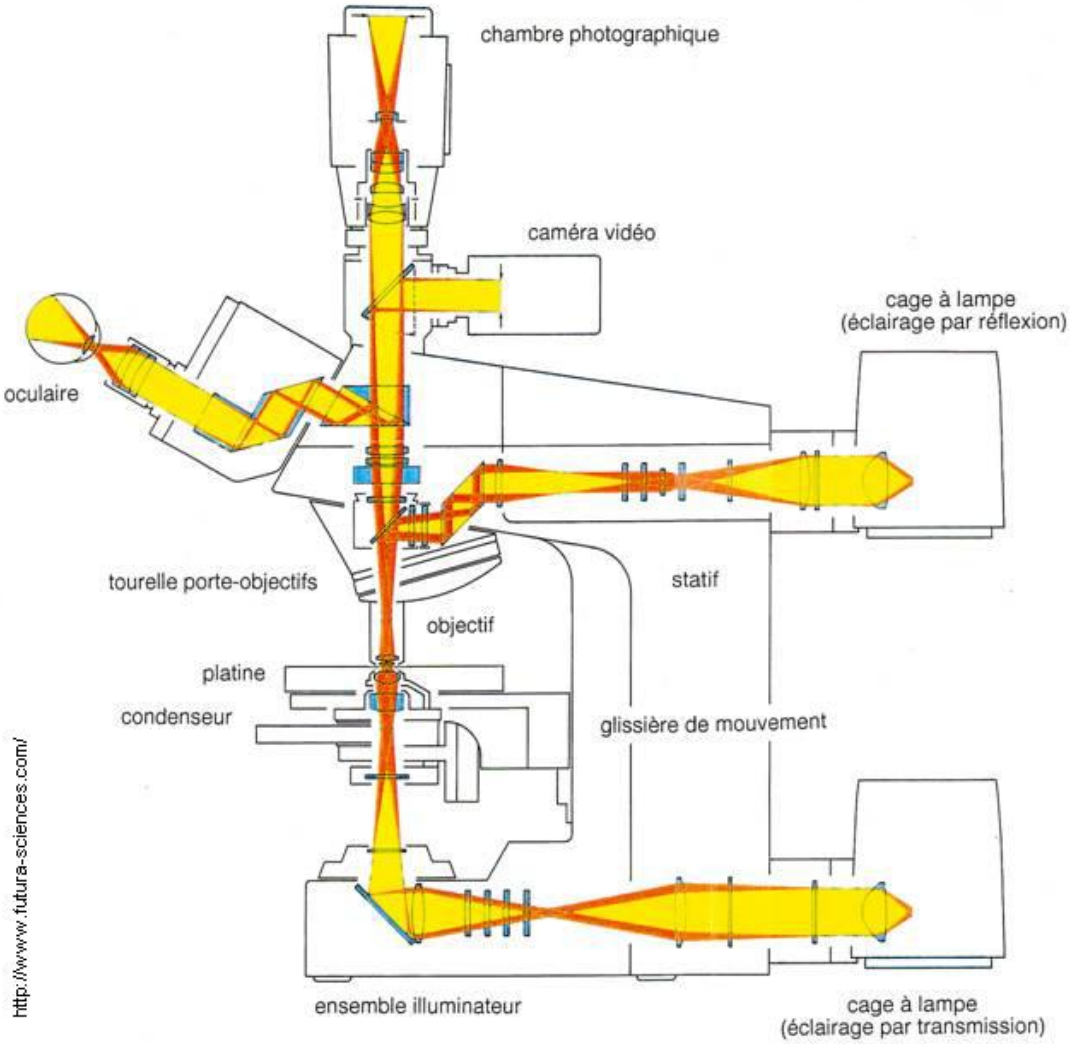


FIGURE 2 : MICROSCOPE OPTIQUE (DROIT)

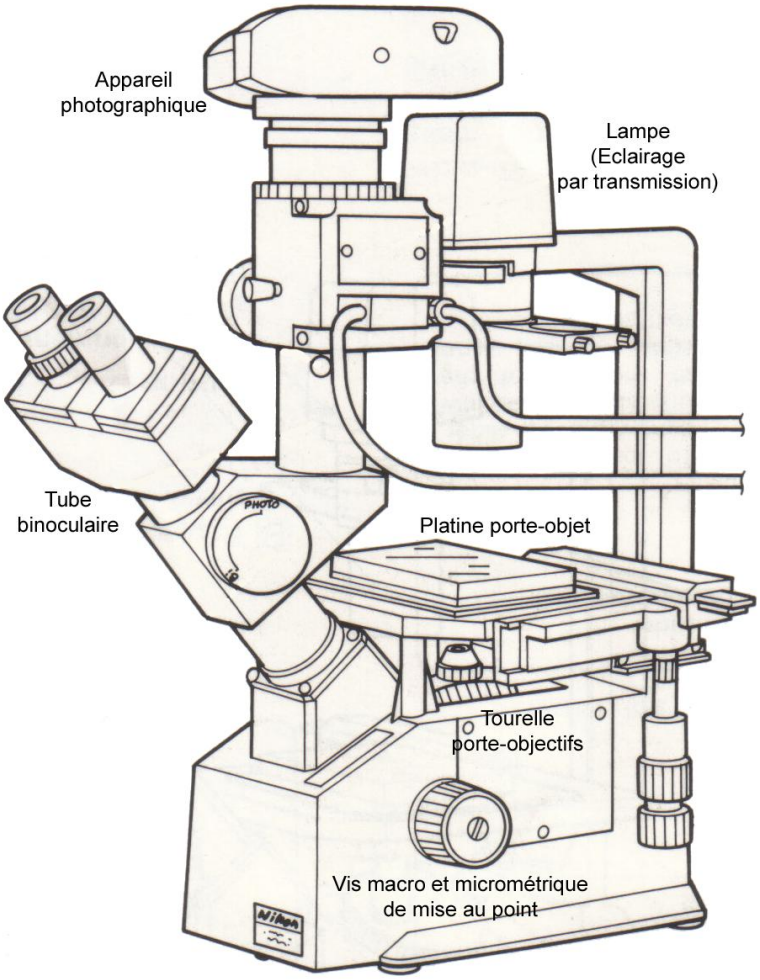


FIGURE 3 : MICROSCOPE OPTIQUE INVERSE

1 LA MICROSCOPIE OPTIQUE (PHOTONIQUE) A FOND CLAIR

Dans la microscopie photonique à fond clair l'image formée par la lumière *déviée* est vue sur un fond de lumière *non déviée*.

1.1 PRINCIPE DU MICROSCOPE OPTIQUE COMPOSE

La loupe est un instrument d'optique assimilable à une lentille convergente simple ; elle est classiquement utilisée pour observer :

- ⇒ des objets opaques ;
- ⇒ et fournie par réflexion (épiscopie) une image réelle[3] située classiquement dans une gamme de grossissement allant de x2 à x50.

Dans un microscope optique (composé) l'association de lentilles convergentes (objectif puis oculaire) permet d'observer :

- ⇒ par transparence (diascopie) des objets très petits (le plus souvent invisibles à l'œil nu) grâce à une distance objet - objectif (⇔1ère lentille convergente) très faible (inférieure à la distance focale de l'objectif) ;
- ⇒ et fourni une image réelle[3] située classiquement dans une gamme de grossissement allant de x100 à x1000.

[3] Terme utilisé en optique pour désigner toute image qui se forme après la face de sortie d'un instrument d'optique (dans le sens de parcours de la lumière). Si un écran est placé au lieu où se forme l'image, elle devient alors généralement visible.

La formation et les caractéristiques de l'image d'un objet fournie par une lentille convergente dépendent :

- de sa distance focale[4]
- et de la position de l'objet par rapport à cette lentille.

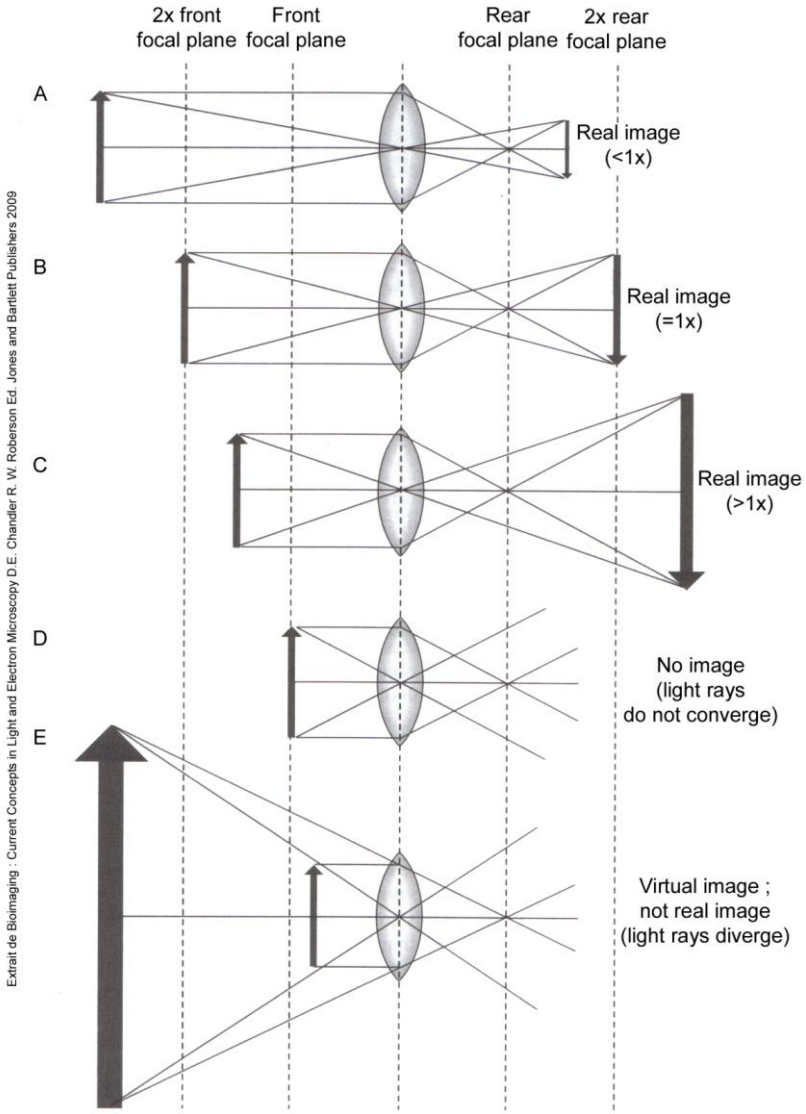


FIGURE 4 : LENTILLE CONVERGENTE ET FORMATION D'IMAGE

A : pour un objet situé à plus de deux fois la distance focale (loin de la lentille convergente) une image réelle inversée et réduite de l'objet est obtenue ; B : pour un objet situé exactement à deux fois la distance focale on obtient une image inversée de dimension identique à l'objet ; C : pour un objet situé entre une et deux fois la distance focale on obtient une image réelle agrandie et inversée (cas de l'objectif du microscope) ; D : Aucune image pour un objet situé exactement à une fois la distance focale de la lentille ; E : pour un objet situé à moins d'une fois la distance focale de la lentille une image virtuelle agrandie est obtenue (situation de l'oculaire du microscope).

[4] La distance focale d'un système optique est la mesure de sa puissance de convergence (focus) ou divergence (diffusion) de la lumière. Un système avec une longueur de focale plus courte a plus de puissance optique qu'un autre avec une longue focale. Les distances focales, respectivement objet et image, d'un système optique centré convergent ou divergent sont, par définition, les distances algébriques séparant respectivement le plan principal objet H (ou centre optique pour les lentilles minces) du foyer objet F et le plan principal image H′ (ou centre optique pour les lentilles minces) du foyer image F′. Elles sont souvent notées respectivement f et f'.

Le microscope optique composé est formé de deux groupes de lentilles, l'objectif et l'oculaire que l'on peut assimiler à deux lentilles convergentes.

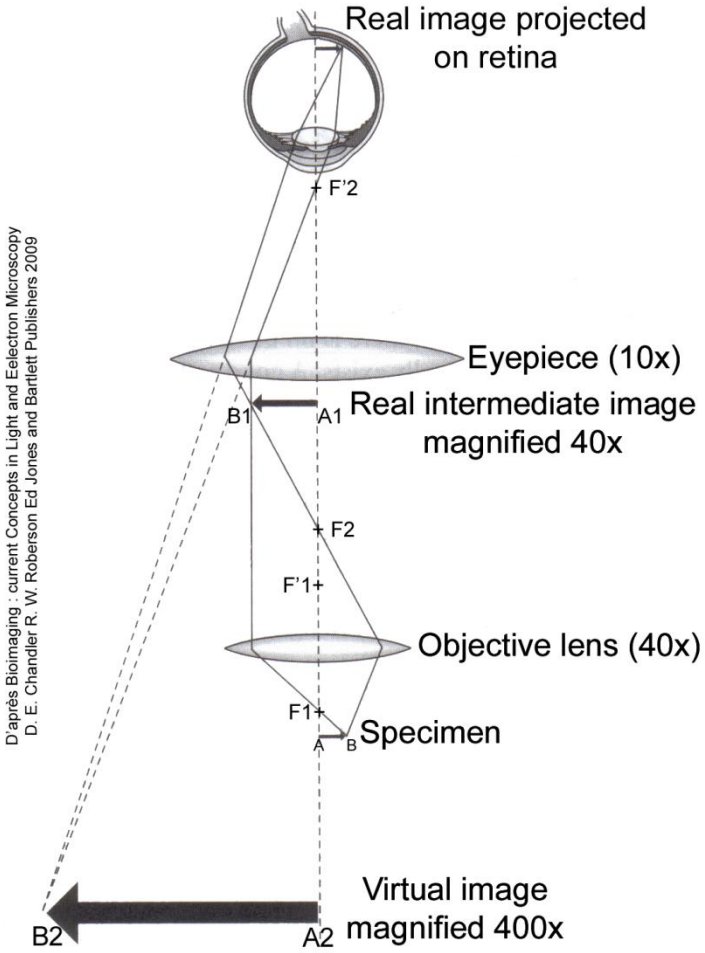


FIGURE 5 : PRINCIPE SIMPLIFIE DE FORMATION DE L'IMAGE AVEC UN MICROSCOPE OPTIQUE

L'objectif du microscope est un premier système convergent de très courte distance focale (mesure en mm) qui fourni de l'objet (AB) une image réelle intermédiaire agrandie et inversée de l'objet (A1B1), à l'intérieur du tube oculaire mais au-delà du foyer objet[5] de ce deuxième système optique (entre le foyer et le centre optique[6] de l'oculaire) ;

L'oculaire est alors un second système convergent de distance focale moyenne (quelques cm) qui agit comme une loupe sur l'image réelle fournie par l'objectif et permet finalement à l'observateur de voir une image virtuelle[7] inversée très agrandie de l'objet (A2B2).

Dans son principe le microscope peut être comparé au projecteur de diapositive pour lequel un objet transparent de taille réduite (la diapositive) est traversé par les rayons lumineux d'une source (diascopie) pour fournir via un système de lentilles (l'objectif) une image agrandie et inversée sur un écran (image réelle inversée contenue dans le tube oculaire).

Remarque : Cette analogie permet de deviner qu'en microscopie comme en matière de projection de diapositive, la qualité de l'image observée est très directement liée aux qualités de l'objet et de l'objectif

[5] En optique, un foyer est un point vers lequel convergent les rayons lumineux issus d'un point après leur passage dans un système optique. Le foyer objet est le point objet dont l'image se trouve à l'infini sur l'axe optique principal

[6] Point particulier d'un système tel qu'un rayon lumineux incident en ce point n'est pas dévié.

[7] Terme utilisé en optique pour désigner toute image qui se forme avant la face de sortie d'un instrument d'optique (dans le sens de parcours de la lumière) et ne peut donc pas être visualisée sur un écran.

(véritable « cœur » du microscope) mais aussi aux conditions d'observation (en limitant par exemple au maximum la lumière parasite).

1.2 PRINCIPAUX ELEMENTS DU MICROSCOPE A FOND CLAIR

1.2.1 LA PARTIE MECANIQUE

Elle est constituée :

- du statif composé d'un pied et d'une potence ;
- de la platine porte objet surmontée d'un chariot guide objet ;
- du tube binoculaire ;
- du revolver porte objectif ;
- des vis macrométriques et micrométriques de mise au point.

Dans le détail la partie mécanique comprend :

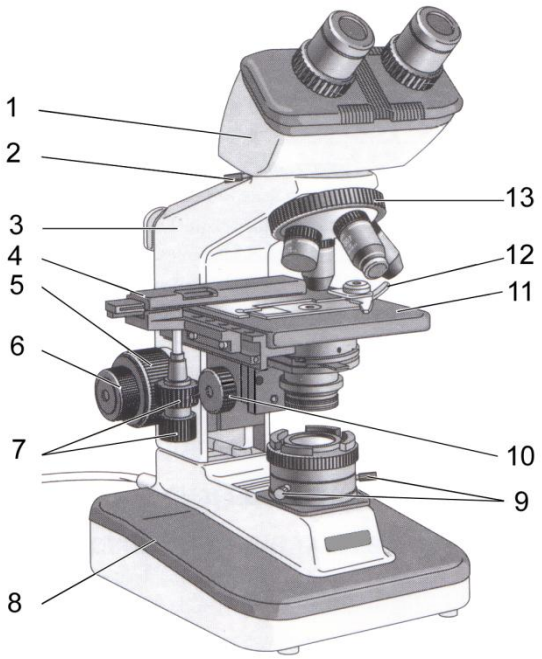


FIGURE 6 : ELEMENTS DE LA PARTIE MECANIQUE DU MICROSCOPE A FOND CLAIR

1 : tube binoculaire 2 : vis de blocage du tube binoculaire 3 : potence du statif 4 : sur platine (ou chariot) guide objet 5 : vis micrométrique de mise au point 6 : vis micrométrique de mise au point 7 : vis de déplacement bidirectionnel du chariot guide objet 8 : pied du statif 9 : vis de centrage du collecteur 10 : vis de réglage de hauteur du condenseur 11 : platine porte-objet 12 : chevalet de fixation de lame porte-objet 13 : revolver porte-objectif.

1.2.2 LES PARTIES OPTIQUES

On trouve :

- Une ***optique d'éclairage*** composée principalement d'une source lumineuse (lampe halogène) à intensité d'éclairage réglable et surmontée d'un collecteur et d'un condenseur ;
- Une ***optique de formation de l'image*** comprise entre la lentille frontale de l'objectif et le verre d'œil de l'oculaire

Dans le détail ces éléments sont :

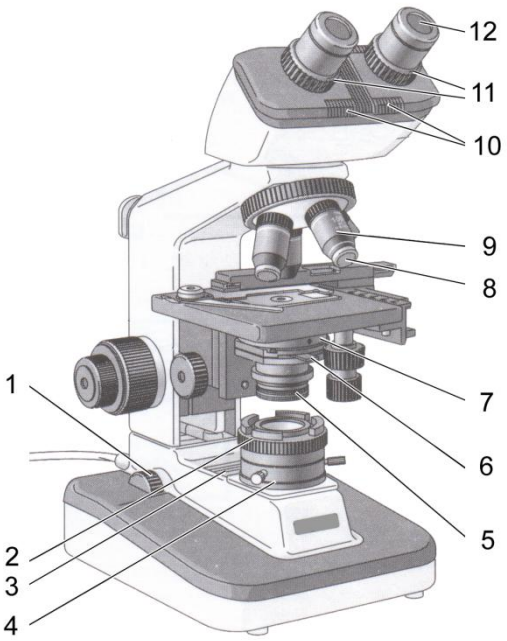


FIGURE 7 : ELEMENTS DES PARTIES OPTIQUES DU MICROSCOPE A FOND CLAIR

1 : potentiomètre de réglage de l'intensité lumineuse 2 : diaphragme de champ 3 : cage de la source lumineuse 4 : collecteur de lumière 5 : filtre bleu ou « lumière du jour » 6 : diaphragme d'ouverture 7 : condenseur 8 : lentille frontale d'objectif 9 : corps de l'objectif 10 : glissière de réglage de l'écartement inter pupillaire 11 : oculaire à réglage dioptrique 12 : verre d'œil de l'oculaire.

2 LA FORMATION DE L'IMAGE

2.1 SELON L'OPTIQUE GEOMETRIQUE

Dans les sciences biologiques, le microscope à fond clair permet de projeter sur la rétine de l'observateur une image, transmise par l'objet microscopique illuminé par la lumière de la source (diascopie). Nous savons que ce microscope permet grâce à l'association objectif – oculaire, la formation en deux stades d'une image agrandie réelle de l'objet sur la rétine de l'observateur (§ 1.1.).

Dans le cas du microscope photonique à fond clair, la formation de l'image sur la rétine de l'observateur nécessite de considérer d'une part le trajet des rayons d'éclairage et d'autre part ceux de formation de l'image.

2.1.1 TRAJET DES RAYONS D'ECLAIRAGE

L'association collecteur – condenseur permet l'obtention d'un fond uniformément clair (en l'absence d'objet); chaque point de la source éclaire l'ensemble du champ d'observation et de la rétine.

Le réglage convenable du collecteur et du condenseur (⇔ systèmes optiques *diaphragmés*) permet de former successivement trois images de la source[8] (S) : S1. Dans le plan focal du condenseur ; S2. Dans le plan focal arrière de l'objectif ; S3. Dans le cristallin.

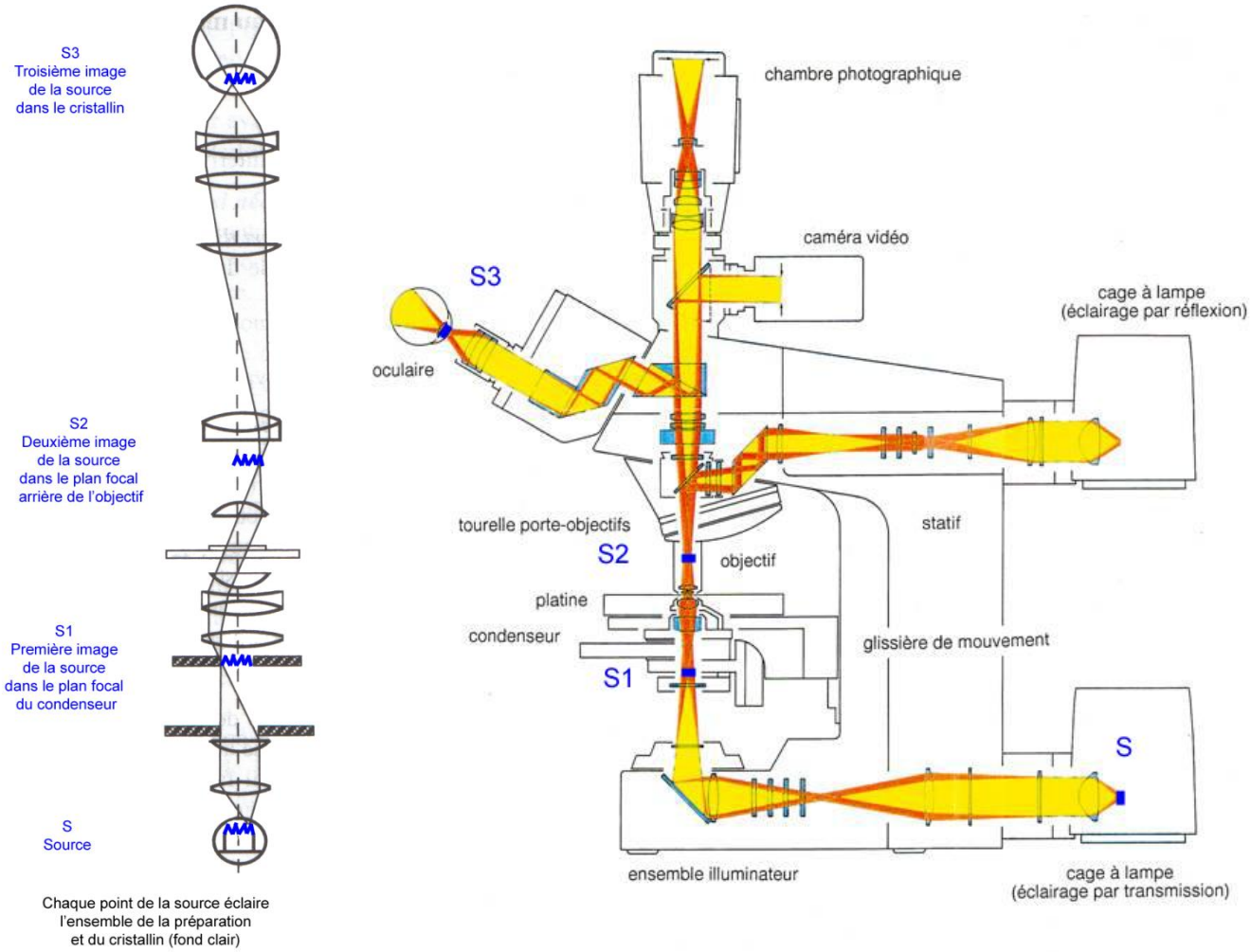


FIGURE 8 ET 8 BIS : TRAJET DES RAYONS D'ECLAIRAGE DU MICROSCOPE A FOND CLAIR

En pratique …

L'obtention d'une image correctement contrastée et fidèle de l'objet microscopique observé, nécessite *d'optimiser* le trajet optique des rayons d'éclairage en réglant correctement le couple collecteur – condenseur après la mise au point sur l'objet microscopique ; C'est-à-dire une fois que la « longueur » du trajet optique des rayons de formation de l'image est fixée.

L'éclairage de Köhler est une procédure permettant de rationaliser et d'optimiser l'utilisation du couple collecteur – condenseur de l'optique d'éclairage du microscope.

[8] Les plans de formation de ces images sont qualifiés de combinaison optique car chaque plan crée une image optique du précédent

2.1.2 TRAJET DES RAYONS DE FORMATION DE L'IMAGE

L'association collecteur – condenseur focalise la lumière de la source de telle sorte que chaque point de l'objet (I1) est éclairé par l'ensemble de la source et conduit à un point :

- dans l'image intermédiaire agrandie inversée fournie par l'objectif (I2);
- dans l'image réelle finale projetée sur la rétine via l'oculaire (I3)

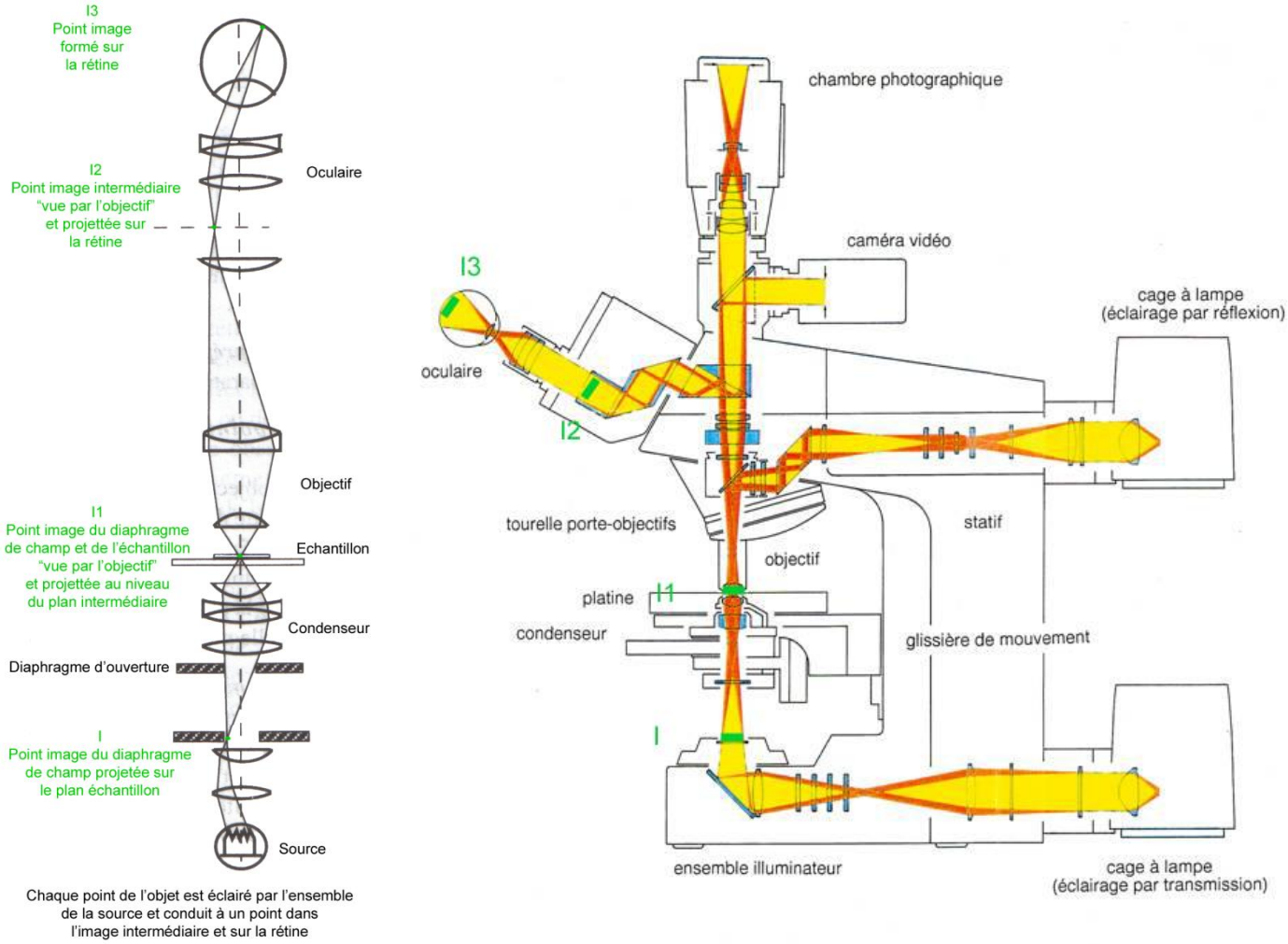


FIGURE 9 ET 9 BIS : TRAJET DES RAYONS DE FORMATION DE L'IMAGE DANS LE MICROSCOPE A FOND CLAIR

Pour un microscope photonique à fond clair correctement réglé on observe que le trajet optique des rayons d'éclairage et le trajet optique des rayons de formation de l'image ont des parcours croisés se *terminant* tous les deux sur la rétine de l'observateur.

2.2 SELON L'OPTIQUE PHYSIQUE

2.2.1 QUELQUES NOTIONS SUR LES ONDES ELECTROMAGNETIQUES VISIBLES

L'optique géométrique permet de prévoir le trajet des rayons lumineux entrant en interaction avec des surfaces lisses ; le tracé des rayons lumineux (« lignes droites ») permet de positionner l'image d'un objet fournie par un système optique mais ne fournie pas d'éléments sur les qualités ou propriétés de cette image.

Pour expliquer de façon satisfaisante la formation des images microscopiques il est nécessaire de décrire dans quelles mesures les rayons lumineux ou ondes lumineuses sont affectées par l'objet microscopique.

L'optique physique ou ondulatoire permet d'appréhender ***l'interaction des ondes électromagnétiques*** *lumineuses* ***avec les objets***.

Les ondes électromagnétiques peuvent être en partie décrites par différents paramètres tels que ***l'amplitude*** q, la ***longueur d'onde*** λ (lambda) et la ***phase***.

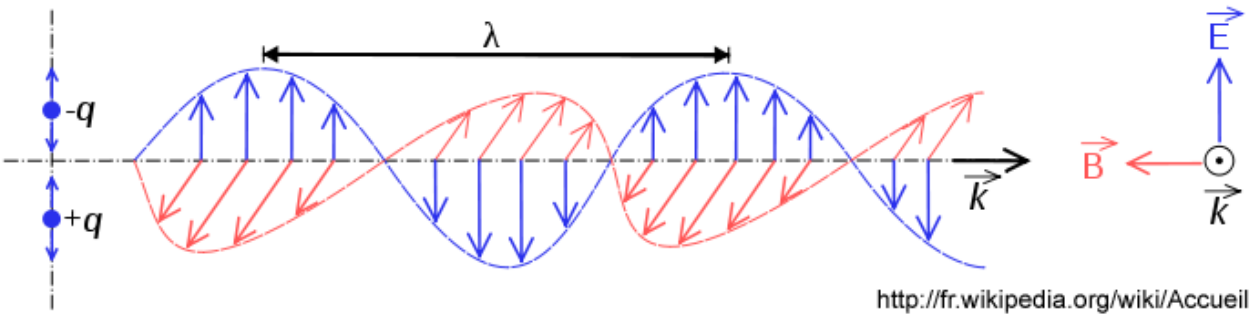


FIGURE 10 : ONDE ELECTROMAGNETIQUE (OSCILLATION COUPLEE DU CHAMP ELECTRIQUE ET DU CHAMP MAGNETIQUE)

Dans le domaine du visible :

- La longueur d'onde détermine la couleur de l'onde électromagnétique ;
- Le carré de son amplitude détermine l'intensité lumineuse de l'onde électromagnétique ;
- La phase n'est pas toujours perçue par l'œil.

2.2.2 INTERFERENCE

L'interférence peut s'observer pour des ondes de fréquence identique dans un même milieu lorsqu'elles se combinent pour former une nouvelle onde unique.

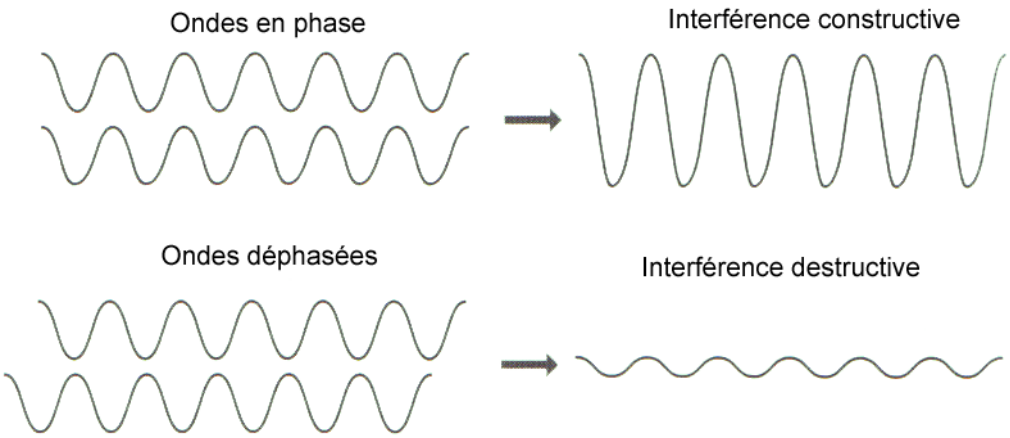


FIGURE 11 : PRINCIPE DE L'INTERFERENCE ENTRE ONDES ELECTROMAGNETIQUES

Lorsque deux ondes évoluent dans la même direction et sont en phase, leurs amplitudes s'ajoutent. L'intensité de la lumière produite par la nouvelle onde sera égale à la somme des deux ondes initiales. On parle d'interférence constructive.

Si ces deux ondes évoluent avec une différence de phase, amplitudes positive et négative s'ajoutent. Dans le cas particulier d'un déphasage d'une demi-longueur d'onde, l'amplitude de l'onde résultante sera zéro, tout comme l'intensité lumineuse. On parle d'interférence destructive.

2.2.3 DIFFRACTION

Lorsqu'une onde rencontre un ***objet*** qui ne lui est ***pas totalement transparent***, on peut considérer que chaque point de l'objet est susceptible d'entrainer une diffusion de cette onde. C'est le ***phénomène de diffraction***.

La théorie (simplifiée) de la diffraction, considère que chaque point atteint par une onde se comporte comme une source secondaire qui réémet une onde sphérique de même fréquence, même amplitude et même phase.

Les figures de diffraction résultent de l'interférence des ondes sphériques émises par l'ensemble des sources secondaires.

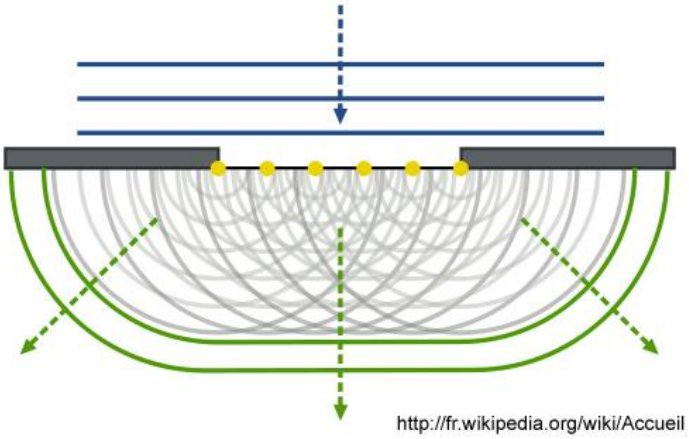
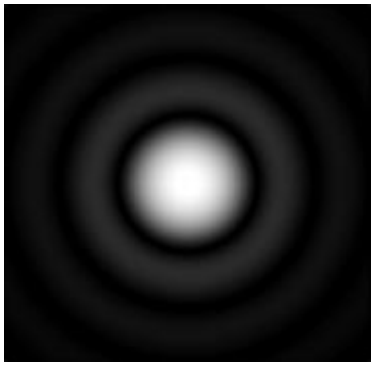


FIGURE 12 : PRINCIPE DE LA DIFFRACTION

Ainsi lorsqu'une onde électromagnétique *visible* passe par un trou (une fente) de taille équivalente à sa longueur d'onde le phénomène de diffraction permet *d'observer* des figures de diffraction géométriques particulières :
- une succession d'anneaux clairs et sombres concentriques pour un trou ;
- une succession de bandes claires et sombres pour une fente.



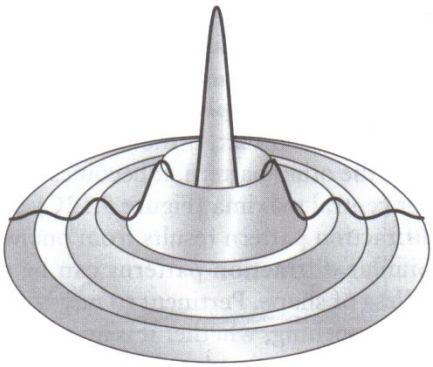
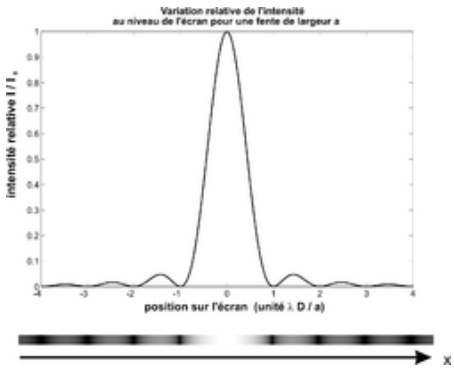


FIGURE 13 ET 13 BIS : REPRESENTATIONS DE LA FIGURE DE DIFFRACTION OBTENUE PAR UN TROU



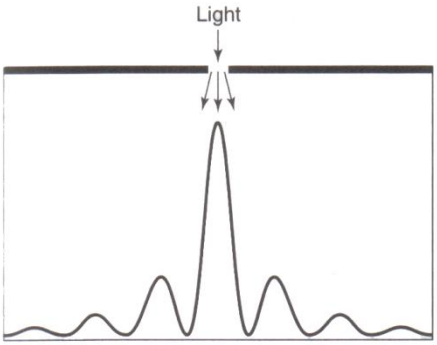


FIGURE 14 ET 14 BIS : REPRESENTATIONS DE LA FIGURE DE DIFFRACTION OBTEBUE PAR UNE FENTE

Les zones claires sont définies comme des maxima, tandis que les zones sombres sont des minima.

Le maximum central correspond à l'image de la fente (ou du trou) et correspond à la lumière non diffractée (directe) ; ces rayons sont dit d'ordre zéro et l'image créée suit les lois de l'optique géométrique.

Les maxima suivants sont dits de 1er, 2ème, 3ème ordre, précédés d'un signe + ou – sont caractérisés par les lois de l'optique des ondes.

L'angle de *diffusion* des rayons diffractés augmente avec le numéro d'ordre du maxima considéré.

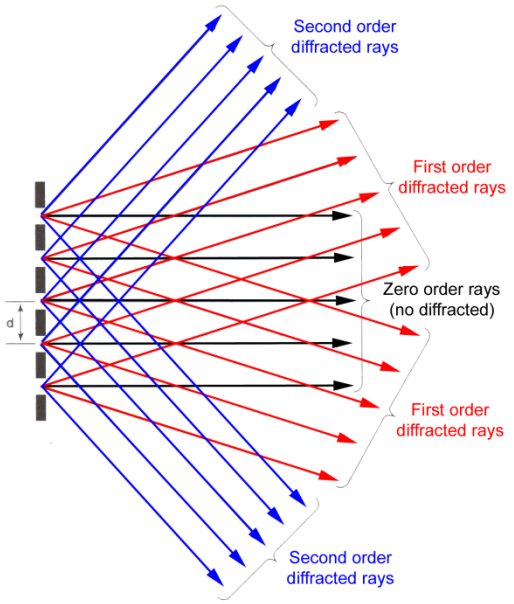


FIGURE 15 : ANGLES DE *DIFFUSION* ET MAXIMUM DE 1ER ET 2ND ORDRE OBTENUS PAR UNE SERIE DE FENTES

2.2.4 THEORIE D'ABBE

Pour expliquer la formation de l'image microscopique, Ernst Abbe[a] ***assimile l'objet microscopique à*** un ensemble de trous et de fentes ***(⇔ fin réseau) sources secondaires d'ondes sphériques*** (Cf ci-avant) à l'origine de rayons diffractés de différents ordres.

Un tel objet va ainsi diviser la lumière incidente qui le traverse en :

- Une ***lumière non déviée*** (⇔ rayons d'ordre 0 non diffractés) que l'on peut assimiler à un éclairage du fond *ne contenant pas* d'information sur l'objet ;
- Un ***cône de lumière déviée*** (⇔ ensemble de rayons diffractés de différents ordres) *contenant* des informations concernant l'objet.

L'objectif (système optique convergent *parfait*) permet à la lumière non déviée (maxima d'orde 0 ; image primaire) et à la lumière déviée (maxima d'ordre supérieur ; images secondaires) d'interagir (⇔ d'interférer).

La formation d'une image agrandie *fidèle et complète* (⇔ avec ses variations d'intensité) de l'objet microscopique dans le plan image intermédiaire du tube optique résulte de la formation de la figure de diffraction dans le plan focal arrière de l'objectif et des interférences constructives et destructives de l'ensemble de ces rayons convergents.

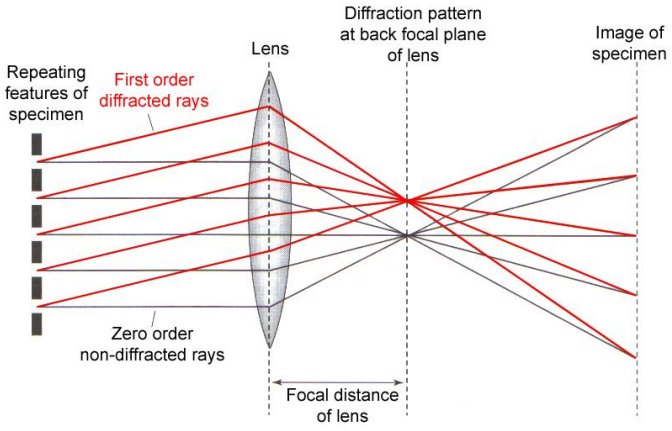


FIGURE 16 : PRINCIPE DE LA FORMATION D'IMAGE EN MICROSCOPIE SELON LA THEORIE D'ABBE

La qualité de l'image perçue à travers l'oculaire est liée au nombre *d'images secondaire*s ayant interférées avec *l'image primaire* ; une image convenable peut être obtenue dès que les faisceaux déviés correspondant au maximum de premier ordre sont passés à travers l'objectif pour interférer avec la lumière non déviée.

En pratique …

Pour obtenir un nombre d'images secondaires élevé, il faut un objectif avec un « angle d'admission suffisant » ; c'est-à-dire une grande O.N.

3 CONNAITRE ET UTILISER LES DIFFERENTS ELEMENTS DU MICROSCOPE OPTIQUE

3.1 LES OBJECTIFS

C'est l'objectif qui fourni l'image agrandie inversée qui sera grossie et vue via les oculaires par l'observateur ; la qualité de cette image est fixée par les caractéristiques de l'objectif qui se trouve à ce titre être l'élément principal déterminant la qualité d'un microscope optique.

3.1.1 LIMITE DE SEPARATION ET POUVOIR SEPARATEUR

Les phénomènes de diffraction limitent le pouvoir séparateur du microscope optique en ne donnant pas une image ponctuelle d'un point objet mais une tache de diffraction. L'image d'un trou parfaitement circulaire donne disque lumineux entourée d'anneaux concentriques alternativement clairs et sombres ; cette figure de diffraction est appelée tache d'Airy ou disque de confusion[9].

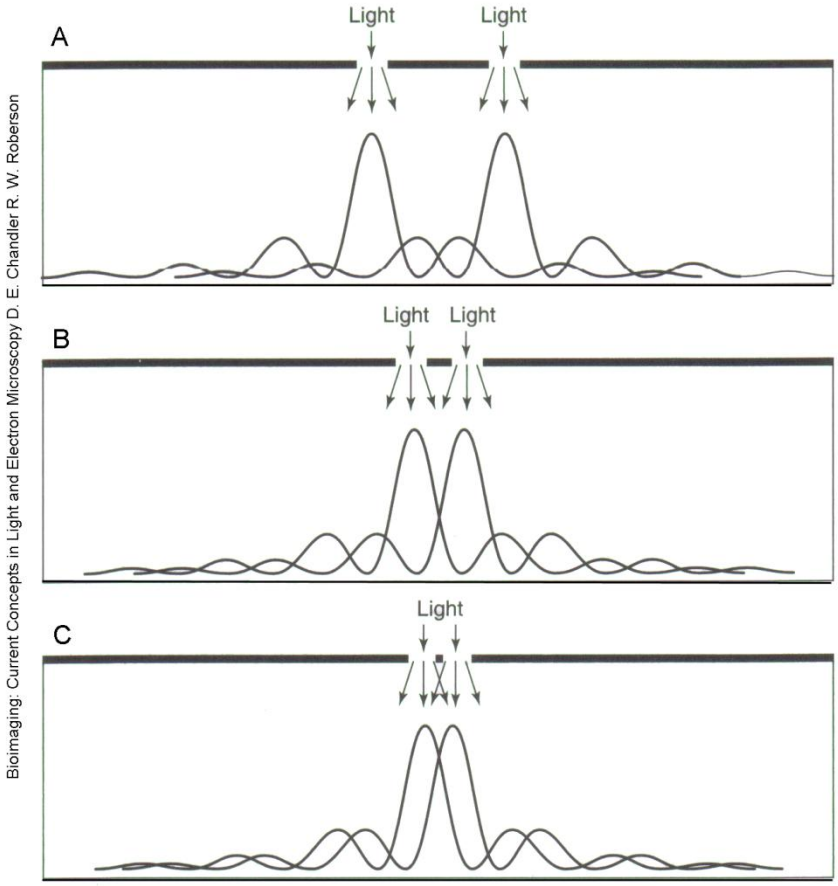


FIGURE 17 : LIMTE DE RESOLUTION ET FIGURES DE DIFFRACTION DE DEUX FENTES PROCHES

De A à C le rapprochement des deux fentes conduit pour une fusion des taches de diffractions pour ne former plus qu'une image unique des deux fentes.

[9] Le rayon du disque d'Airy (rayon du 1er zéro ⇔ cercle sombre) est lié à la longueur d'onde λ et à l'ouverture numérique O.N. du dispositif optique.

Ainsi deux points très proches donneront des images qui vont se chevaucher pouvant même fusionner en une tache unique ; la distance entre ces deux points objet est alors inférieure à la ***limite de séparation*** (notée ***d***) du microscope.
(i)

$$d = \frac{0{,}6\,\lambda}{n \sin \alpha}$$

Le ***pouvoir séparateur*** du microscope (ou *résolution*), c'est-à-dire la capacité à distinguer deux points adjacents comme distincts est l'inverse de la limite de séparation. Il augmente donc avec la diminution de la limite de séparation.

Pour un objectif donné ayant un *angle d'admission des rayons marginaux* à l'axe optique fixé (α soit 2 pour l'amplitude du cône de lumière pénétrant l'objectif), le pouvoir séparateur du microscope dépend donc :

- de « la » longueur d'onde λ utilisée ;
- et de l'indice de réfraction n du milieu qui sépare l'objet microscopique de la lentille frontale de l'objectif.

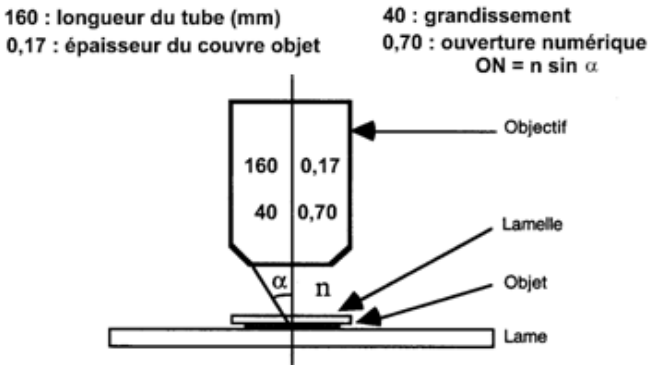


FIGURE 18 : ANGLE α ET OUVERTURE NUMERIQUE

3.1.2 OUVERTURE NUMERIQUE

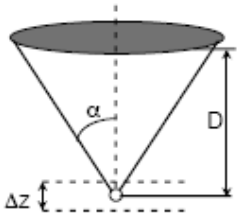
L'ouverture numérique ON (ou numerical aperture NA) a pour définition :

(ii) O. N. = n sin α

Où n est l'indice de réfraction dans le milieu d'observation (1 pour l'air), et α est l'angle entre l'axe optique et le rayon (le plus écarté de l'axe optique) qui entre dans la lentille (le demi-angle d'ouverture).

D'où (i) et (ii) d = 0,6 λ/ O. N.

- L'huile à immersion permet d'augmenter n (de 1 à 1,52) et donc le pouvoir séparateur.
- Les objectifs à focale très courte ont un plus grand angle α ; plus α est grand, meilleures sont la luminosité (plus de rayons lumineux se trouvent collectés) et la résolution.
- Pour un objectif distance de travail D (ou working distance WD) et profondeur de champ Δz sont aussi des caractéristiques liées à l'O.N. les meilleurs objectifs à grande ouverture numérique (1,0<NA<1,45) possèdent une distance de travail limitée (90 à 180 µm) et une profondeur de champ réduite.



$$\Delta z = \lambda \Big/ \left[4n\left(1 - \sqrt{1 - {ON^2}/{n^2}}\right)\right]$$

FIGURE 19 : ANGLE ALPHA, DISTANCE DE TRAVAIL ET PROFONDEUR DE CHAMP

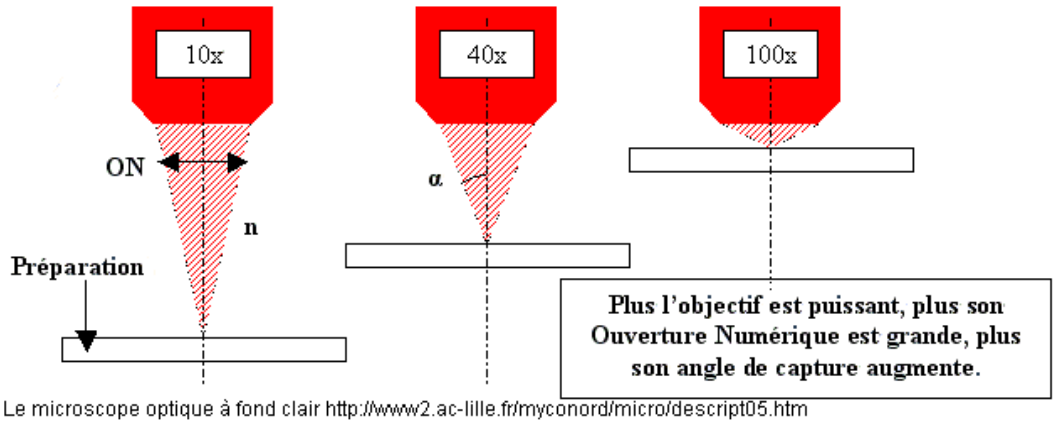


FIGURE 20 : OUVERTURE NUMERIQUE ET RAYONS DIFFRACTES CAPTES PAR L'OBJECTIF

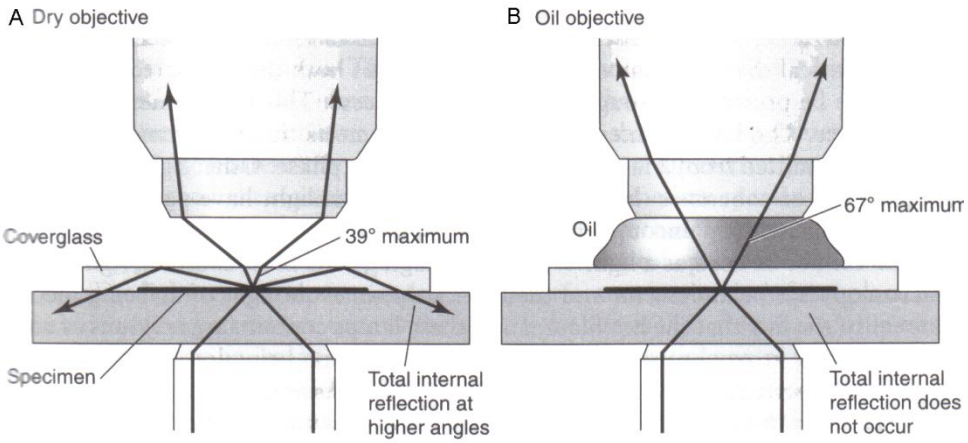


FIGURE 21 : OBJECTIF A SEC ET OBJECTIF A IMMERSION

Lorsque l'on augmente l'O. N. d'un système optique (ici un objectif) on diminue la limite de séparation d (ou on augmente de pouvoir séparateur. L'O. N. des objectifs les plus puissants ne dépasse pas 1,4.

OBJECTIFS	4 x	10 x	20 x	40 x	100 x
objectifs achromatiques	0,10	0,25	0,40	0,65	1,25
objectifs semi-apochromatiques	0,12	0,30	0,50	0,75	1,30
objectifs apochromatiques	0,16	0,40	0,70	0,95	1,40

En pratique …

Les objectifs de faible grandissement (inférieur à x 20) ont une faible ON (inférieure à 0,75) mais ils possèdent une grande distance de travail et une grande profondeur de champ.

Les objectifs de grandissement supérieur x 40 ont une ON supérieure à 0,75 et offrent une excellente résolution mais une faible profondeur de champ.

Les objectifs à immersion ont une ON effective supérieure à 0,75.

La limite du pouvoir séparateur du microscope photonique pour une longueur d'onde électromagnétique moyenne de 550 nm (plage de 390 à 710 nm pour le domaine du visible), avec un objectif à immersion (n = 1,5 et α maximal) d'O.N. = 1,4 est de : d = (0,6 x 550/1,4) = 236 nm soit ~ 0,2 µm.

La limite du pouvoir séparateur de l'œil humain est d'environ 0,1 mm (ou 100 µm) ; le pouvoir séparateur du microscope optique à fond clair est 500 fois supérieur à celui de l'œil humain.

3.1.3 ABERRATIONS

Les principes optiques et physiques de formation de l'image décrits précédemment ont été énoncés dans le cadre de l'utilisation de lentilles *parfaites* (⇔ sans défauts) ; c'est-à-dire ne créant aucune aberration.

Dans la réalité, différentes contraintes techniques font que mêmes les systèmes optiques les plus complexes et précis (donc les plus chers) doivent chercher à minimiser quatre types d'aberrations : aberration chromatique, aberration sphérique, aberration de planéité et aberration de coma.

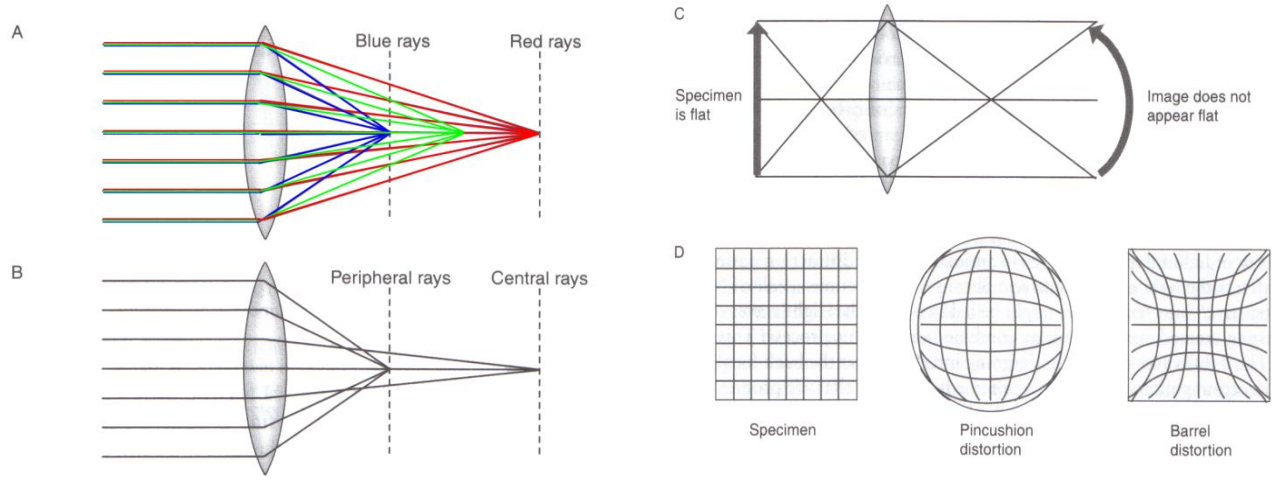


FIGURE 22 : LENTILLES ET ABERRATIONS COURANTES
A : Aberration chromatique liée à la différence d'angle de réfraction entre ondes électromagnétiques de longueur d'onde différente ; B : Aberration sphérique liée à la plus forte réfraction des rayons lumineux en périphérie de la lentille ; C : Aberration de planéité lié au fait qu'une lentille forme une image « courbe » d'un objet plan ; D : Images illustrant l'effet d'aberration de planéité sur un échantillon *répétitif* particulier.

On trouve ainsi des objectifs corrigeant plus ou moins les aberrations chromatiques avec pour les plus perfectionnés la correction des aberrations géométriques :

- Les objectifs achromatiques sont corrigés pour le rouge et le bleu ;
- Les objectifs apochromatiques sont corrigés pour trois longueurs d'onde, le spectre secondaire à totalement disparu ; ce sont les plus performants en ce qui concerne la résolution et le contraste.
- Les objectifs semi-apochromatiques sont à mi chemin entre ces deux catégories et donnent d'excellents résultats en éliminant le spectre secondaire grâce à l'utilisation de la fluorine qui donne un meilleur contraste et une meilleure résolution,
- Pour les objectifs corrigeant les aberrations géométriques le préfixe « plan » apparaît dans le nom (plan-achromatiques ou planachromatiques, plan-semi-apo ou plan semiapochromatiques et enfin plan-apochromatiques ou planapochromatiques) pour indiquer la correction de la courbure de champ.

3.1.4 AUTRES CARACTERISTIQUES

La construction optique des objectifs est complexe et très minutieuse. Une bonne qualité d'image nécessite 4 à 6 lentilles de différentes grandeurs et de différents verres, toutes étant petites à minuscules, positionnées de manière parfaite, polies, surfacées, collées et centrées. Les objectifs de haute qualité peuvent avoir jusqu'à 14 lentilles.

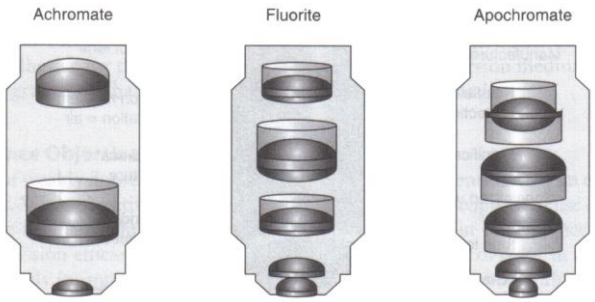


FIGURE 23 : SCHEMA DE CONSTRUCTION OPTIQUE DE DIFFERENTS OBJECTIFS

Le microscope optique moderne est constitué d'éléments présentant des caractéristiques « normalisées » offrant une plus grande facilité d'utilisation, de maintenance et de réparation.

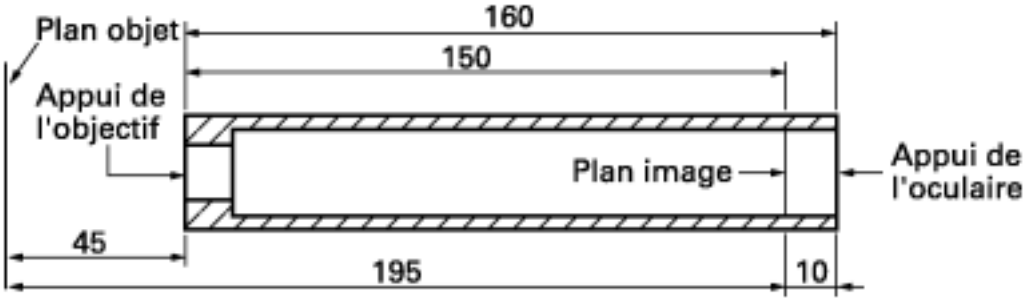


FIGURE 24 : PRINCIPALES DISTANCES NORMALISEES (EN MM)

Les objectifs proposent des grandissements en progression géométrique d'un coefficient proche de 1,6 et sont ***parafocaux*** ; c'est-à-dire que la mise au point est pratiquement conservée (et l'objet reste centré) à chaque changement d'objectif réalisé avec le revolver porte objectif.

Grandissement	2,5	4	6,3	10	16	25	40	63	100

En optique la notion de grandissement est associée au rapport de la taille de l'image d'un objet à travers un système optique à la taille de l'objet. Le grandissement de l'objectif (g) est le rapport de la taille de l'image intermédiaire réelle inversée formée dans le tube (A1B1) à la taille de l'objet microscopique (AB) situé sur la lame porte objet.

On retrouve gravé sur le corps des objectifs de nombreuses informations : longueur du tube optique, épaisseur du couvre objet, type de correction de l'objectif, milieu d'immersion, compatibilité avec différentes techniques de microscopie optique.

FIGURE 25 : EXEMPLE D'INDICATIONS FOURNIES SUR UN OBJECTIF

3.1.5 OBJECTIFS CORRIGES A L'INFINI

Initialement les microscopes optiques « droits » avaient classiquement (valeur standardisée), un tube optique de 160 mm et les microscopes optiques « inversés » un tube optique de 250 m.

Depuis le début des années 1980, les microscopes modernes sont montés avec des objectifs corrigés à « l'infini », ce qui permet d'insérer sur le trajet optique différents éléments d'optique : prismes, filtres … le tube optique de ces microscopes contient un système de lentilles supplémentaires : les lentilles de tube.

Ces objectifs corrigés à « l'infini » fournissent des rayons parallèles qui seront focalisés, par les lentilles de tube, sur le plan de formation de l'image intermédiaire. L'image formée étant finalement grossie par l'oculaire pour être projetés sur la rétine de l'œil de l'observateur comme dans « l'ancien » microscope optique.

3.2 LE CONDENSEUR DU MICROSCOPE PHOTONIQUE A FOND CLAIR

Le condenseur est un élément de l'optique d'éclairage qui permet de contrôler le cône de lumière qui éclaire la préparation et projette sur le plan focal arrière de l'objectif l'image de la source lumineuse.

Le cône de lumière convergente focalisé sur la préparation devient divergent après celle-ci : c'est le diaphragme d'ouverture situé à l'entrée du condenseur qui permet de contrôler l'ouverture du cône de lumière transmise pour que celui-ci soit complètement capté par la lentille frontale de l'objectif et participe ainsi dans son intégralité à la formation de l'image agrandie de l'objet.

L'ouverture numérique du condenseur doit être au moins égale à celle de l'objectif de plus forte ouverture numérique. C'est le diaphragme d'ouverture qui permet d'adapter l'ouverture numérique du condenseur aux différents objectifs portés par le révolver porte-objectifs.

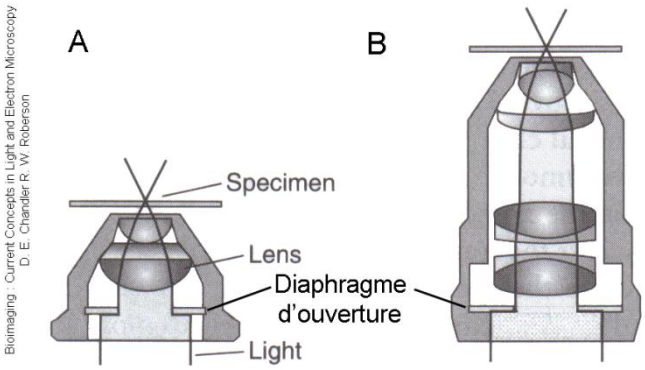


FIGURE 26 : (A) CONDENSEUR ACHROMATIQUE ; (B) CONDENSEUR A GRANDE O.N.

En microscopie photonique à fond clair on peut donc être amené à utiliser différents condenseurs en fonction de la gamme d'O.N. des objectifs montés sur le microscope mais aussi (comme pour tous systèmes de lentilles) en fonctions des aberrations optiques corrigées :

Un condenseur particulier dit « ultra-faible » possédant une O.N. variant de 0,02 à 0,16 permet d'exploiter correctement les objectifs de grandissement inférieur à x10 ; l'éclairage correct de la zone périphérique du champ observé est alors possible. Il existe des condenseurs à lentille escamotable permettent de couvrir une très large plage d'O.N.: 0,16 à 0,9

FIGURE 27 : CONDENSEUR A LENTILLE ESCAMOTABLE O.N. 0,16 - 0,9

Le condenseur d'Abbe est le plus simple (deux à trois lentilles) et courant. Les aberrations chromatiques et sphériques ne sont pas corrigées et sont O.N. est d'environ 1,2.

Le condenseur achromatique possède est corrigé pour les défauts de chromatisme et son ouverture numérique est de 1,25 à 1.3.

Le condenseur achromatique aplanétique assure une correction maximale de toutes les aberrations. Son ouverture numérique atteint 1,4. Il est recommandé pour les objectifs planachromatiques ; il permet de concentrer la lumière sur une surface très petite et conserve une grande ouverture.

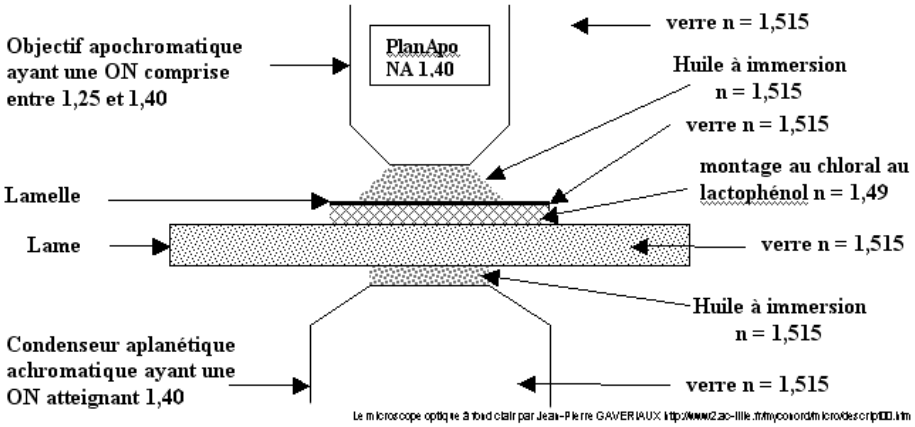


FIGURE 28 : CONDENSEUR APLANETIQUE ACHROMATIQUE (MONTAGE EN « MILIEU HOMOGENE »)

En pratique …

Le « bon » réglage du centrage, de la hauteur et du diaphragme d'ouverture sont indispensables pour exploiter pleinement un microscope optique à fond clair ; dans ces conditions la qualité de l'observation sera principalement limitée que par les caractéristiques de la préparation et celles de l'objectif.

Pour un condenseur ayant une O.N. égale ou supérieure à 0,9 la lentille supérieure du condenseur touche presque la surface inférieure de la lame.

Le réglage adéquat de l'O.N. du condenseur s'accommode le plus souvent d'une valeur correspondant au trois quart de celle de l'objectif utilisé ; ce réglage donne un bon contraste et préserve une certaine profondeur de champ. Cette remarque permet d'expliquer que l'utilisation d'un condenseur classique d'O.N. 0,90 est encore adaptée pour utiliser un objectif x100 à immersion ayant une O.N. de 1,25.
En l'absence d'indication concernant l'O.N. sur le corps du condenseur, le réglage « correct » du diaphragme d'ouverture peut nécessiter d'enlever les oculaires pour vérifier la position correspondant à la pleine ouverture d'éclairage pour l'objectif utilisé. Cette vérification *d'ouverture* (⇔ disque lumineux) est liée à l'O.N. de l'objectif (⇔ nombre)

Pour utiliser pleinement les condenseurs d'ouverture numérique de 1,25 à 1,40 avec les objectifs d'O.N. adaptées, il est nécessaire de travailler en immersion ; on parle de technique d'observation en milieu homogène. Une goutte d'huile à immersion (peu fluide) est insérée entre le condenseur ; l'objectif à immersion de grande ouverture numérique nécessitant lui aussi entre la lamelle couvre objet et sa lentille frontale une goutte d'huile à immersion.

3.3 LES OCULAIRES

3.3.1 PRINCIPALES CARACTERISTIQUES

L'oculaire grossit l'image intermédiaire formée par l'objectif et corrige certaines aberrations (chromatisme, planéité). Il est caractérisé par son grossissement et son indice de champ (fixé par son diaphragme de champ ; de 12 à 25 mm pour les oculaires à grand champ).

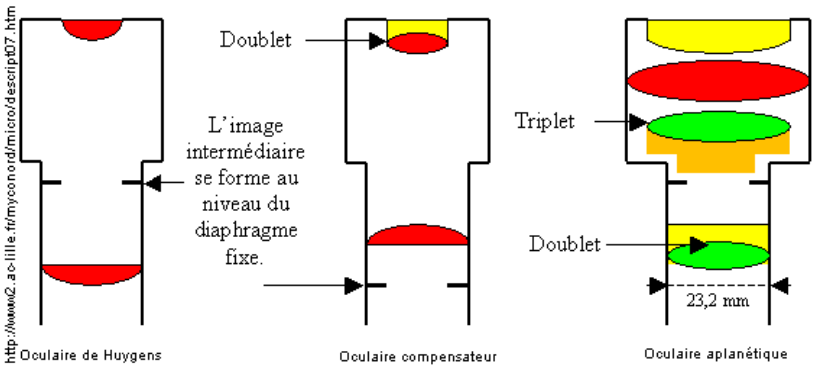


FIGURE 29 : SCHEMA DE PRINCIPE DE DIFFERENTS OCULAIRES

L'oculaire du microscope est une loupe qui projette sur la rétine, une image grossie, réelle et nette (sans accommodation de l'œil), de l'image agrandie de l'objet produite par l'objectif (A1B1). Son grossissement G est donné comme pour une loupe par la relation :

$$G = d/f$$

Où d = 250 mm distance minimale de vision distincte (punctum proximum) et f la distance focale de l'oculaire.

Le grossissement du microscope (G_m) est égal au produit du grandissement de l'objectif par le grossissement de l'oculaire : $G_m = g \times G$

En pratique …

En microscopie photonique à fond clair on ne dépasse généralement pas un grossissement (G_m) de 1000 ; la qualité première d'un microscope est son pouvoir séparateur pas son grossissement.

Avec les meilleurs microscopes optique à fond clair, équipés d'objectifs apochromatiques, ayant une ouverture numérique de 1,4 et pleinement exploitée par un condenseur achromatique-aplanétique à l'ouverture numérique suffisante on peut obtenir un pouvoir séparateur de d= 0,2 µm pour une observation en *milieu homogène* (⇔ présence d'huile à immersion entre le condenseur et la lame porte objet comme entre la lamelle couvre objet et l'objectif)

3.3.2 OCULAIRE MICROMETRIQUES ET MESURE AU MICROSCOPE

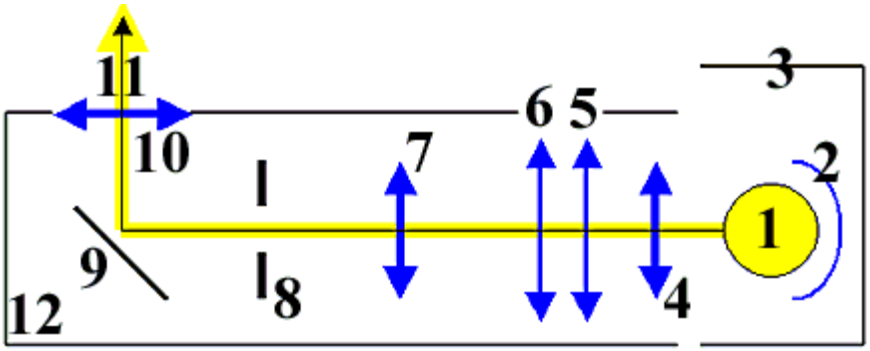
C'est au niveau du diaphragme de champ (plan de formation de l'image intermédiaire) que sont placés les dispositifs de mesure (micromètre), de repérage et de pointage.

L'utilisation d'un oculaire micrométrique (ou micromètre oculaire), échelle de 100 graduations équidistantes, nécessite son étalonnage pour chaque objectif à l'aide d'un micromètre objet. Le micromètre objectif (ou micromètre objet) est une lame possédant classiquement une échelle graduée de 2 mm, subdivisée en 100 graduations par mm ; soit une graduation tous les 10 µm.

3.4 COLLECTEUR ET SOURCE DE LUMIERE

Le microscope photonique à fond clair utilisé en sciences biologiques est le plus souvent équipé d'un éclairage diascopique fourni par une lampe halogène basse tension « externalisée » du pied du statif (pour éviter l'échauffement) et accompagnée d'un collecteur muni d'un diaphragme de champ.

Ce dispositif optique constitué de lentilles et d'un miroir incliné à 45° et est parfois surmonté d'un filtre « bleu ». Il permet de fournir un faisceau cylindrique de lumière « blanche » dont les rayons parallèles sont projetés perpendiculairement à la face d'entrée du condenseur.



Le microscope optique à fond clair par Jean-Pierre GAVERIAUX http://www2.ac-lille.fr/mycoord/microdescript03.htm

FIGURE 30 : COLLECTEUR ET AUTRES ELEMENTS DE LA SOURCE D'ECLAIRAGE (DIASCOPIQUE)

(1) Ampoule halogène à intensité lumineuse régulée par un potentiomètre ; (2) Réflecteur ; (3) Capot diffuseur de chaleur ; (4) Lentille collectrice ; (5) Verre anticalorique ; (6) Filtre correcteur ; (7) Diffuseur ; (8) Diaphragme de champ (⇔ contrôle du diamètre de la zone éclairée au niveau de la préparation) ; (9) Miroir incliné à 45° ; (10) Lentille de champ ; (11) Flux lumineux cylindrique perpendiculaire à la face d'entrée du condenseur

Le diaphragme de champ limite le diamètre du cylindre de lumière ascendant permettant ainsi de n'éclairer que la surface correspondant au diamètre de la lentille frontale de l'objectif.

L'intensité lumineuse et donc la clarté est régulée par un potentiomètre contrôlant l'alimentation de la lampe halogène.

Le filtre « bleu » attenue la dominante « jaune-orange » de la lumière émise par cette source de lumière artificielle pour se rapprocher des caractéristiques de la lumière du jour. Ce filtre peut se trouver situé à l'entrée du condenseur ou bien encore avant la sortie du collecteur.

En microscopie à fluorescence l'éclairage est épiscopique.

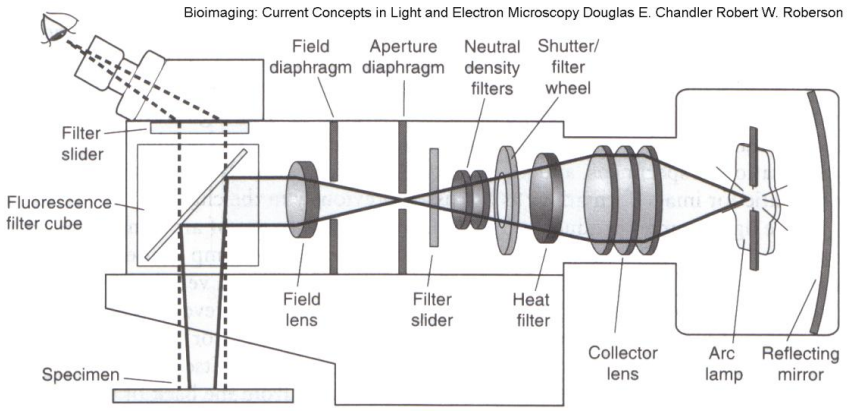


FIGURE 31 : ECLAIRAGE EPISCOPIQUE (MICROSCOPIE A FLUORESCENCE)

3.5 L'ECLAIRAGE DE KÖHLER ET L'UTILISATION DU MICROSCOPE PHOTONIQUE A FOND CLAIR

Une bonne observation impose un éclairage « correct » de l'objet ; En microscopie photonique à fond clair l'image formée par la lumière déviée par l'objet est vue sur un fond de lumière non déviée.

La « méthode de Köhler » permet d'adapter l'optique d'éclairage (couple collecteur – condenseur) aux limitations de l'optique de formation de l'image (essentiellement l'objectif) pour obtenir de façon simple et reproductible une observation optimisée (image résolue et contrastée). A chaque changement d'objectif certains de ces réglages sont donc systématiquement à modifier.

D'un point de vue pratique la « méthode de Köhler » assure :

- ⇒ Une répartition homogène de la lumière dans le champ
- ⇒ L'exploitation maximale de l'O. N. de l'objectif (chaque objectif)
- ⇒ L'élimination à la fois des rayons marginaux et de la lumière diffusée
- ⇒ L'obtention de résultats d'observation reproductibles

Cette méthode permet ainsi :

- ⇒ De voir l'objet et non les défauts de l'éclairage
- ⇒ D'assurer une cohérence partielle entre l'éclairage et la limite de résolution
- ⇒ De limiter la lumière parasite

L'utilisation du microscope photonique à fond clair avec la « méthode de Köhler » suit les étapes suivantes :

1. Mettre au point avec l'objectif utilisé pour l'observation finale
2. Régler la vision binoculaire (réglage inter pupillaire voir dioptrique)
3. Centrer le diaphragme de champ
4. Régler la hauteur du condenseur
5. Régler l'ouverture du diaphragme de champ
6. Centrer et régler la source (si possible et/ou nécessaire)
7. Régler l'ouverture du diaphragme d'ouverture
8. Régler la luminosité et affiner la mise au point

L'éclairage de Kölher proprement dit concerne les étapes qui une fois la mise au point effectuée assure le réglage correct du couple collecteur condenseur diaphragmés (étapes 3 à 7).

Tout changement d'objectifs (même parafocaux) doit conduire à reconsidérer au moins les réglages des diaphragmes de champ (du collecteur) et d'ouverture (du condenseur).

4 LES AUTRES TECHNIQUES MICROSCOPIQUES PHOTONIQUES UTILISEES EN SCIENCES BIOMEDICALES

Les principales limitations de la microscopie photonique à fond clair sont le faible contraste de la plupart des échantillons biologiques et une résolution très moyenne due au flou créé par les zones de l'objet situées hors du plan focal.

A coté des nombreuses techniques de préparation des échantillons permettant de lever partiellement ces limitations des améliorations et/ou transformations - adaptations du microscope photonique à fond clair à d'autres modes d'observation, ce sont développées.

4.1 LA MICROSCOPIE A FOND NOIR

4.1.1 PRINCIPE

La lumière *non déviée* est exclue, la lumière *déviée* produit l'image ; cette technique d'observation permet d'augmenter considérablement le contraste (contraste *extrême*) des échantillons « transparents » car seule la lumière *diffusée* par l'échantillon est collectée et intervient dans la formation de l'image.

Si le fond de la préparation ne diffuse pas la lumière, il apparaît noir ; seules les zones (objets microscopiques) diffusant la lumière apparaitront lumineuses.

La limite de résolution n'est généralement pas modifiée. La faible intensité lumineuse peut être une limitation propre à cette technique microscopique.

Le système d'éclairement utilise un condenseur particulier qui lorsqu'il est précisément centré et réglé interdit à tous les rayons lumineux de la source non diffractés de pénétrer dans l'objectif.

4.1.2 ELEMENT OPTIQUE SPECIFIQUE

Un condenseur pour fond noir comprend un diaphragme annulaire qui laisse passer un cylindre creux de lumière transformé par un système de miroirs en cône creux qui converge sur la préparation ; les rayons d'ordre zéro ne pénètrent pas dans l'objectif.

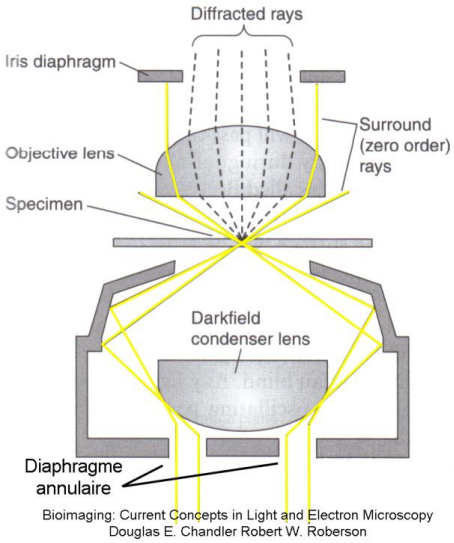


FIGURE 32 : CONDENSEUR A FOND NOIR

4.1.3 DOMAINE D'UTILISATION

L'observation directe d'échantillons frais, non préparés mais suffisamment fins et petits est le principal domaine d'application de cette technique d'observation. Cela autorise la microcinématographie sur échantillon vivants sur montage dit « à l'état frais ».

L'observation en fond noir est performante et même spectaculaire pour observer des objets réguliers (opaques comme les diatomées ou non), punctiformes ou linéaires très fins (cils, bactéries du groupe des spirochètes …).

Cette technique n'a pas d'intérêt pour les préparations (coupes et frottis) fixées et colorées.

4.2 LA MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE

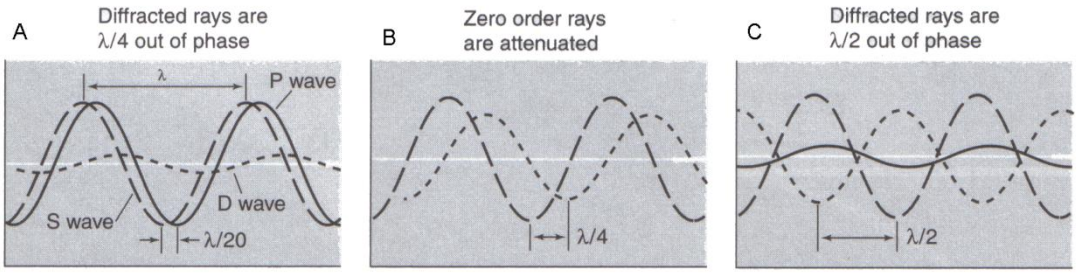
4.2.1 PRINCIPE

Le principe de la microscopie en contraste de phase est basé sur l'obtention d'une image d'amplitude à partir d'un objet de phase ; l'œil humain est sensible aux différences d'amplitude (luminosité) et de longueur d'onde (couleur). Les images observées en microscopie photonique à fond clair sont des images d'objets d'amplitude.

En sciences biologiques de nombreux objets microscopiques ne produisent pas de changements appréciables d'intensité ou de couleur sur la lumière qui les traverse mais induisent seulement des changements de phase ; de tels objets sont qualifiés d'objets de phase.

L'optique physique (ondulatoire) explique que ces objets de phases « incomplètement transparents » aux ondes électromagnétiques produisent des *déphasages* liés aux retards engendrés par les différences de longueur de chemin optique (épaisseur de l'objet de phase) et d'indice de réfraction (contenu de l'objet de phase).

En retardant suffisamment les rayons n'ayant pas traversé l'objet de phase (rayons non diffractés) au niveau de l'objectif (après la préparation), les phénomènes d'interférence (destructive) entre ondes permettent de construire une image d'amplitude réelle agrandie inversée de l'objet au niveau du tube optique du microscope.



Bioimaging: Current Concepts in Light and Electron Microscopy
Douglas E. Chandler Robert W. Roberson

FIGURE 33 : PRINCIPE DU CONTRASTE DE PHASE

S : onde des rayons d'ordre zéro n'ayant pas rencontrée d'objet (environ 20 fois plus intense et décalée d'environ 90° par rapport à l'onde diffractée « D ») ; D : onde de lumière diffractée ayant traversée l'objet de phase ; P : onde résultant de la sommation de S et D.

Figure 32A : situation en microscopie photonique à fond clair ; Figure 32B : « D » et « S »ont des intensités comparables après l'anneau de phase qui a atténué et retardé d'un quart de longueur d'onde, les ondes non diffractées « S » ; Figure 32C : le décalage de phase entre les ondes « S » et « D » engendre des interférences destructives maximales et forme une onde « P » équivalente à zone sombre.

4.2.2 ELEMENTS OPTIQUES SPECIFIQUES

Dans son principe de mise en œuvre l'observation en contraste de phase nécessite *d'apparier* condenseur et objectif. En effet, l'objectif possède un disque annulaire spécial (⇔ disque de phase) au niveau de son plan focal arrière, dont les dimensions correspondent à l'image du diaphragme annulaire du condenseur de phase situé sur la face d'entrée de celui-ci.

Chaque changement d'objectif implique un changement de diaphragme annulaire au niveau du condenseur de phase; l'alignement du couple condenseur de phase – objectif est aussi indispensable que le respect de *l'appariement* condenseur de phase – objectif.

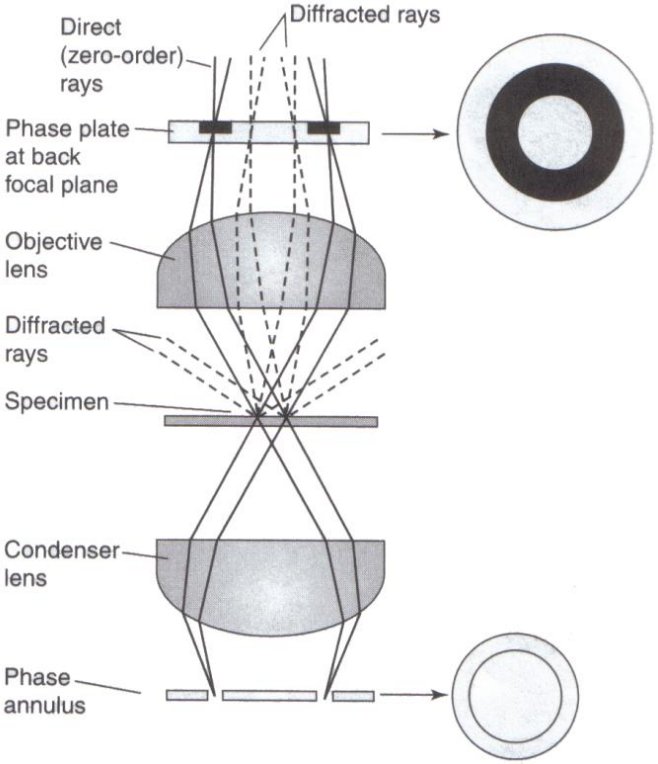


FIGURE 34 : COUPLE CONDENSEUR - OBJECTIF EN CONTRASTE DE PHASE

4.2.3 DOMAINE D'UTILISATION

L'observation en contraste de phase permet de révéler en l'absence de traitement de l'échantillon (fixation – coloration) des détails invisibles en microscopie à fond clair.

Cette technique s'applique à toutes les observations d'objets microscopiques faiblement contrastés ; elle est particulièrement intéressante en culture cellulaire pour l'observation directe à l'aide d'un microscope inversé de cultures en flacon pour culture cellulaire (Falcon).

4.3 LA MICROSCOPIE A CONTRASTE INTERFERENTIEL DIFFERENTIEL (DIC)

En sciences biologiques une des microscopes interférentiels[10] le plus spectaculaire est un microscope diascopique à lumière polarisée donnant des images au relief saisissant : le microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC)

[10] La microscopie en lumière polarisée très utilisée dans l'étude des roches (analyse des minéraux) est en fait une forme de microscopie d'interférence.

4.3.1 PRINCIPE

Comme la microscopie en contraste de phase, la microscopie d'interférence transforme des déphasages d'ondes traversant des objets incomplètement transparents en différences *d'amplitude* (intensité – *coloration*).

Le principe du contraste interférentiel différentiel (DIC) repose sur la division d'un rayon lumineux polarisé en deux rayons de même longueur d'onde, mais polarisés orthogonalement et séparés spatialement d'une distance très courte (une fraction de la longueur d'onde).

La séparation en deux rayons est réalisée par un Wollaston (assemblage particulier de deux cristaux biréfringents). Ces deux rayons (nommés respectivement ordinaire et extraordinaire) traversent l'objet microscopique en deux points différents mais très proches ; les milieux différents traversés par chacun des deux rayons, entraînent un déphasage différent.

Après l'objectif les deux rayons sont recombinés par un second Wollaston et viennent interférer sur un filtre polariseur.

Suivant la différence de phase entre les rayons, un contraste positif ou négatif sera créé révélant ainsi les structures intracellulaires invisibles en « fond clair ».

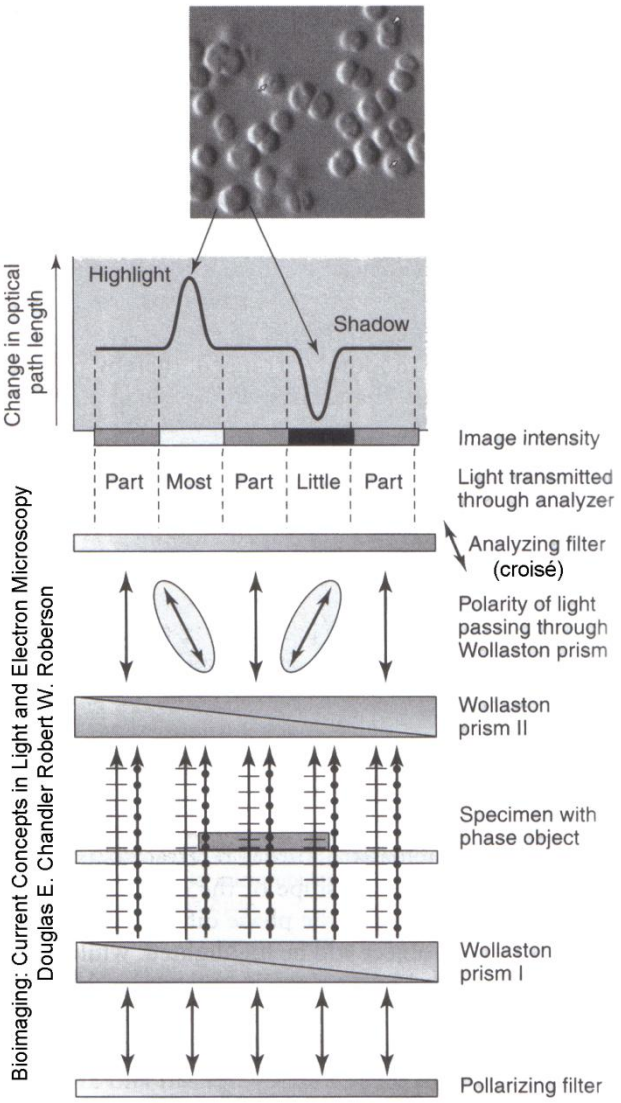


FIGURE 35 : PRINCIPE MICROSCOPIE A CONRASTE INTERFERENTIEL DIFFERENTIEL (DIC)

4.3.2 DOMAINE D'UTILISATION

Le contraste interférentiel différentiel (DIC) aussi appelé contraste « Nomarski » est très performant pour l'observation de préparations non colorées d'objets très peu contrastés en microscopie photonique à fond clair.

4.4 LA MICROSCOPIE A FLUORESCENCE (CLASSIQUE)

4.4.1 PRINCIPE

Certaines molécules fluorescentes (fluorophore ou fluorochrome) possèdent la propriété :

- ⇒ d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) ;
- ⇒ et de la restituer rapidement (quelques nanosecondes) sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission de longueur d'onde différente toujours plus grande),

lors du retour de cette molécule de l'état excité à un état plus stable.

La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise. Suivant les cas la fluorescence peut être :

- ⇒ primaire ou auto fluorescence ou *directe* (chlorophylles, paroi de kystes de parasites …)
- ⇒ secondaire à un marquage plus ou moins spécifique, immunologique (direct ou indirect) voir génétique (ex. protéine recombinante fluorescente avec la *Green Fluorescent Protein* ou GFP) permettant alors d'observer la fluorescence directement dans les cellules vivantes.

4.4.2 ELEMENTS OPTIQUES SPECIFIQUES

En sciences biologiques le microscope à fluorescence « classique » le plus courant permet une épi-illumination de l'échantillon (épiscopie).

La source lumineuse est une lampe à mercure qui produit un rayonnement intense (dont la « chaleur » est limitée par un filtre anticalorique) qui traverse un filtre d'excitation (de type passe bande) ne transmettant que *la* longueur d'onde désirée.

La fluorescence émise est collectée par l'objectif pour former une image réelle grandie, débarrassée des rayons excitateurs réfléchis par le filtre d'arrêt du tube (de type passe-haut), au niveau du plan image tube optique.

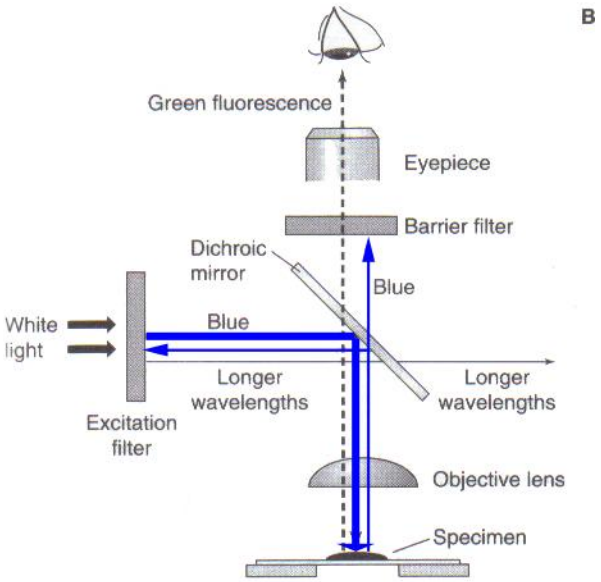


FIGURE 36 : EPI-ILLUMINATION EN FLUORESCENCE

4.5 LA MICROSCOPIE CONFOCALE (A BALAYAGE LASER)

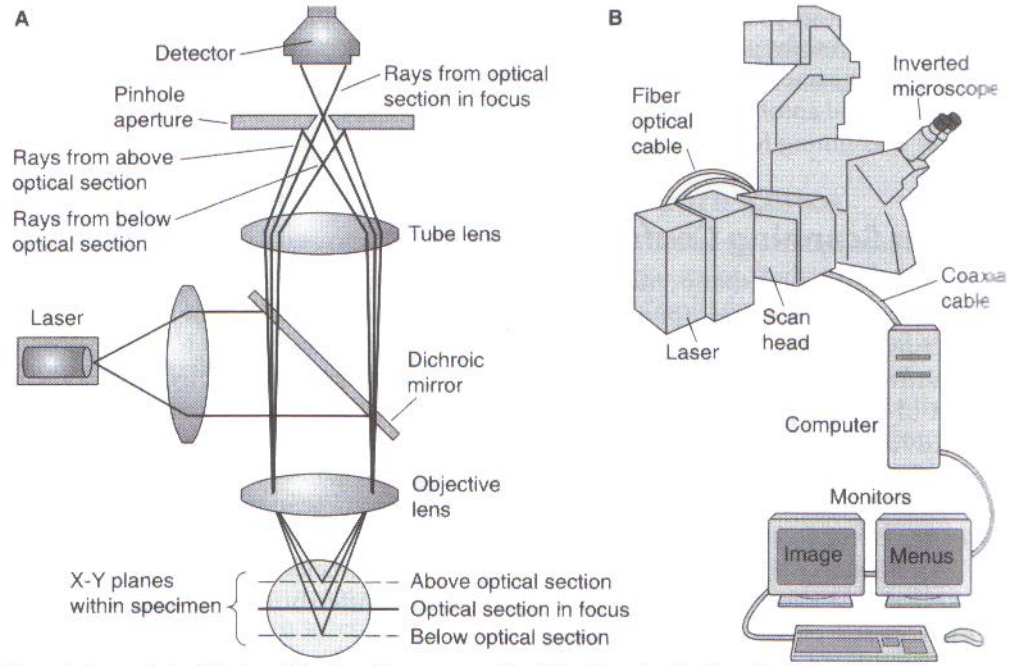
Le microscope optique confocal peut réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». C'est un microscope qui fonctionne en lumière réfléchie ou en fluorescence.

L'informatisation du système de détection et la puissance de calcul des microprocesseurs, permet de réaliser en déplaçant le plan focal de l'objectif dans l'épaisseur de l'objet, des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de ce dernier.

L'élément clé de ce microscope confocal est représenté par une "fenêtre" (⇔ *pinhole aperture* soit un sténopé ou un iris confocal) placée devant le détecteur (dans le plan focal conjugué au plan focal de l'objectif ⇔ plans confocaux) qui élimine la fluorescence (ou la lumière réfléchie) provenant des régions non focales.

La plupart du temps, la source lumineuse est un laser (monochromatisme, contrôle et filtrage mieux maitrisés que pour d'autres sources) ; on parle alors de microscope confocal à balayage laser — MCBL (en anglais CLSM pour *confocal laser scanning microscope*).

L'observation de signaux de fluorescences repose sur cinq éléments : La plupart du temps, on utilise un laser comme source de lumière.



Current Concepts in Light and Electron Microscopy 1st edition Douglas E. Chandler Robert W. Roberson

FIGURE 37 : MICROSCOPIE CONFOCALE (A BALAYAGE LASER)

A : Un sténopé est placé devant le détecteur ; B : Principaux éléments du MCBL

ANNEXES

LISTE SIMPLIFIEE DES PRINCIPAUX SIGLES INSCRITS SUR LE CORPS DES OBJECTIFS (EXTRAIT DU SITE LE MICROSCOPE OPTIQUE A FOND CLAIR PAR JEAN-PIERRE GAVERIAUX)

A ; Achro ; Achromat = objectifs achromatiques
Apo ; *Apochromat* = objectifs apochromatiques
DIC ; *NIC* = obj. pour contraste interférentiel (Contraste de Nomarski)
ELWD = obj. pour extra longue distance de travail
Epi = objectifs pour épi-illumination
Fl ; *Fluo* ; *Neofluar* ; *Fluotar* ; *Semi-apo* = objectifs à la fluorine = obj. semi-apochromatiques
Fluo-plan ; *Pl-Fl* = objectifs plans semi-apochromatiques ou plans à la fluorine
G.F. = objectifs grand champ
Gly = Immersion dans la glycérine
H = pour utilisation avec une platine chauffante.
HI = Immersion homogène
I ; Iris ; W/Iris = objectif muni d'un diaphragme permettant la modification de l'ouverture numérique (exemple lors de l'utilisation avec condenseur pour fond noir).
Korr ; Corr, W/Corr ; CR = objectif avec bague permettant l'ajustement à l'épaisseur de la lamelle.
LU = Obj. (Nikon) universel pour fond clair, fond noir, contraste de phase et lumière polarisée.
LWD = Obj. pour grande distance de travail (Long-Working-Distance)
M = objectifs pour métallographie (n'utilisant pas de lamelle couvre-objet).
NCG = objectifs pour observation sans lamelle couvre-objet (*No-Cover Glass*)
Oil ; Oel = obj. nécessitant l'immersion dans l'huile.
P ; *Pol* = objectifs spéciaux pour lumière polarisée
P ; *Pol* ; *SF* = objectif sans contrainte (strain free) utilisé pour avoir une lumière polarisée de haute qualité.
Ph ; *Phaco* = objectifs pour contraste de phase en association avec un condenseur spécial
Plan ; *Pl* ; *NPl* = objectifs planachromatiques
Planapo ; *Apoplan* = objectifs planapochromatiques
SLWD = obj. pour très longue distance de travail (Super-Long-Working-Distance).
UPLAN = Obj. (Olympus) universel pour fond clair, fond noir, contraste de phase et lumière polarisée.
UV = obj. ayant un traitement particulier des surfaces des verres spéciaux afin de permettre le travail dans l'ultraviolet ($\lambda < 400$ nm).*Water ; WI ; Wasser* = Immersion dans l'eau.

Les lettres sont noires pour les types standards, rouges pour les objectifs destinés à la lumière polarisée et vertes pour le contraste de phase.

LONGUEUR DU TUBE OPTIQUE ET PRINCIPE DE LA CORRECTION A L'INFINI DES MICROSCOPES RECENTS

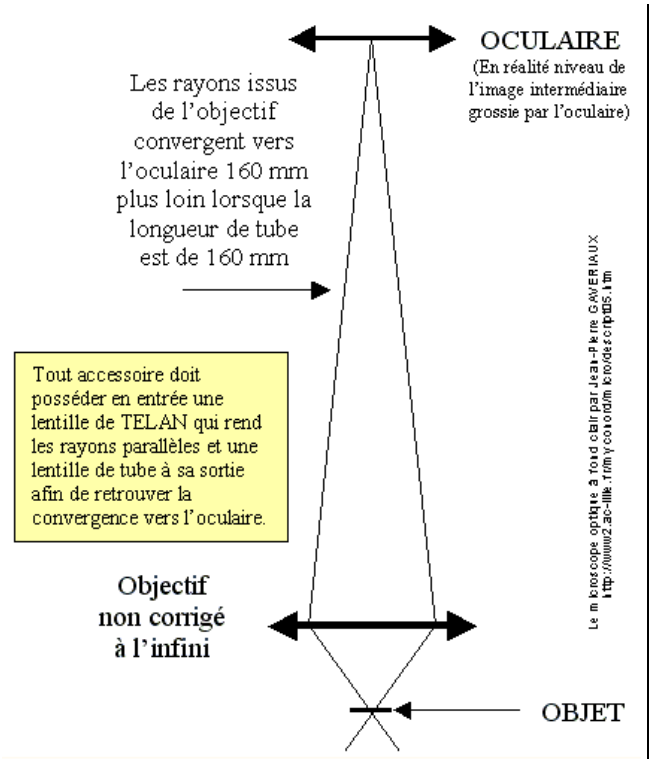


FIGURE 38 : TUBE OPTIQUE "CLASSIQUE"

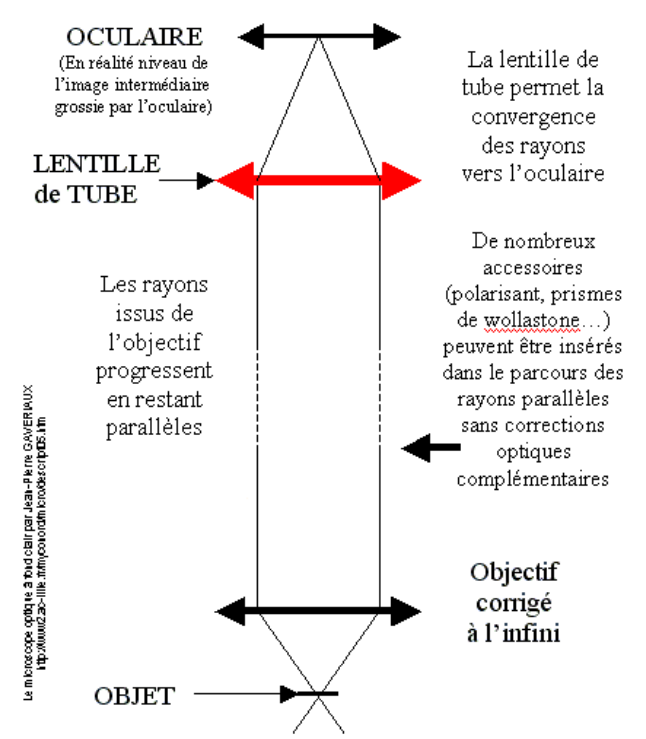
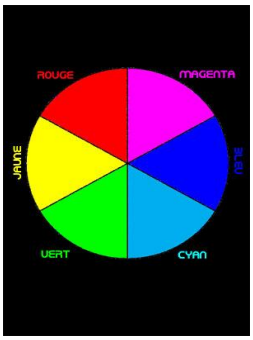


FIGURE 39 : TUBE OPTIQUE "INFINI"

LES COULEURS (EXTRAIT DE HTTP://WWW.ICONEOCLASTE.COM/INDEX.PHP)

La reproduction de tout le spectre de la couleur sensible à l'œil humain (~de 400 nm à 700 nm) se fait par le mélange de trois couleurs primaires et de trois couleurs secondaires :
- Les trois primaires : **Rouge** - **Bleu** - **Vert**
- Les trois secondaires ou complémentaires : **Cyan** - **Jaune** - **Magenta**

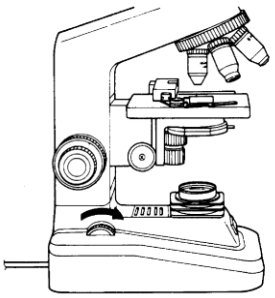


La synthèse additive :

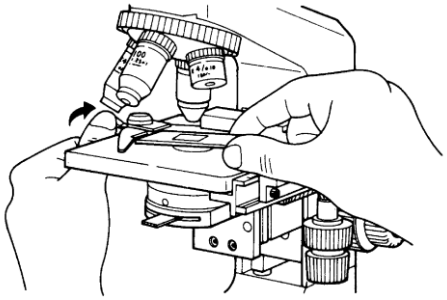
Deux couleurs sont dites complémentaires lorsque leur addition (mélange additif) donne le blanc. Sur le schéma ci-contre sont représentées les trois couleurs primaires et opposées les trois couleurs complémentaires. Exemple :
- Le **Rouge** + le **Cyan** (**Bleu** + **Vert**) = Blanc
- Le **Bleu** + le **Jaune** (**Vert** + **Rouge**) = Blanc
- Le **Vert** + le **Magenta** (**Rouge** + **Bleu**) = Blanc

L'UTILISATION DU MICROSCOPE PHOTONIQUE A FOND CLAIR

1. Mettre sous tension la source de lumière après s'être assuré que le potentiomètre de réglage de l'intensité lumineuse se trouve sur sa position minimale.



Les lampes halogènes supportent mal les variations brusques de tension. Les réglages du microscope prennent du temps et les préparations microscopiques supportent mal l'échauffement du à une intensité lumineuse trop élevée

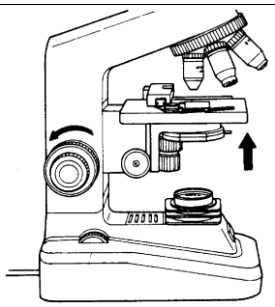


2. Ouvrir les diaphragmes de champ (au-dessus du collecteur de lumière situé après la lampe) et d'ouverture (à l'entrée du condenseur).

3. Positionner la préparation à observer sur la platine porte objet.

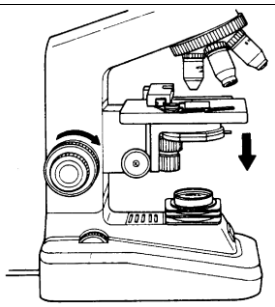
Le réglage de ces diaphragmes dépend de l'objectif utilisé et des caractéristiques de la préparation observée (objet +/- épais et +/- coloré, épaisseur variable de la lame porte objet et éventuellement de la lamelle couvre objet).

4. Préparer la mise au point à un faible grossissement en amenant la préparation à moins d'un millimètre de la lentille de l'objectif x40.
Le technicien regarde sur le coté du microscope, ses yeux ne sont pas sur les oculaires.
Tourner le revolver porte objectif pour (éventuellement) positionner un objectif de faible grandissement (x10).

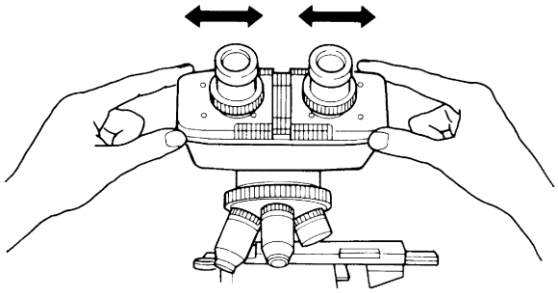


Tous les microscopes n'ont pas de système de réglage de la pré focalisation. La recherche de la mise au point en « aveugle » (⇔ les yeux sur les oculaires sans pré focalisation préalable) :
- augmente le risque de toucher l'objectif avec la préparation (très petits objets nécessitant d'emblée l'objectif x40) ;
- est très laborieuse (longue) pour le novice qui ne sait pas à quelle distance d'un objectif court (x4 ou x10) se trouve la plage de mise au point.

5. Les yeux sur les oculaires, on ajuste l'intensité lumineuse (potentiomètre sur le pied du statif) et on recherche la mise au point (vis macrométrique puis micrométrique) en éloignant lentement la platine porte objet de la lentille de l'objectif.
5 bis. Si la mise au point n'est pas trouvée, il est préférable de remonter la platine porte objet en regardant sur le coté du microscope et reprendre à l'étape 4.

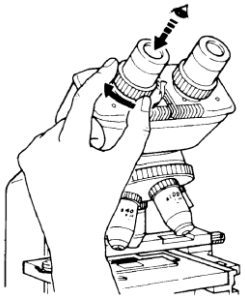


Eviter le choc objectif - préparation. Permettre éventuellement de déplacer la lame porte objet vers une zone apparaissant à l'œil nu plus colorée.

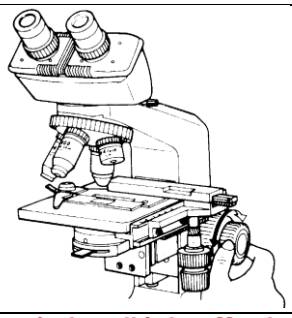


6. Régler l'écartement inter pupillaire des oculaires pour obtenir une parfaite superposition des deux images vues par chaque œil. On observe alors une seule image circulaire.

7. Affiner la mise au point en ne regardant qu'avec l'œil ne disposant pas d'oculaire réglable (l'autre œil étant fermé).
7 bis. Sans toucher à la mise au point (vis macro et micrométrique) jouer sur l'oculaire à réglage dioptrique pour obtenir une image nette avec l'œil précédemment fermé (l'œil ayant initialement servi à affiner la mise au point étant alors fermé).



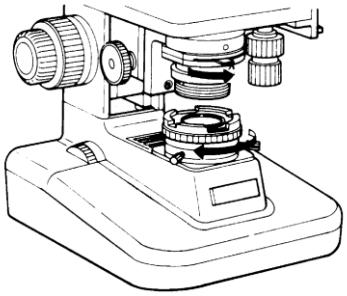
Permettre à l'utilisateur ayant une différence d'acuité visuelle entre ses deux yeux de profiter du confort de l'observation binoculaire.

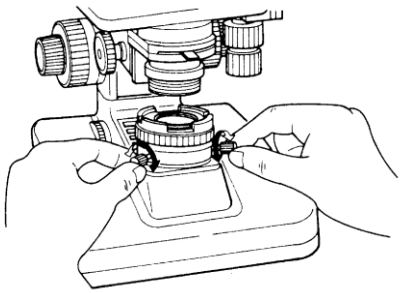


8. Repérer le champ le plus intéressant en utilisant le chariot guide objet puis positionner l'objectif souhaité pour l'observation. Ajuster éventuellement la mise au point (vis micrométrique).
8 bis. Les étapes suivantes de réglage des éléments de l'optique d'éclairage peuvent éventuellement se réaliser en retirant la préparation en prenant garde de ne pas changer la mise au point

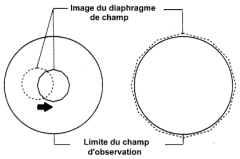
Il ne sert à rien d'échauffer inutilement la préparation.

9. Fermer progressivement les diaphragmes de champ et d'ouverture (respectivement sur le collecteur et sous le condenseur) pour n'éclairer qu'une partie du champ observé. Le diamètre de la colonne de lumière qui monte de la source est plus petit que le champ présent sous la lentille de l'oculaire.

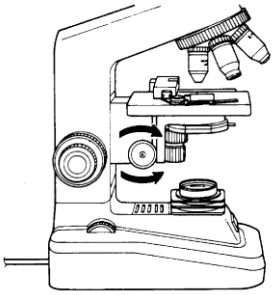




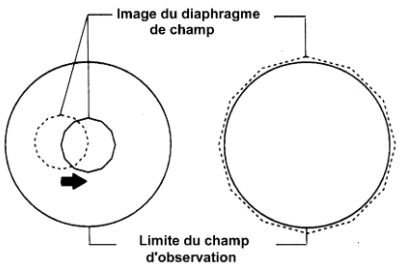
9 bis. Si en fermant le diaphragme de champ, le faisceau d'éclairage n'est pas centré par rapport au champ d'observation, il faut recentrer l'iris du diaphragme en jouant sur les vis situées sur les cotés du système d'éclairement (collecteur + diaphragme de champ) ou au niveau du condenseur (suivant les microscopes)
L'axe du faisceau d'éclairage qui traverse l'objet et l'axe de l'objectif doivent être alignés.



Lorsque l'on regarde des diapositives on fait en sorte que la seule lumière présente dans la pièce soit celle qui traverse la diapositive (⇔ champ observé). Chaque point de la source éclaire l'ensemble de la préparation: on a un fond clair



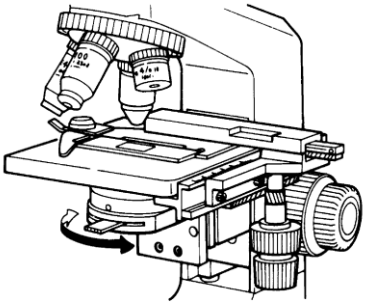
10. Régler la hauteur du condenseur pour obtenir un bord net de la zone de champ éclairée lorsque le diaphragme de champ est partiellement fermé. Puis ré ouvrir le diaphragme de champ pour éclairer de nouveau tout le champ d'observation.



Tous les faisceaux lumineux se croisent sur l'objet. Chaque point de l'objet est éclairé par l'ensemble de la source de lumière et donne un point sur la rétine.

11 : Régler et centrer la source lumineuse si le microscope le permet pour projeter l'image de la source lumineuse (filament de tungstène) dans le plan du diaphragme d'ouverture. Cette manipulation nécessite de supprimer les filtres dépolis entre la source et le condenseur, de centrer le filament à l'aide des vis de centrage de la lampe et enfin de modifier la distance lampe collecteur pour que le filament couvre tout le champ.

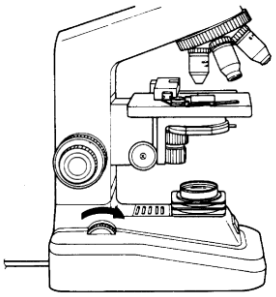
En l'absence d'objet, l'obtention d'un fond uniformément clair où chaque point de la source éclaire l'ensemble du champ d'observation et de la rétine nécessite d'avoir une source lumineuse réglée et centrée ; le principe de l'éclairage de Köhler est de projeter l'image de la source lumineuse dans le plan du diaphragme d'ouverture ***.***



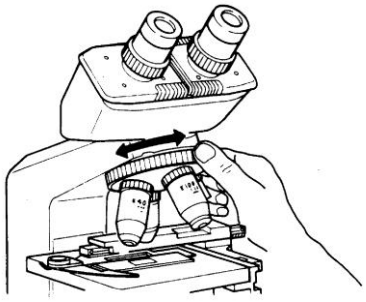
12. Régler le diaphragme d'ouverture (situé à l'entrée du condenseur) :
Pour les objets très contrastés (⇔ colorés) le meilleur pouvoir séparateur est obtenu lorsque l'ouverture d'éclairage est égale à l'ouverture numérique de l'objectif. On parle de « pleine ouverture d'éclairage ».
Pour les objets peu contrastés, il faut fermer le diaphragme d'ouverture jusqu'à environ 3/4 ou 2/3 de la « pleine ouverture d'éclairage ». Cela permet d'augmenter le contraste et la profondeur de champ (malheureusement le pouvoir séparateur est alors moins bon).
Remarques : Lorsque l'on change d'objectif il est nécessaire d'ajuster l'ouverture du diaphragme d'ouverture (chaque objectif à une ouverture numérique différente).
En l'absence d'indication sur le condenseur, le bon réglage est celui qui offre un bon contraste et donne une image bien définie.

Si le D.O. est trop ouvert des rayons diffractés ou diffusés hors de la zone observée pénètrent dans l'objectif (ouverture d'éclairage supérieure à l'ouverture numérique de l'objectif) et diminue les contrastes. Si le D.O. est trop fermé l'image est sombre et des franges de diffraction apparaissent ; Dans les deux cas l'image est de mauvaise qualité.
A la « pleine ouverture d'éclairage » on observe qu'en retirant l'oculaire, le diamètre de l'image du diaphragme est égal à celui de l'objectif.
Certains condenseurs possèdent sur le coté une échelle indiquant en fonction de la position du D.O. l'ouverture numérique du cône de lumière focalisé sur la préparation. Pour les autres condenseurs il est toujours possible d'enlever l'oculaire pour ajuster l'ouverture du D.O. au 3/4 de la « pleine ouverture d'éclairage » de l'objectif utilisé.

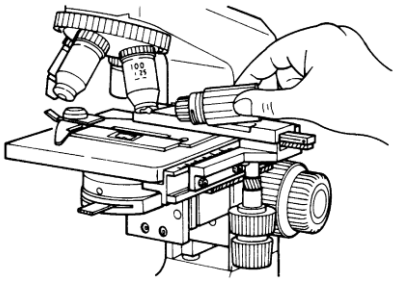
13. La clarté se règle sur le potentiomètre de modulation de l'intensité lumineuse.
C'est le seul réglage qu'il faut modifier en attendant votre professeur : intensité lumineuse au minimum.



Jouer sur le diaphragme d'ouverture pour ajuster la clarté est une erreur car on touche alors systématiquement la qualité de l'image (contraste et pouvoir séparateur).



14. Pour passer en immersion, on conserve la mise au point. L'objectif x40 est dégagé de l'axe optique en tournant doucement le revolver porte objectif. Lorsque les objectifs x40 et x100 sont de part et d'autre de la préparation on dépose une très fine goutte d'huile à immersion puis l'objectif x100 est positionné au-dessus de la préparation.



Après cette opération on ne peut plus retourner vers les objectifs de plus petits grandissements. Les autres objectifs ne doivent pas entrer en contact avec l'huile à immersion.
Il faut ajuster le réglage des diaphragmes au nouvel objectif.

15. Après utilisation :

⇒ diminuer l'intensité lumineuse au maximum (potentiomètre) puis éteindre le microscope (interrupteur)
⇒ essuyer l'objectif à immersion avec du papier Joseph.
⇒ coincer un carré de papier Joseph entre la lentille frontale de l'objectif à immersion et la platine porte objet.
⇒ remettre la house de protection sur le microscope

Maintenir la qualité du matériel et réduire les coups d'entretien

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

OUVRAGES

Bioimaging: Current Concepts in Light and Electron Microscopy 1st edition
Douglas E. Chandler Robert W. Roberson Editeur Jones and Bartlett Publishers – 2009– 978-0-7637-3874-7

Optical Imaging and Microscopy: Techniques and Advanced Systems
2nd edition Peter Török, Fu-Jen Kao Editeur Springer series in optical sciences – 2007 – ISBN 978-3-540-69563-9

La microscopie : Techniques d'étude en biologie
Jean –Pierre Péré Editeur Nathan université sciences 128 – 1994 – ISBN 209 190727 8

RESSOURCES NUMERIQUES

DOCUMENTS EN LIGNE

Le microscope optique à fond clair par Jean-Pierre GAVERIAUX - secrétaire de la SMNF - L'utilisation du microscope optique en mycologie et lichénologie

Techniques de l'ingénieur Rubrique : Mesures – Analyses / Métrologie optique et photonique / Microscopie optique Date de publication : 10 juin 1999
Gérard ROBLIN : Directeur de recherche au Centre national de la recherche scientifique (CNRS) (ER), Docteur ès sciences

Cours et travaux dirigés en licence Sciences de la Vie module : Biologie et Physique - optique & microscopie de Arnauld Sergé Maître de Conférences Biophysicien : Département de Biologie Faculté des Sciences de Luminy Université de la Méditerranée (alias Aix-Marseille II)

MicrOscOpieS : Le site des Microscopistes Amateurs Francophones

Introduction à la microscopie par Frithjof A. S. Sterrenburg (traduit par G.Vuille) Hosted by Micscape Magazine, the monthly magazine of Microscopy-UK.

SITES DE FABRICANTS DE MATERIEL POUR LA MICROSCOPIE OPTIQUE (LISTE NON EXHAUSTIVE)

Carl Zeiss http://www.zeiss.fr Zeiss Campus Education in Microscopy and Digital Imaging

Nikon France http://www.nikon.fr MicroscopyU The source for microscopy education

Leica Microsystems http://www.leica.com

Olympus France http://www.olympus.fr

Nachet http://www.nachet.com

D'après http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil

[a] Ernst Abbe (23 janvier 1840 à Eisenach - 14 janvier 1905 à Iéna) était un physicien et un industriel allemand. Il fut professeur à l'université d'Iéna en 1870, directeur des observatoires astronomiques et météorologiques en 1878, associé puis successeur de Carl Zeiss (1866) à la direction de sa société. Il développa la théorie de la formation de l'image microscopique (1872) et mit au point le condenseur pour améliorer la qualité de l'image. Il perfectionna le microscope grâce à ses travaux sur l'élimination de l'aberration sphérique et la coma des lentilles. Il est l'inventeur du prisme d'Abbe. Il introduit le nombre d'Abbe qui est une grandeur essentielle en optique oculaire : le rapport de la réfraction avec la dispersion. Il établit la condition d'aplanétisme des systèmes centrés (relation des sinus d'Abbe).