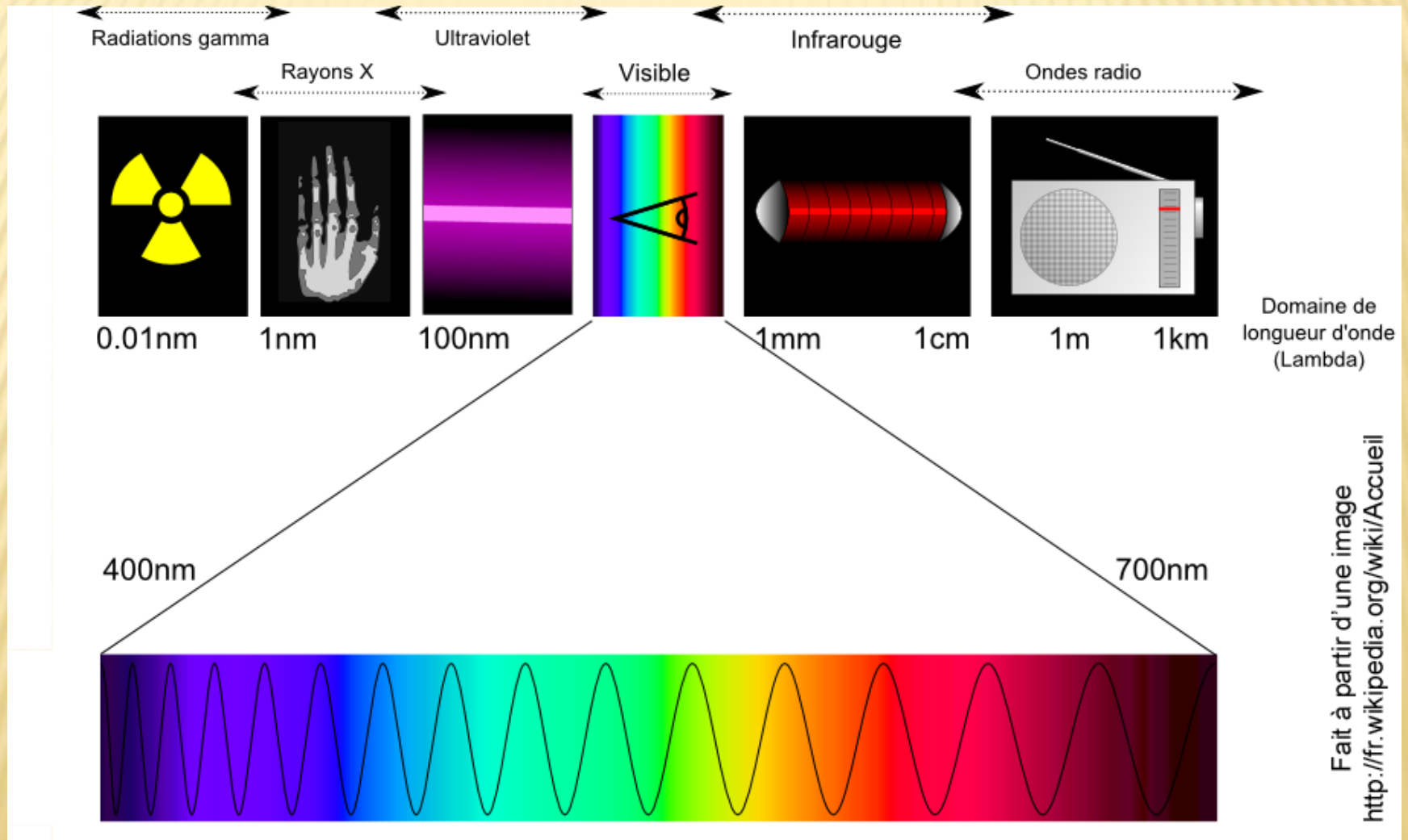


MICROSCOPIE OPTIQUE THEORIQUE ET APPLIQUEE

AUX SCIENCES BIOMEDICALES

INTRODUCTION



Fait à partir d'une image
<http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>

Figure 1 : Spectre des ondes électromagnétiques

INTRODUCTION

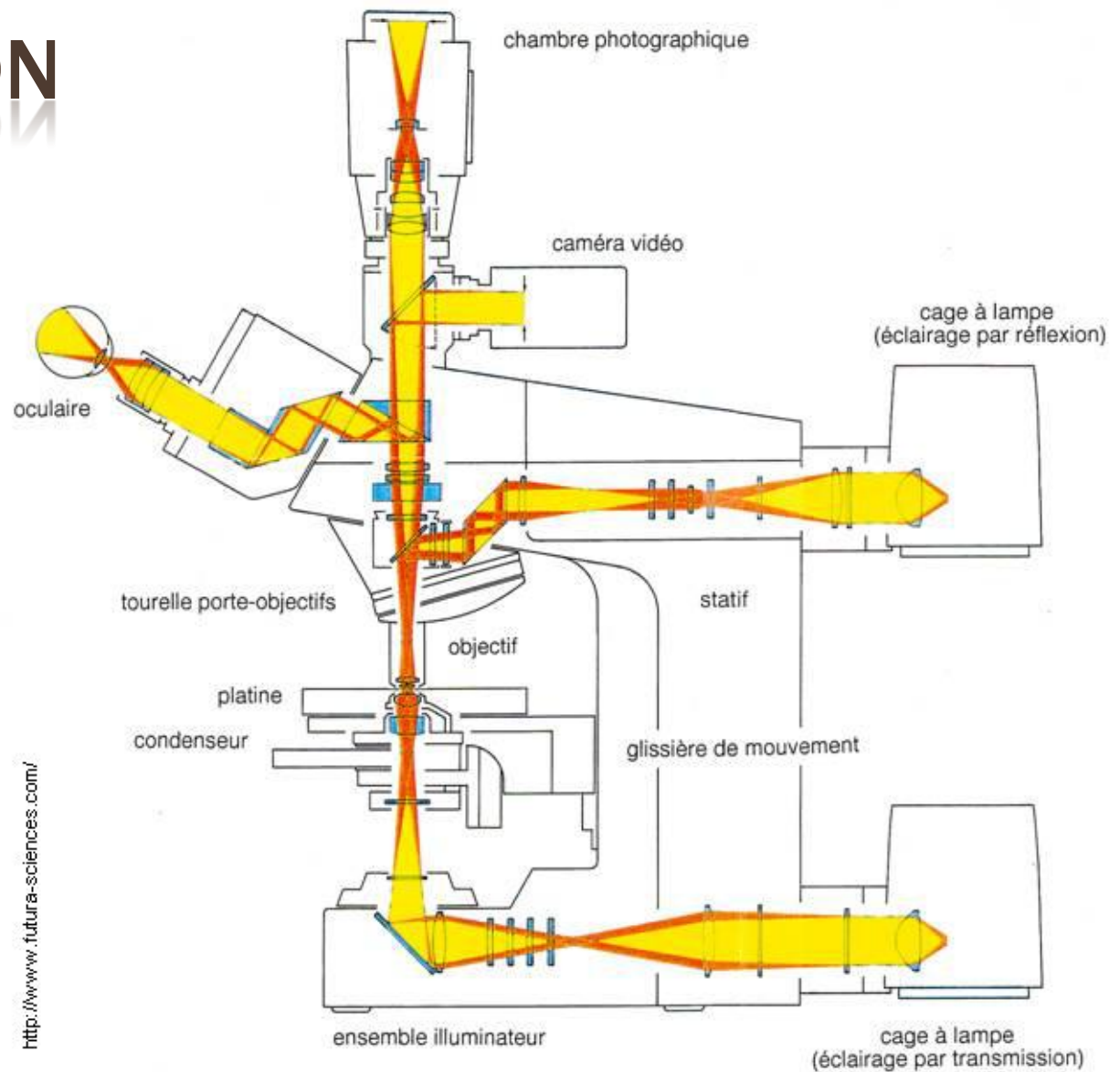


Figure 2 : Microscope optique (droit)

INTRODUCTION

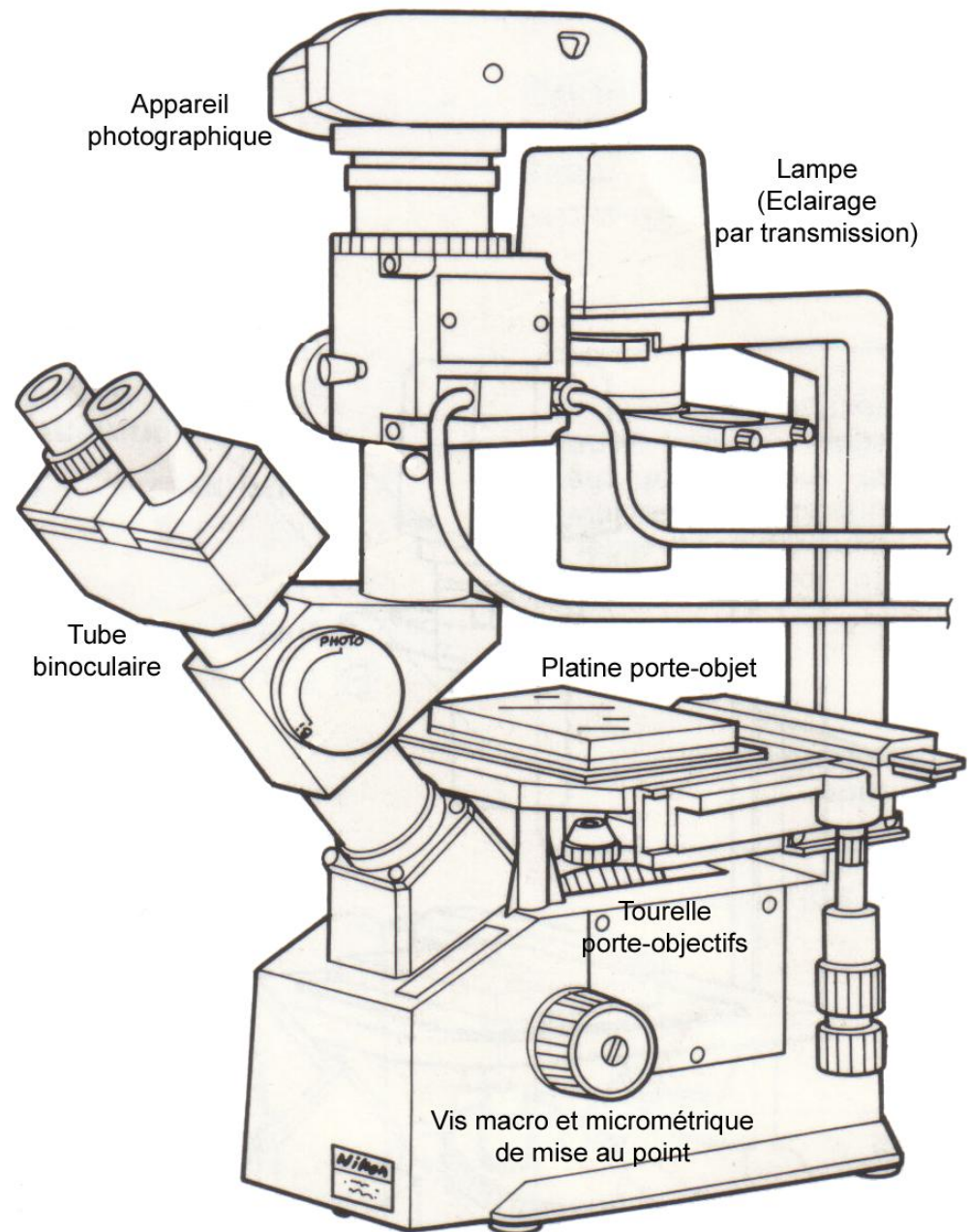


Figure 2 : Microscope optique (droit)

LA MICROSCOPIE OPTIQUE (PHOTONIQUE) À FOND CLAIR

Principe du microscope optique composé

Principaux éléments du microscope à fond clair

La partie mécanique

Les parties optiques

PRINCIPE DU MICROSCOPE OPTIQUE COMPOSÉ

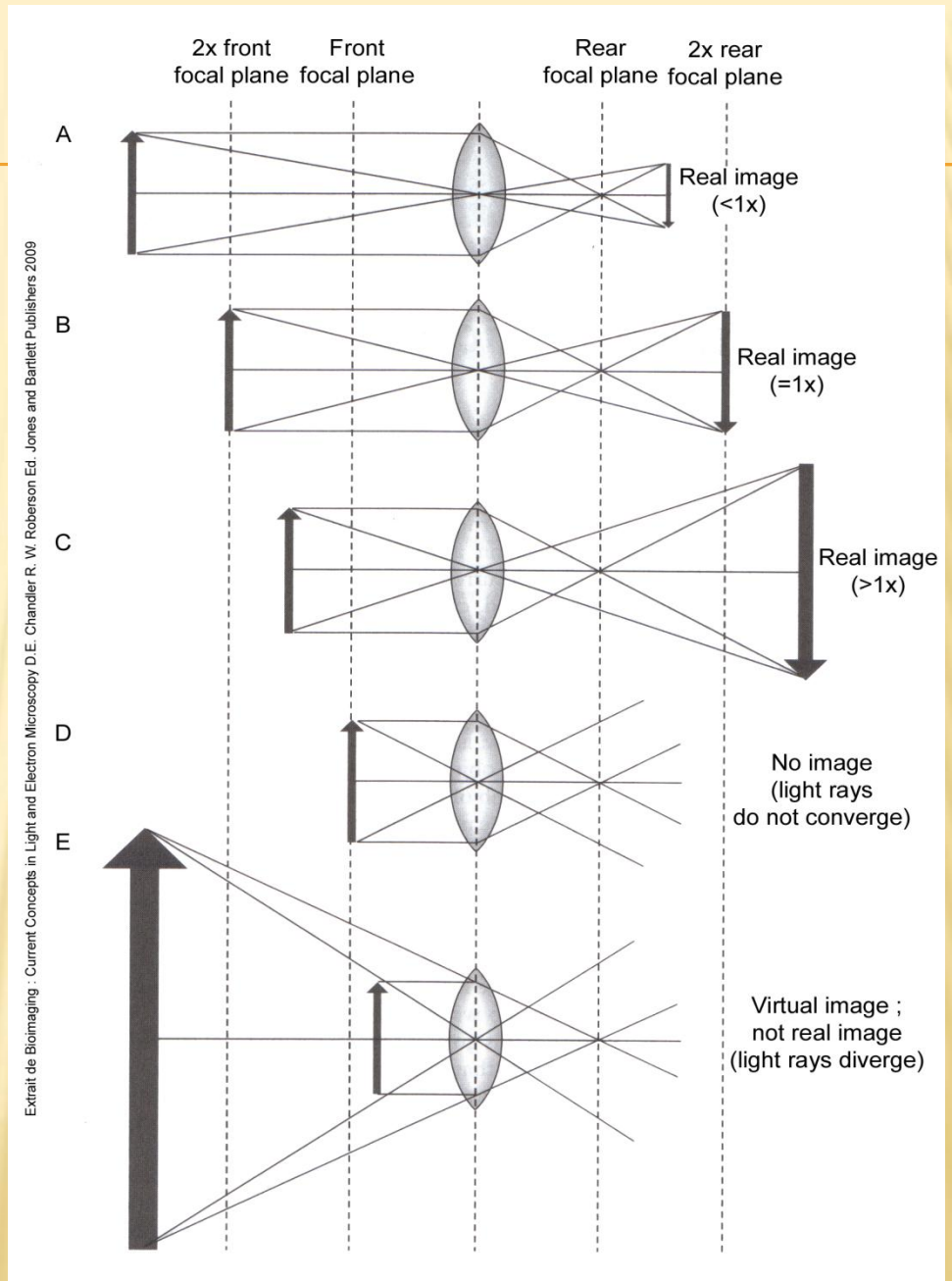


Figure 4 : Lentille convergente et formation d'image

PRINCIPE DU MICROSCOPE OPTIQUE COMPOSÉ

D'après Bioimaging : current Concepts in Light and Electron Microscopy
D. E. Chandler R. W. Roberson Ed Jones and Bartlett Publishers 2009

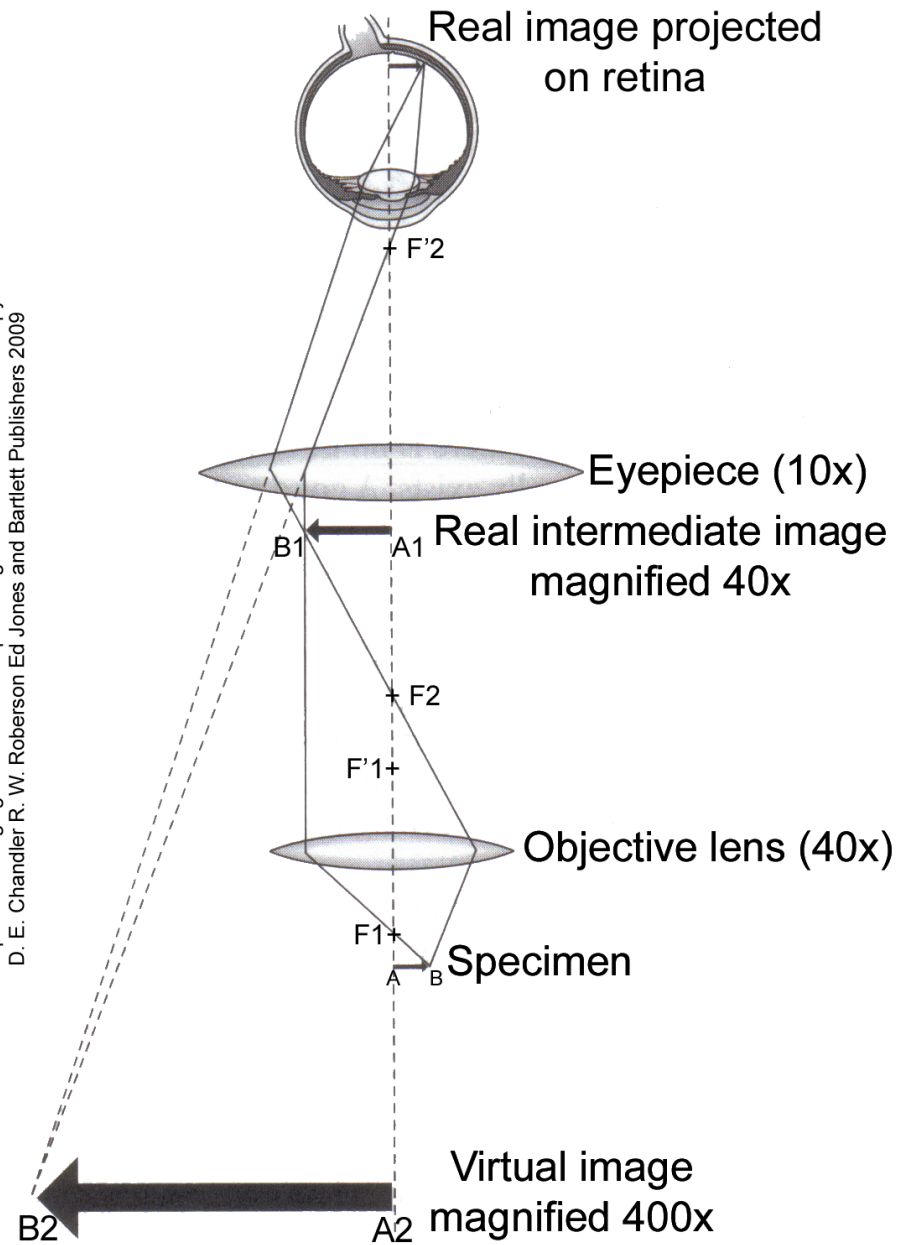


Figure 5 : Principe simplifié de formation de l'image avec un microscope optique

PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DU MICROSCOPE À FOND CLAIR

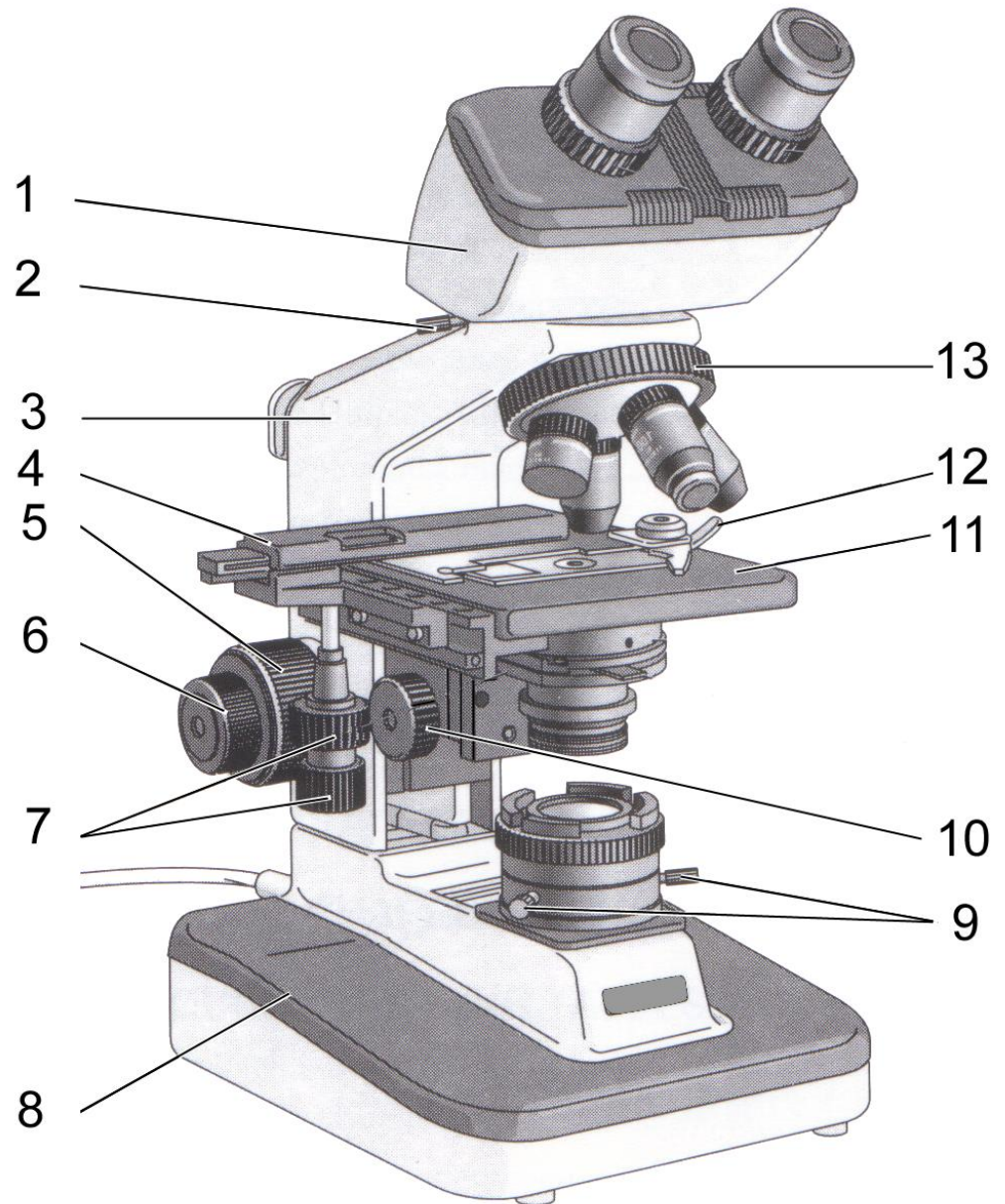


Figure 6 : éléments de la partie mécanique du microscope à fond clair

PRINCIPAUX ÉLÉMENTS DU MICROSCOPE À FOND CLAIR

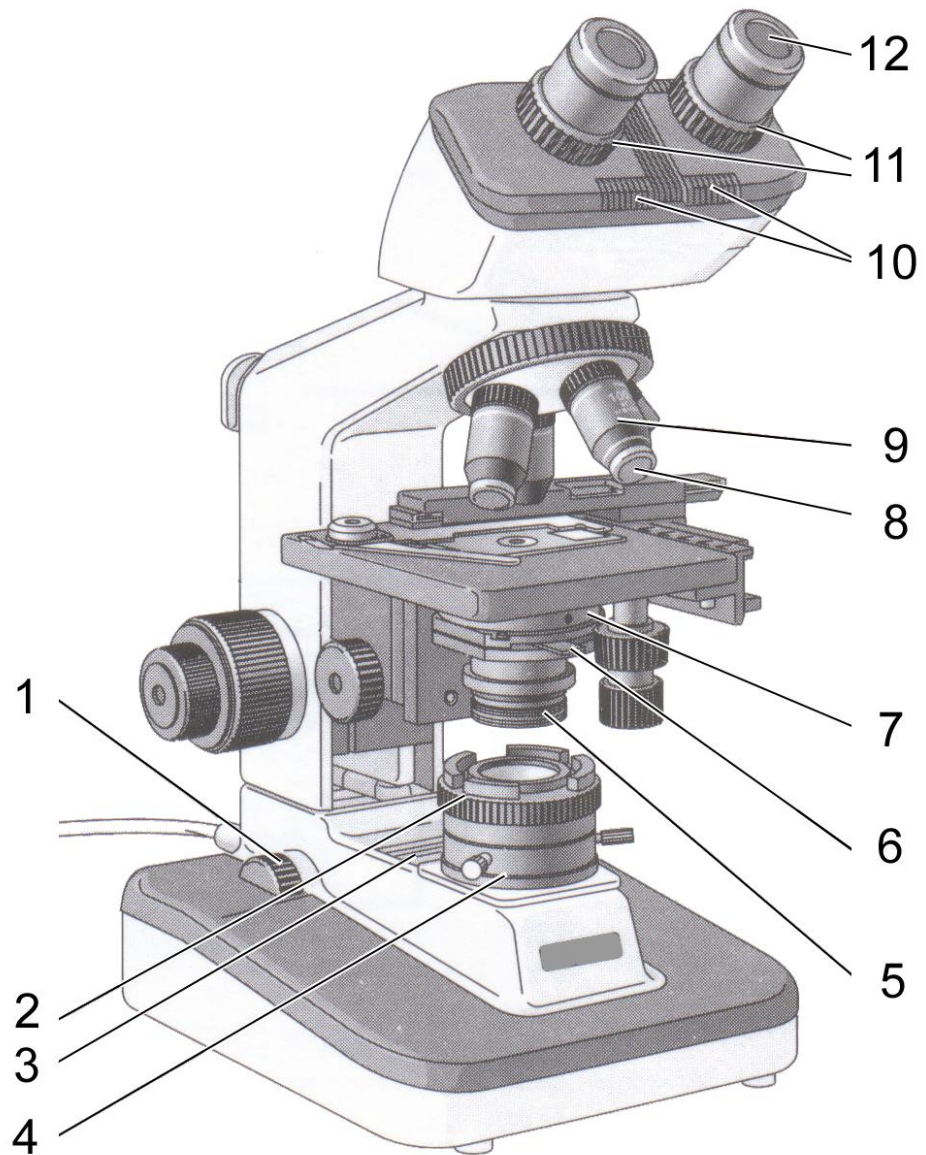


Figure 7 : éléments des parties optiques du microscope à fond clair

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique géométrique

- Trajet des rayons d'éclairage

- Trajet des rayons de formation de l'image

Selon l'optique physique

- Quelques notions sur les ondes électromagnétiques visibles

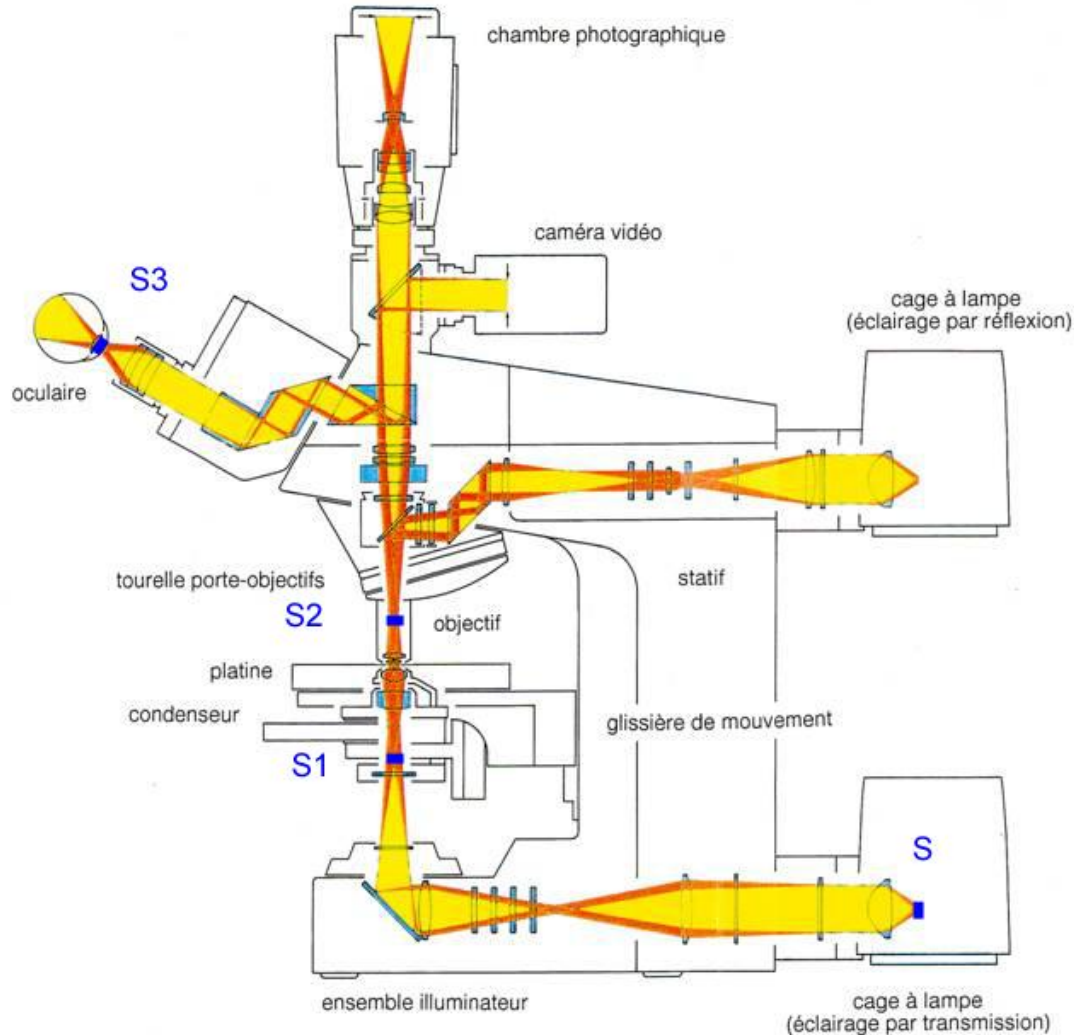
- Interférence

- Diffraction

- Théorie d'Abbe

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique géométrique



S3
Troisième image
de la source
dans le cristallin

S2
Deuxième image
de la source
dans le plan focal
arrière de l'objectif

S1
Première image
de la source
dans le plan focal
du condenseur

S
Source

Chaque point de la source éclaire
l'ensemble de la préparation
et du cristallin (fond clair)

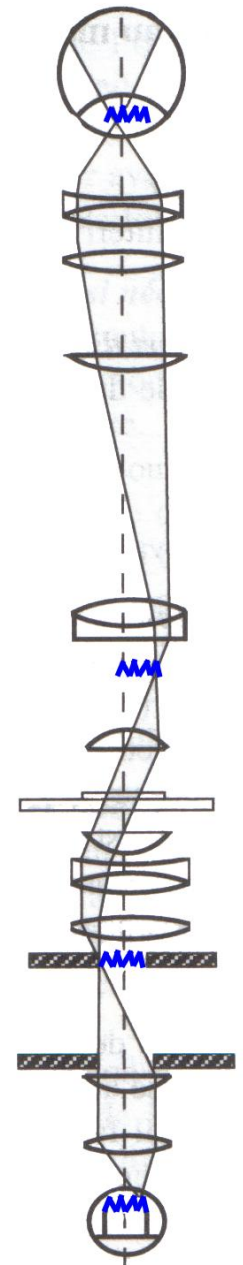
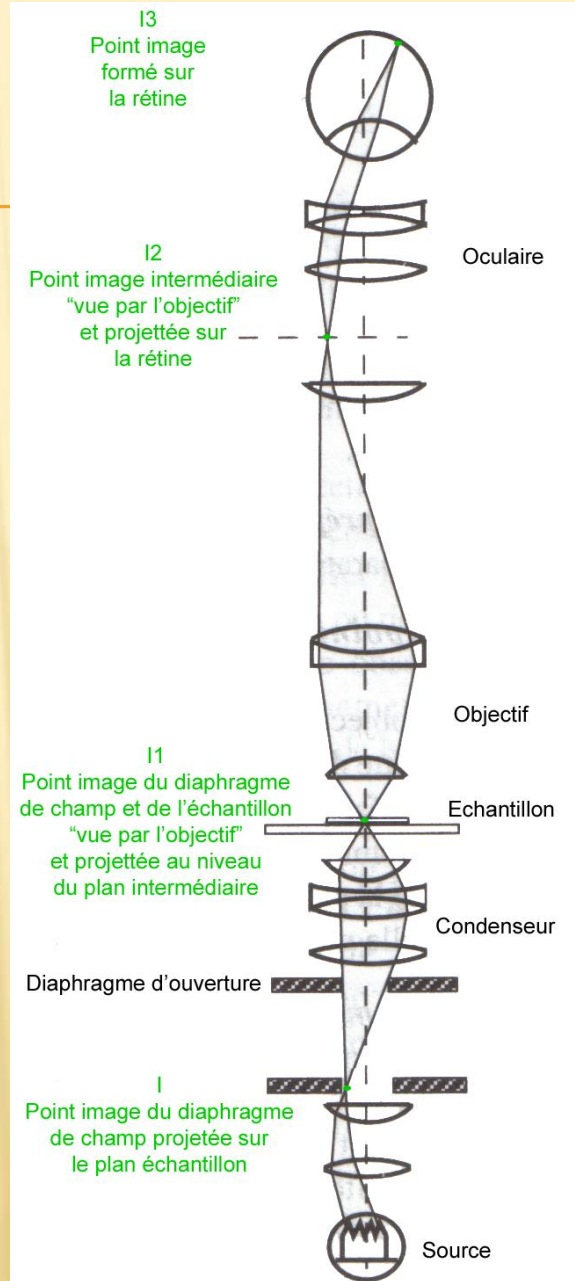
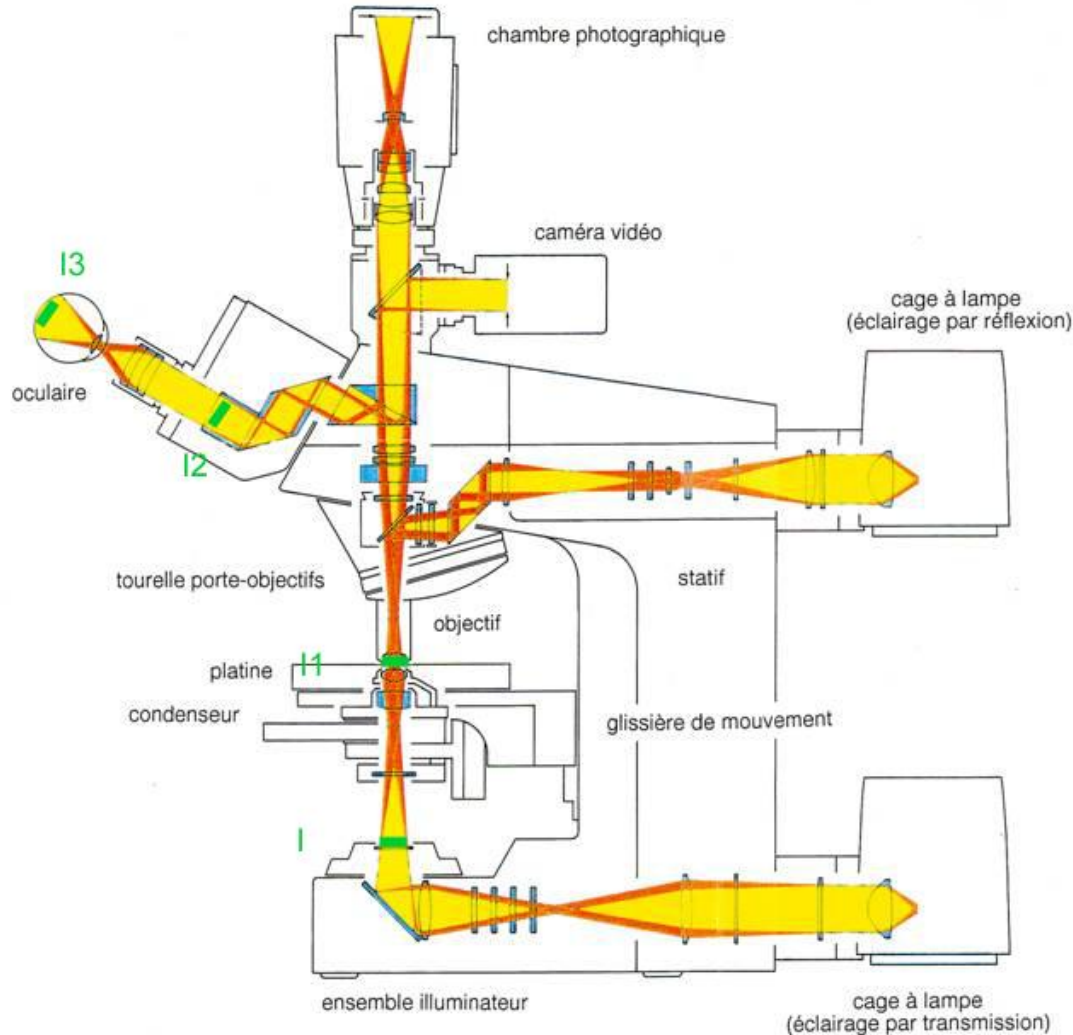


Figure 8 et 8 bis : Trajet des rayons d'éclairage du microscope à fond clair

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique géométrique



Chaque point de l'objet est éclairé par l'ensemble de la source et conduit à un point dans l'image intermédiaire et sur la rétine

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique physique

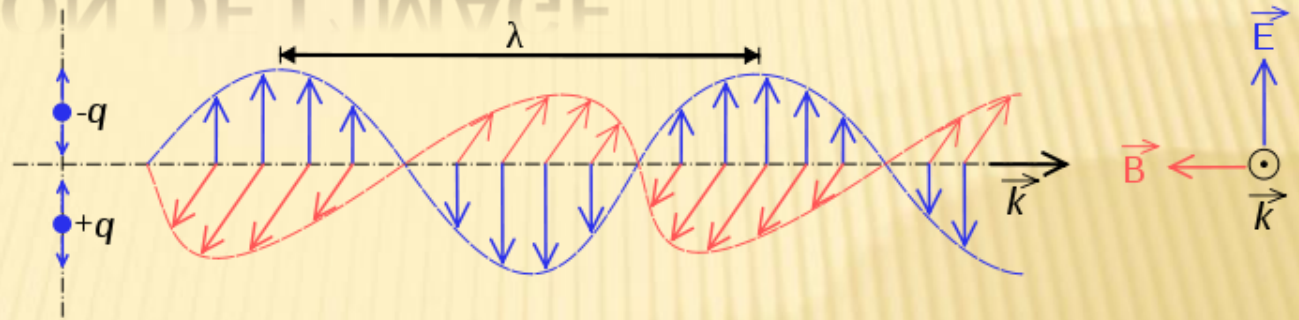


Figure 10 : onde électromagnétique (oscillation couplée du champ électrique et du champ magnétique)

Interférence

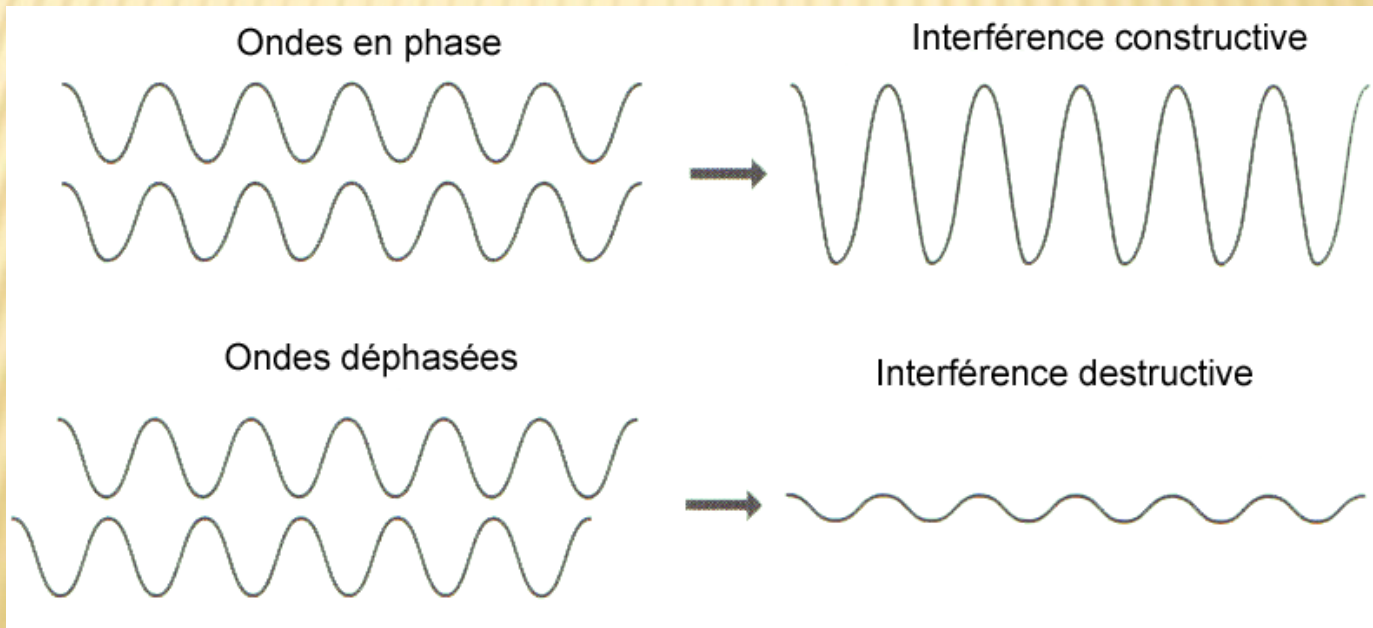


Figure 11 : Principe de l'interférence entre ondes électromagnétiques

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique physique

Théorie simplifiée de la diffraction

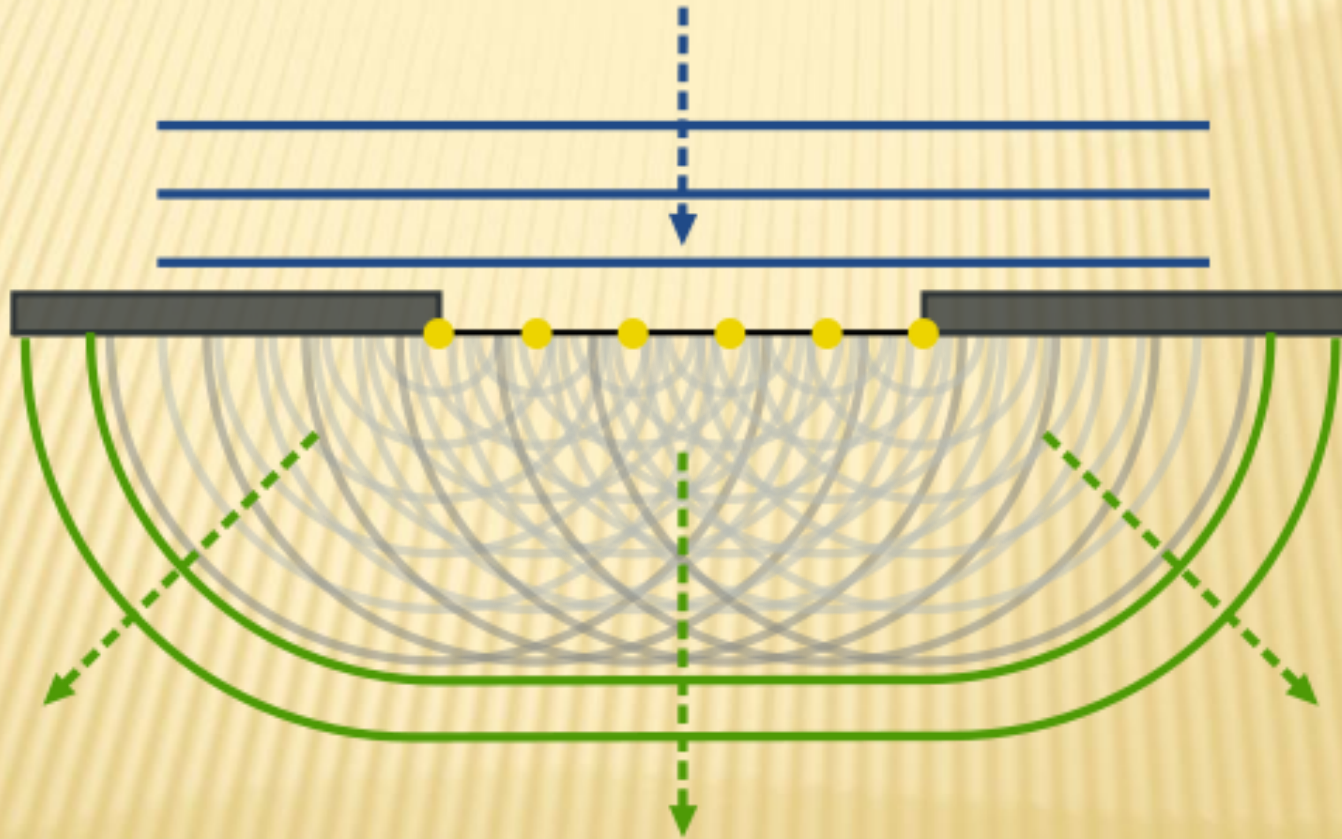


Figure 12 : Principe de la diffraction

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique physique

Théorie simplifiée de la diffraction

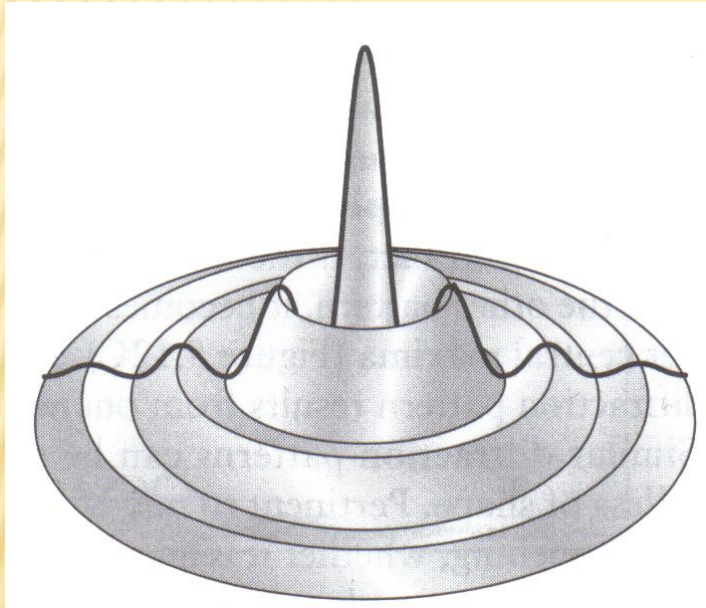


Figure 13 et 13 bis : Représentations de la figure de Diffraction obtenue par un trou

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique physique

Théorie simplifiée de la diffraction

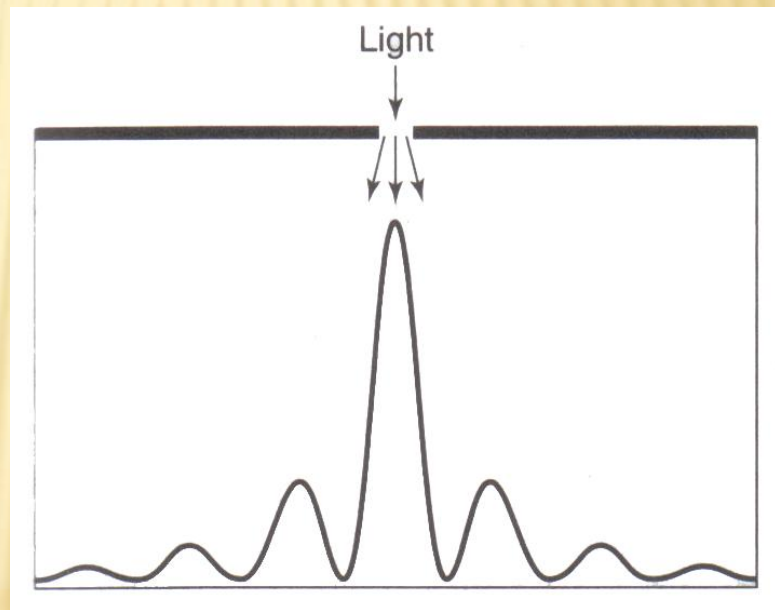
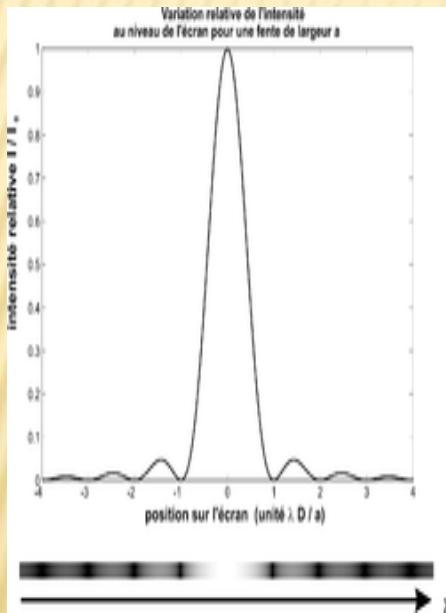


Figure 14 et 14 bis : Représentations de la figure de diffraction obtenue par une fente

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique physique

Théorie simplifiée de la diffraction

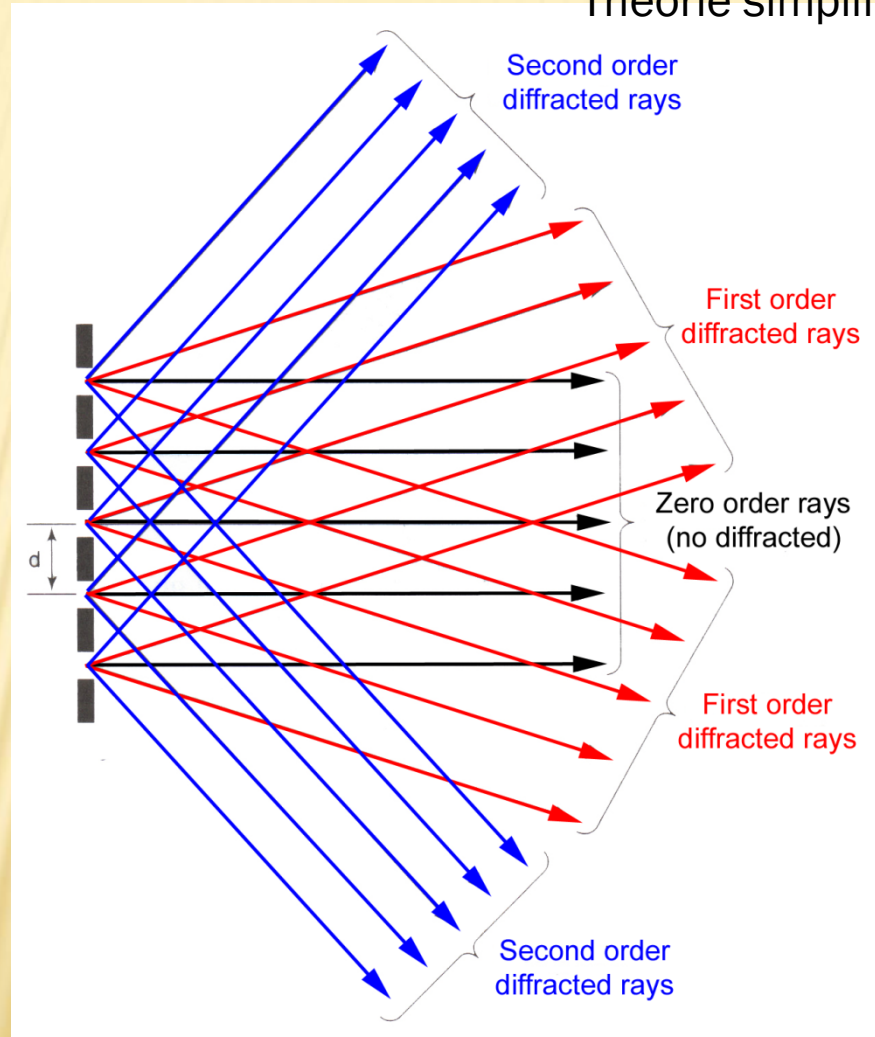


Figure 15 : Angles de diffusion et maximum de 1er et 2nd ordre obtenus par une série de fentes

LA FORMATION DE L'IMAGE

Selon l'optique physique

Théorie d'Abbe

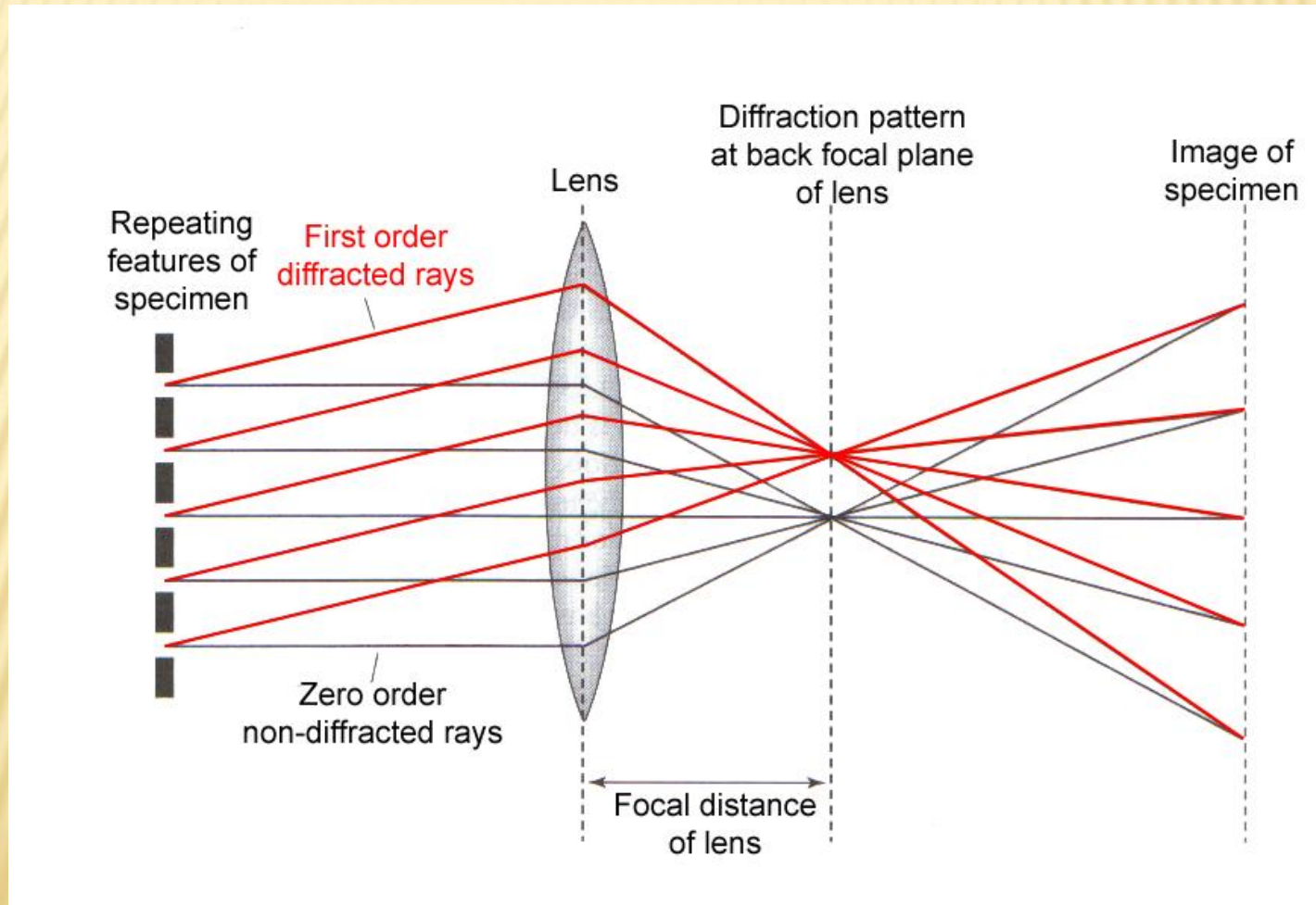


Figure 15 : Angles de diffusion et maximum de 1er et 2nd ordre obtenus par une série de fentes

CONNAÎTRE ET UTILISER LES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS DU MICROSCOPE OPTIQUE

Les objectifs

- Limite de séparation et pouvoir séparateur

- Ouverture numérique

- Aberrations

- Autres caractéristiques

- Objectifs corrigés à l'infini

Le condenseur du microscope photonique à fond clair

Les oculaires

- Principales caractéristiques

- Oculaire micrométriques et mesure au microscope

Collecteur et source de lumière

L'éclairage de Köhler et l'utilisation du microscope photonique à fond clair

LES OBJECTIFS

Limite de séparation et pouvoir séparateur

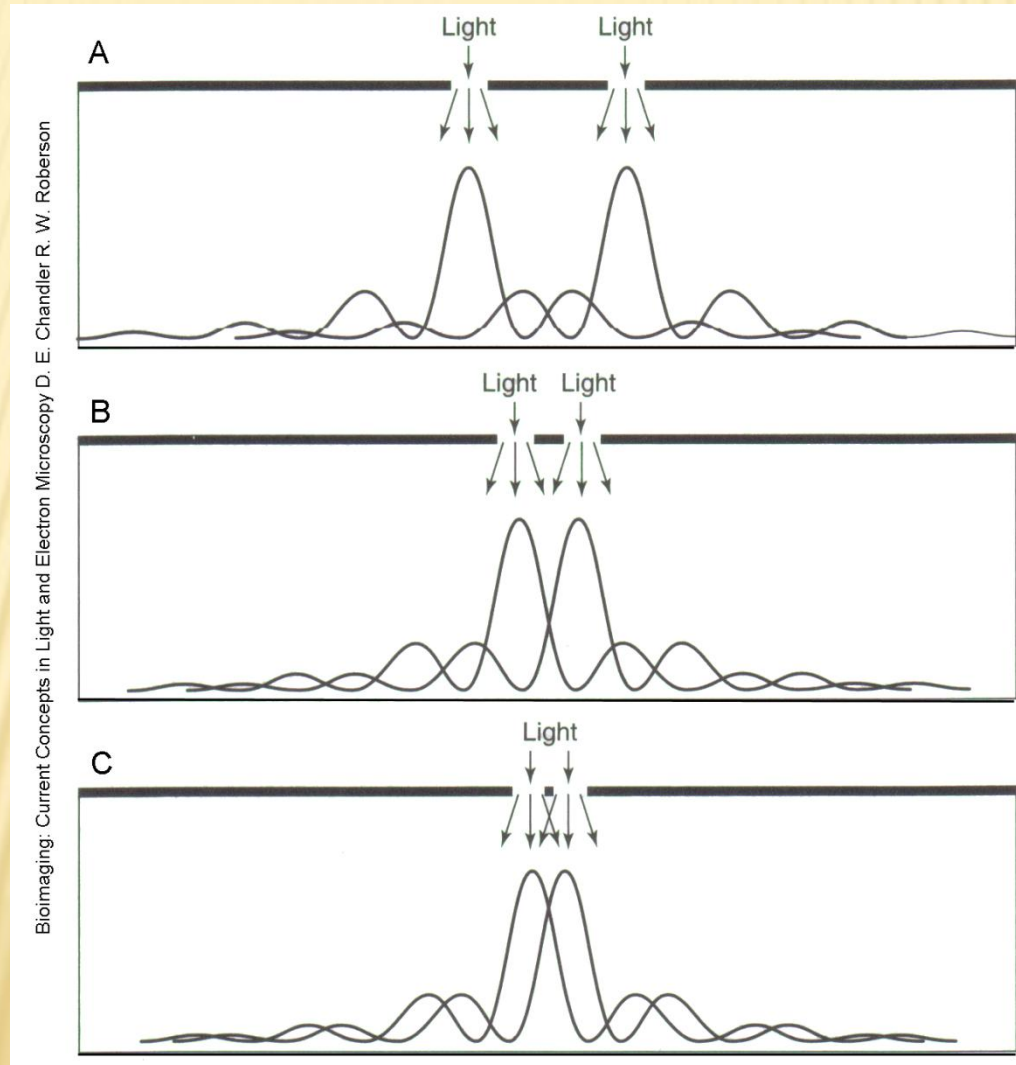


Figure 17 : Limite de résolution et figures de diffraction de deux fentes proches

LES OBJECTIFS

Limite de séparation et pouvoir séparateur

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

160 : longueur du tube (mm)

0,17 : épaisseur du couvre objet

40 : grandissement

0,70 : ouverture numérique

$$ON = n \sin \alpha$$

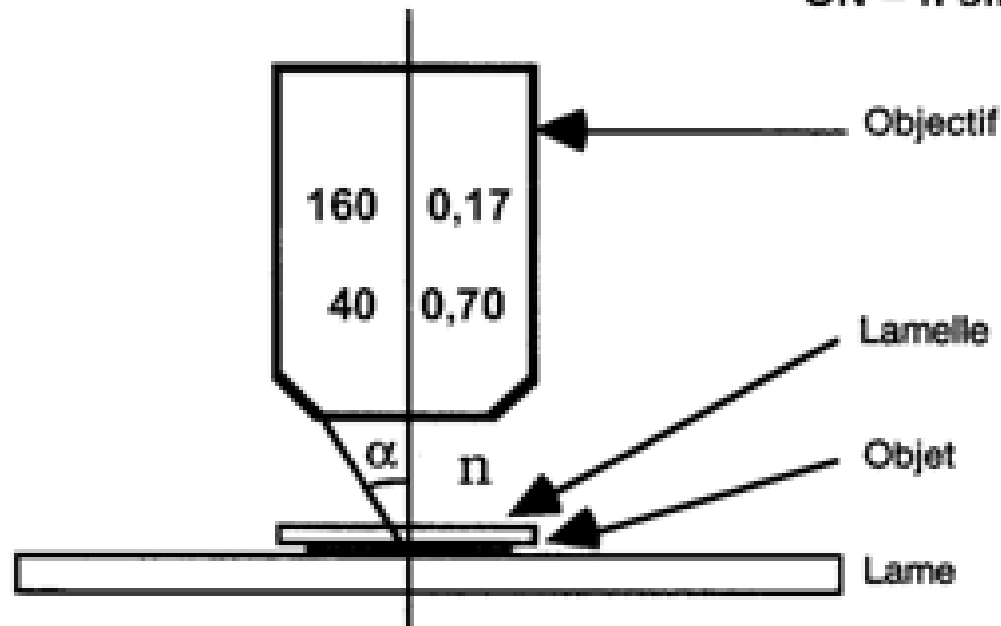


Figure 18 : Angle α et Ouverture Numérique

LES OBJECTIFS

Ouverture numérique

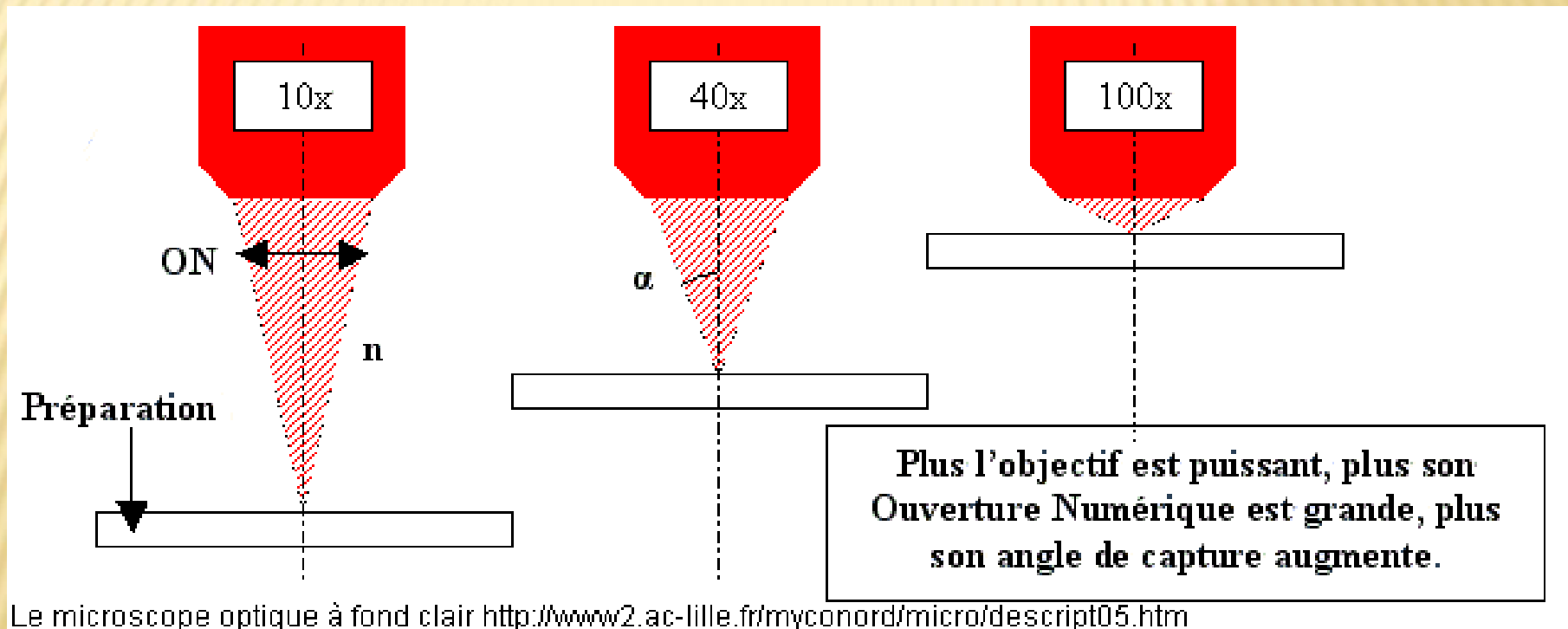


Figure 19 : Ouverture numérique et rayons diffractés captés par l'objectif

LES OBJECTIFS

Ouverture numérique

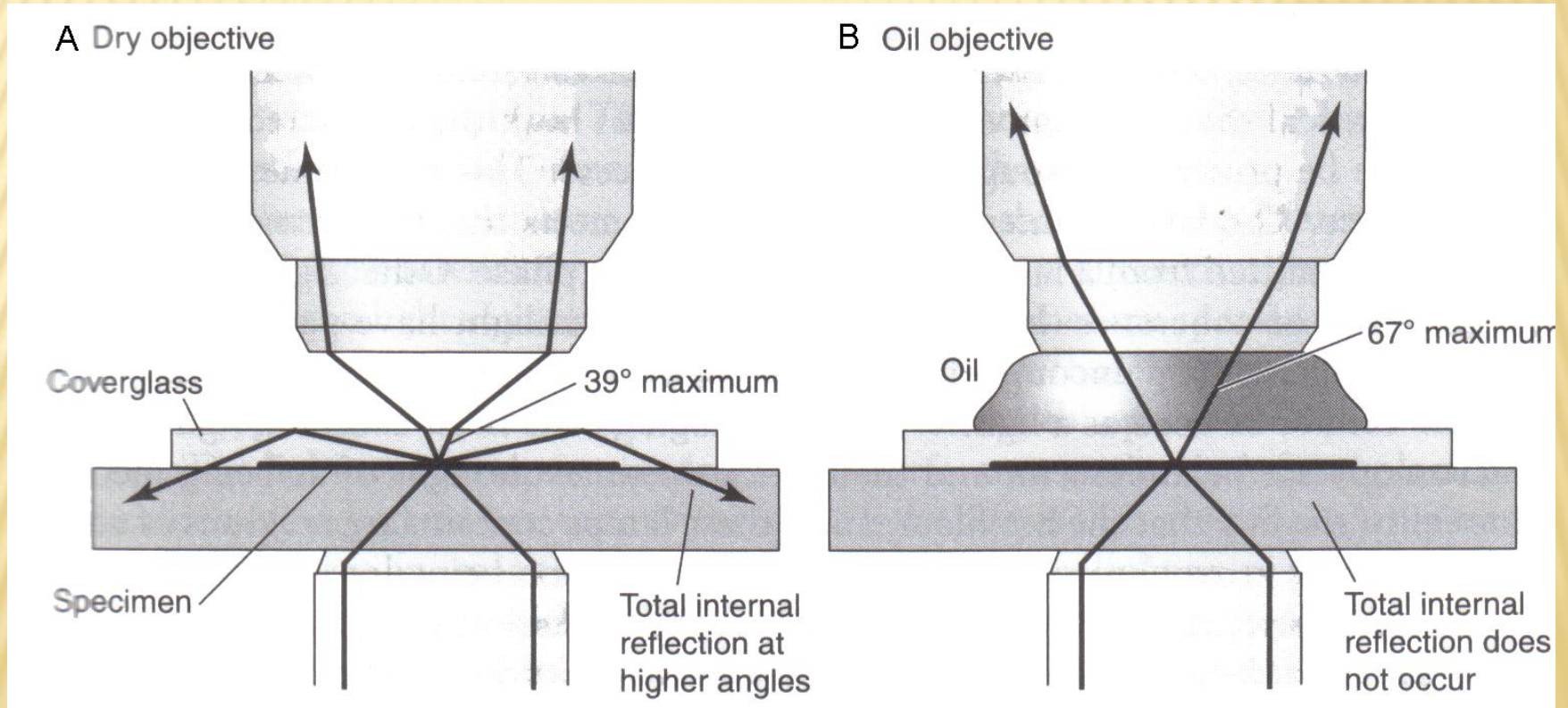


Figure 20 : Objectif à sec et objectif à immersion

LES OBJECTIFS

Aberrations chromatiques et sphériques

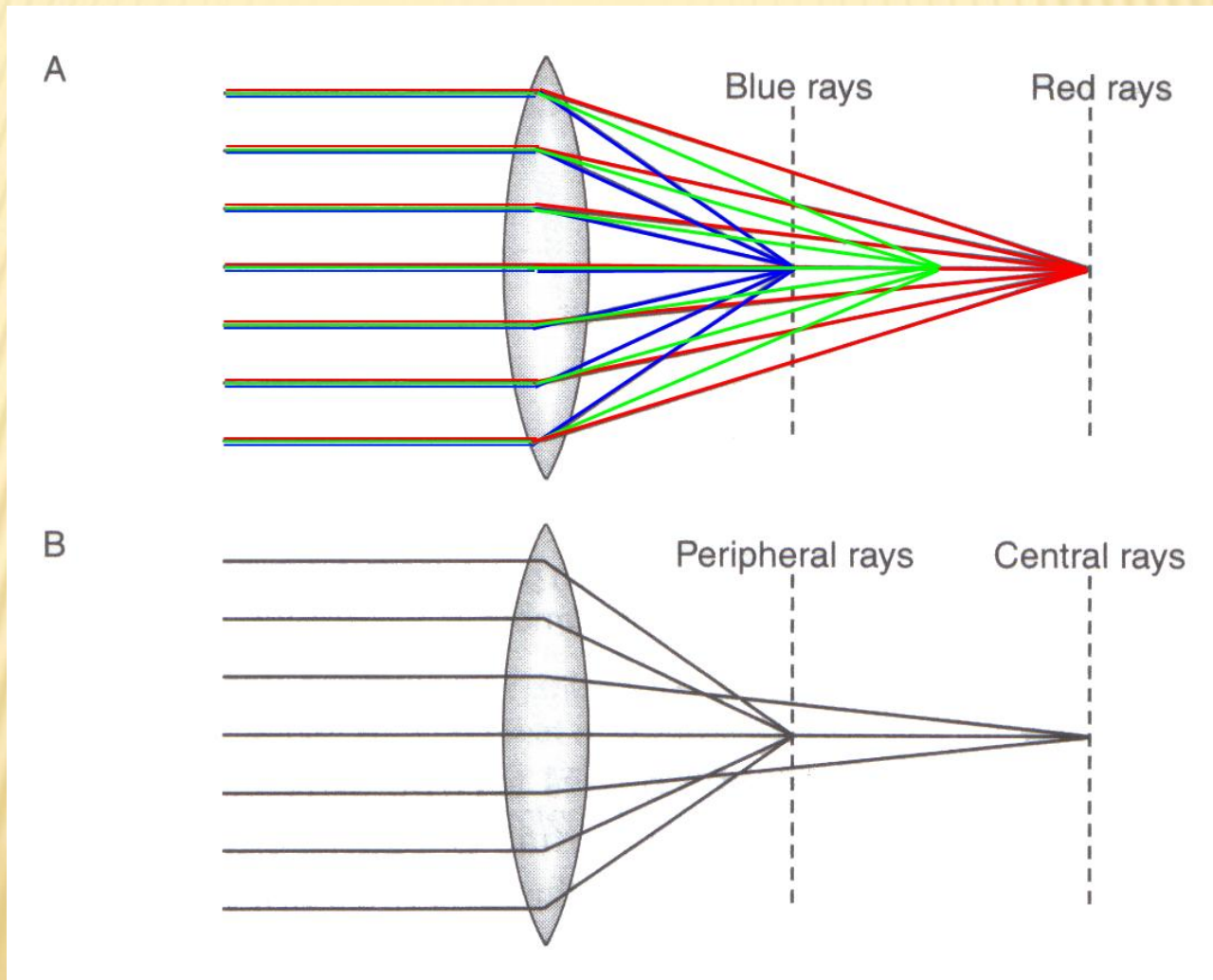


Figure 21 : lentilles et aberrations courantes

LES OBJECTIFS

Aberrations de planéité

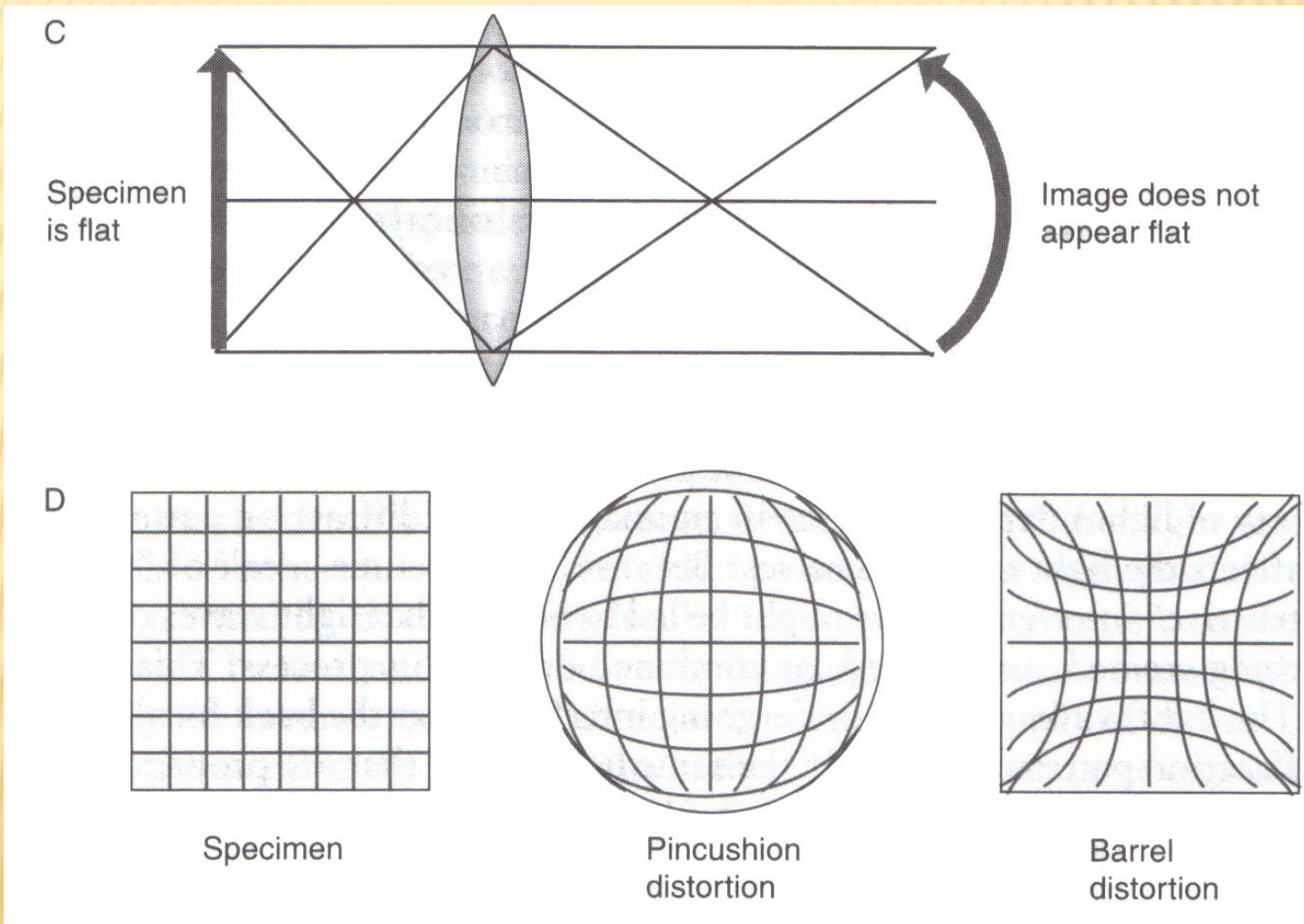


Figure 21 : lentilles et aberrations courantes

LES OBJECTIFS

Autres caractéristiques

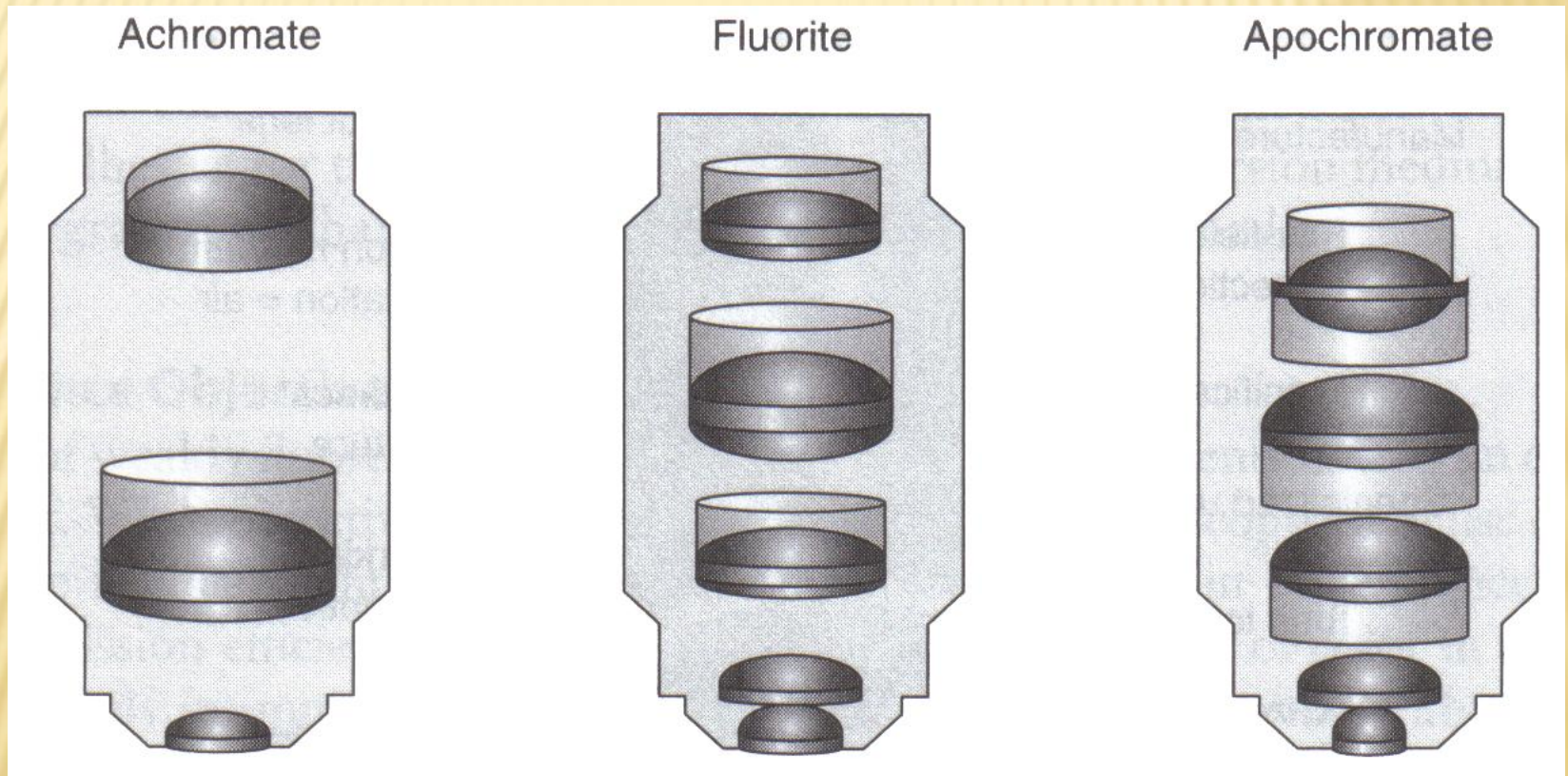


Figure 22 : Schéma de Construction optique de différents objectifs

LES OBJECTIFS

Autres caractéristiques

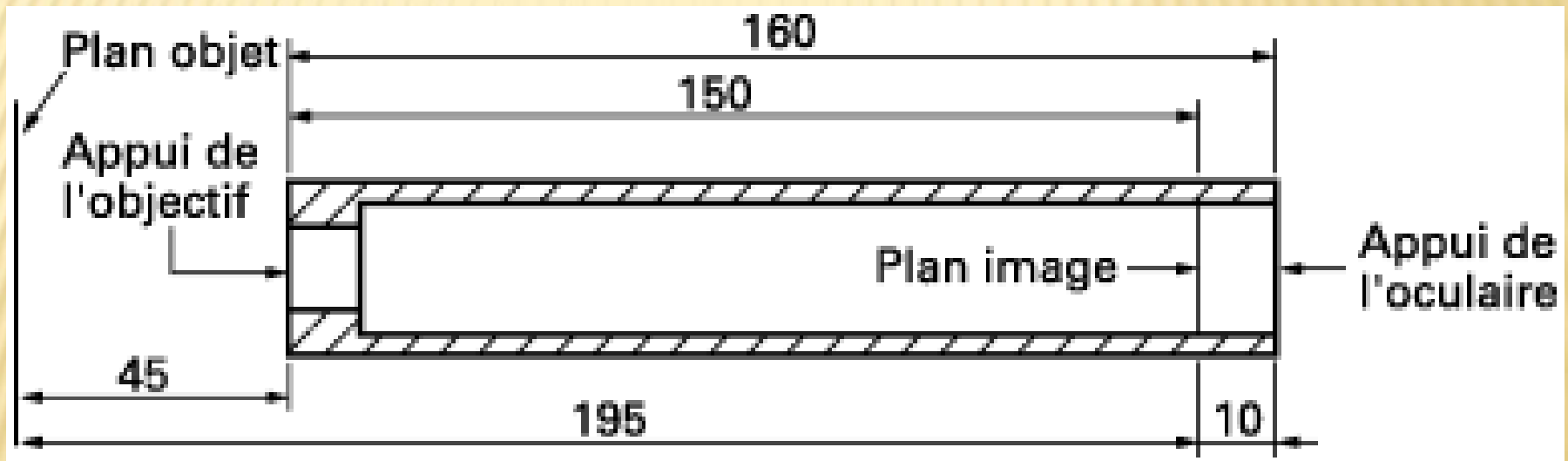


Figure 23 : Principales distances normalisées (en mm)

LES OBJECTIFS

Autres caractéristiques

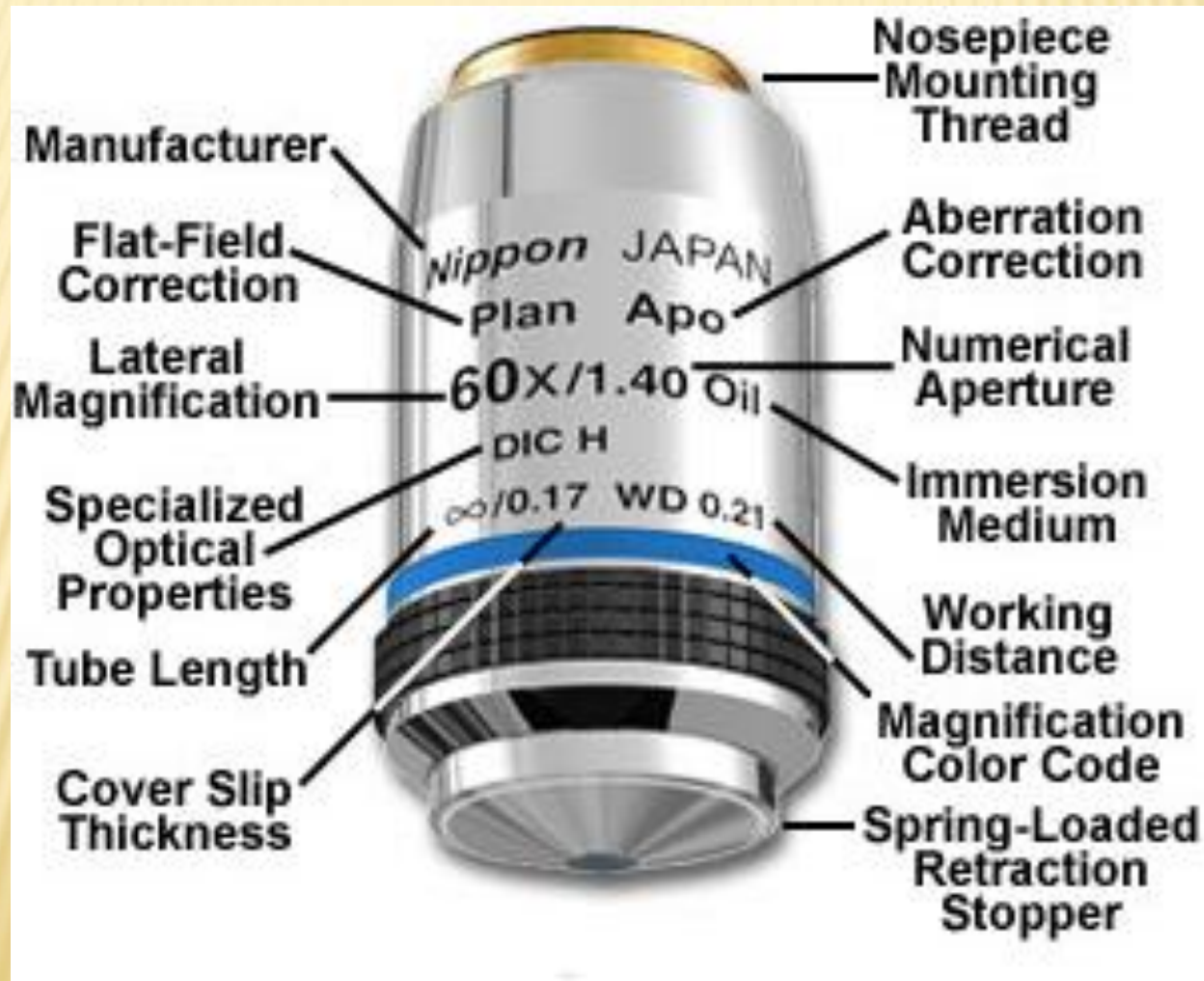


Figure 24 : Exemple d'indications fournies sur un Objectif

LES OBJECTIFS

Objectifs corrigés à l'infini

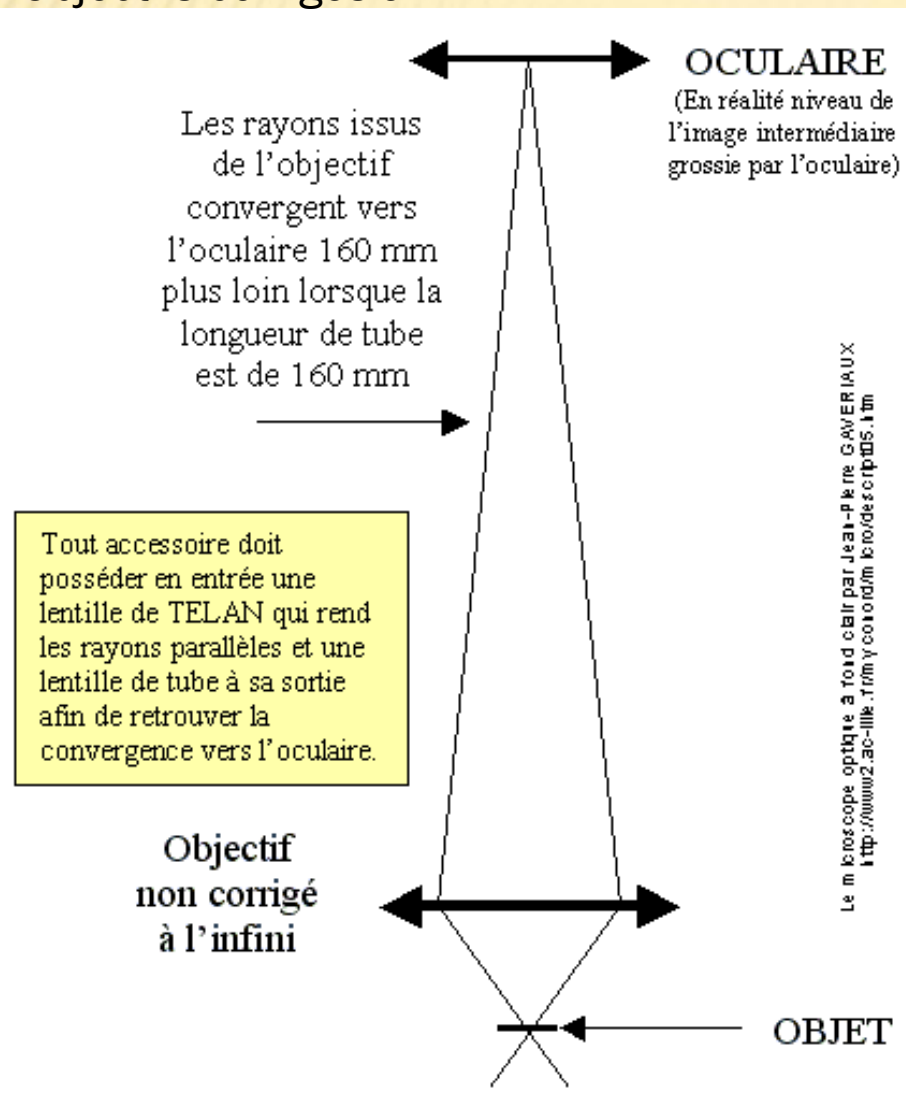


Figure 37 : Tube optique "classique"

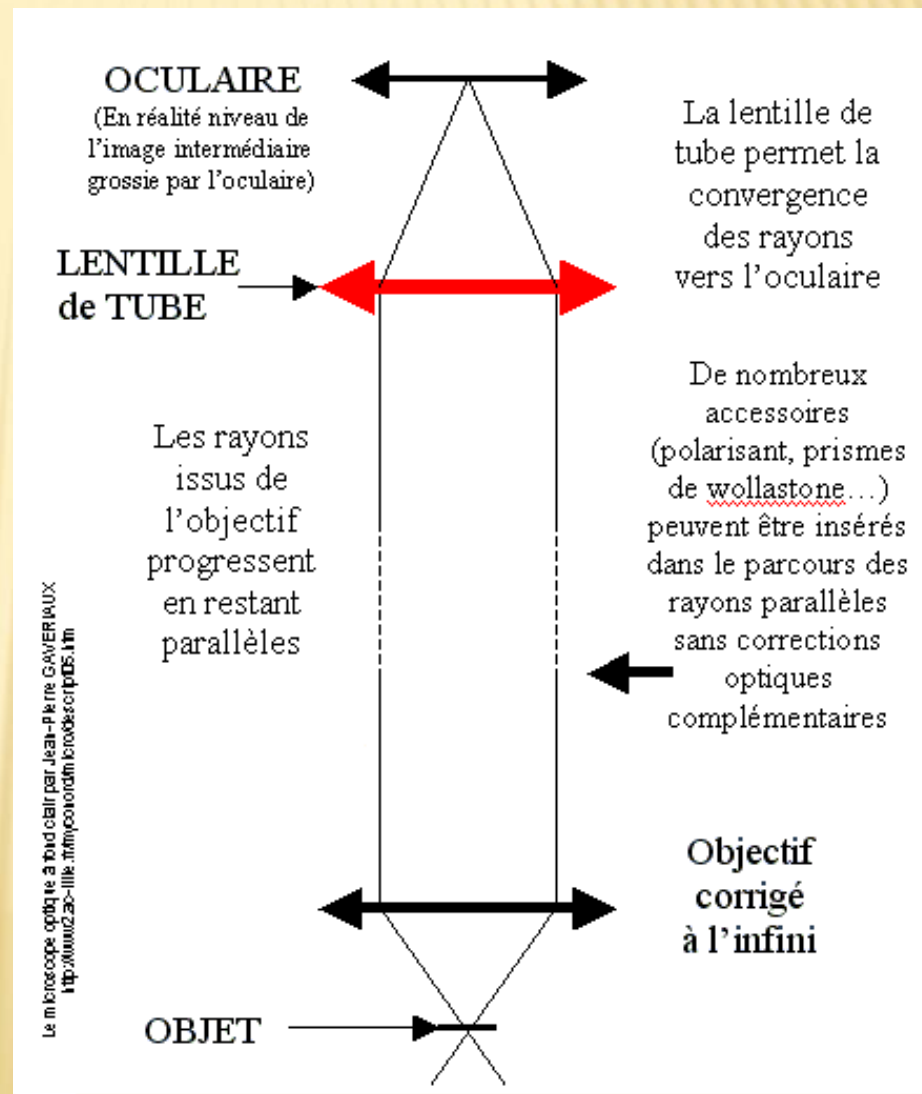


Figure 38 : tube optique "infini"

LE CONDENSEUR DU MICROSCOPE PHOTONIQUE À FOND CLAIR

Bioimaging : Current Concepts in Light and Electron Microscopy
D. E. Chandler R. W. Roberson

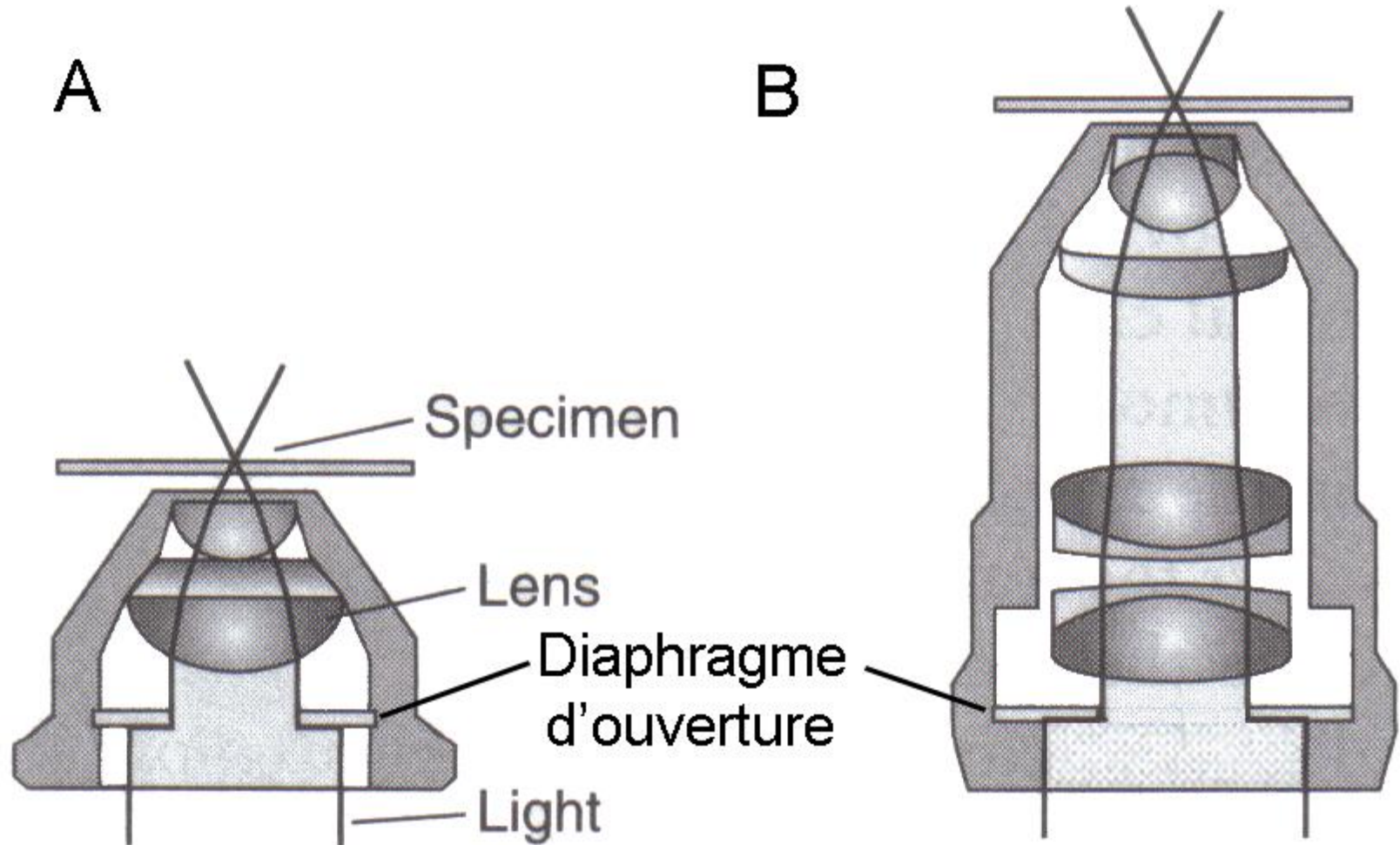


Figure 25 : (A) condenseur achromatique ; (B) condenseur à grande O.N.

LE CONDENSEUR DU MICROSCOPE PHOTONIQUE À FOND CLAIR



Figure 26 : Condenseur à lentille escamotable O.N. 0,16 - 0,9

LE CONDENSEUR DU MICROSCOPE PHOTONIQUE À FOND CLAIR

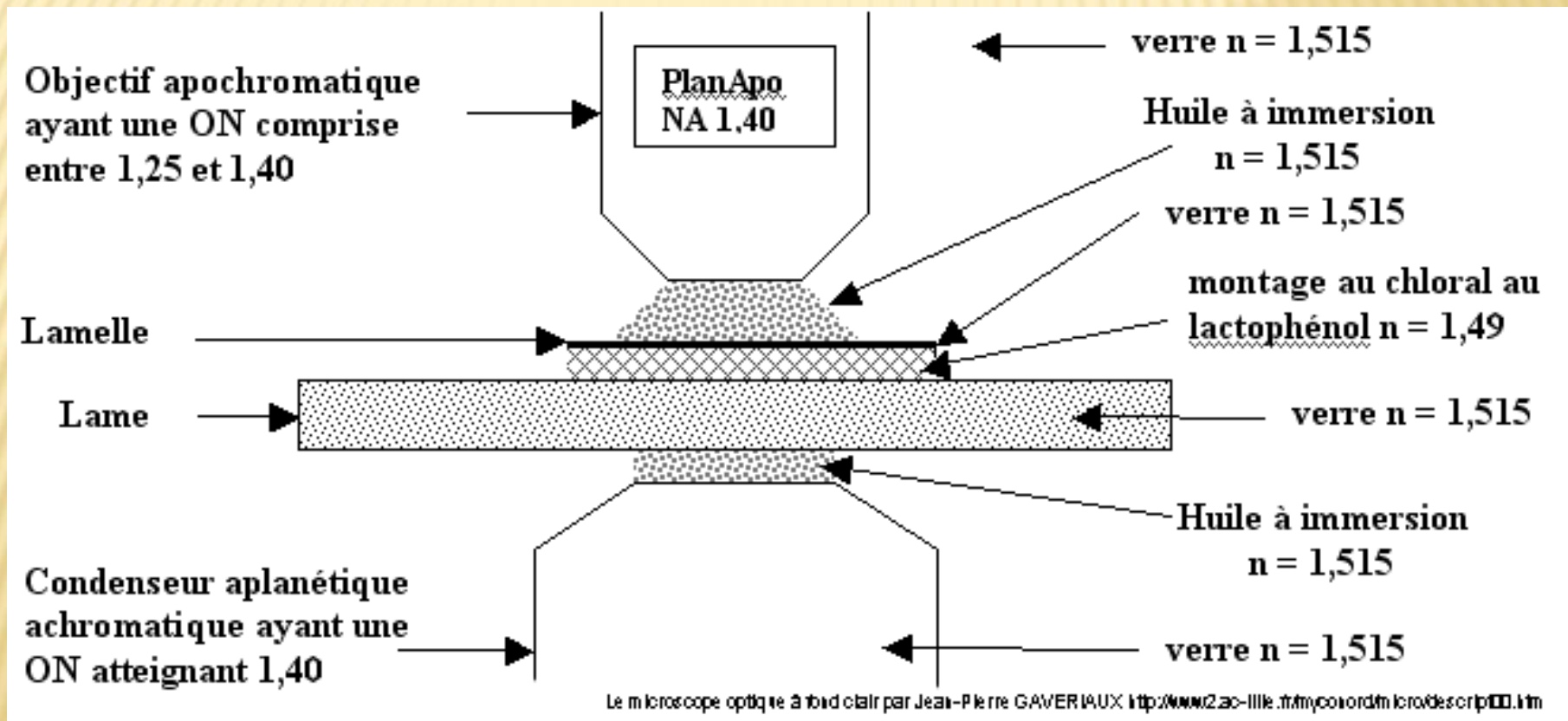


Figure 27 : Condenseur aplanétique achromatique (montage en « milieu homogène »)

LES OCULAIRES

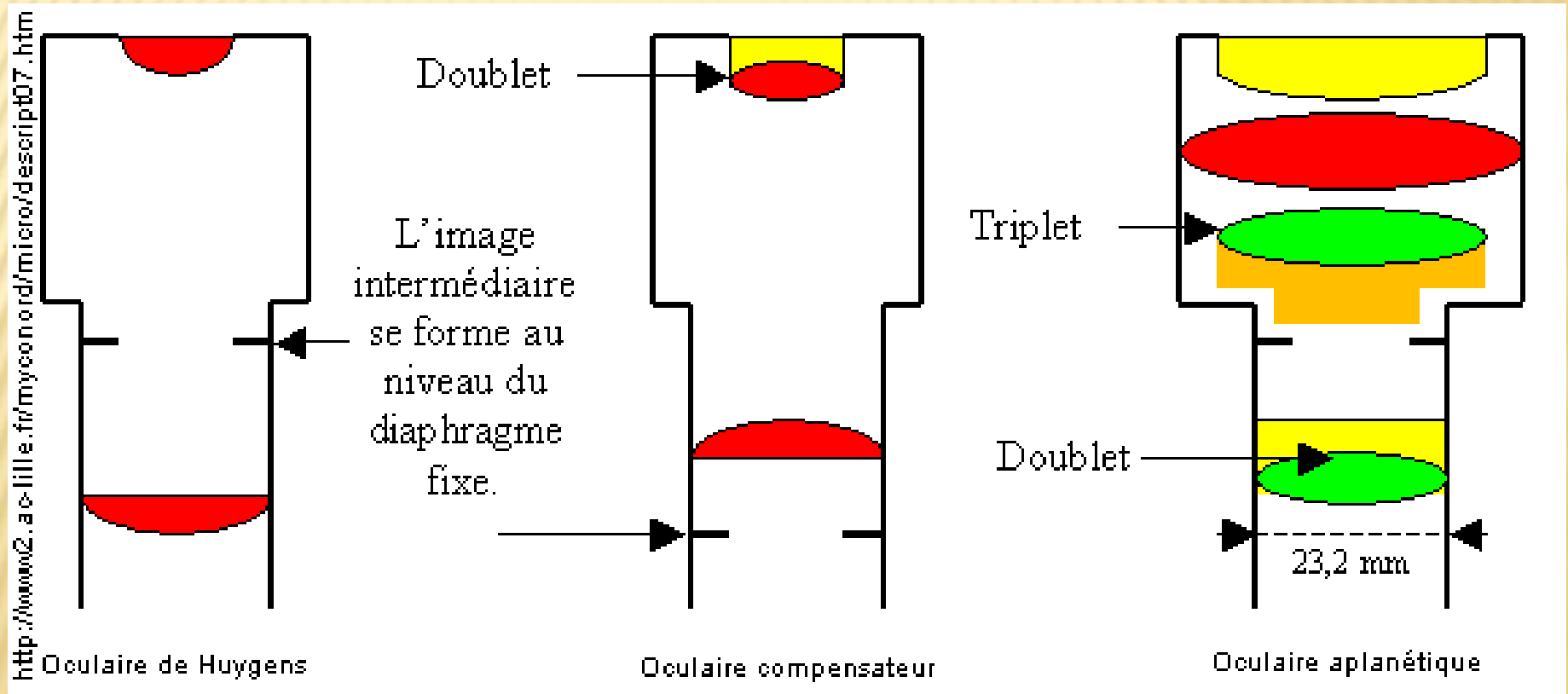
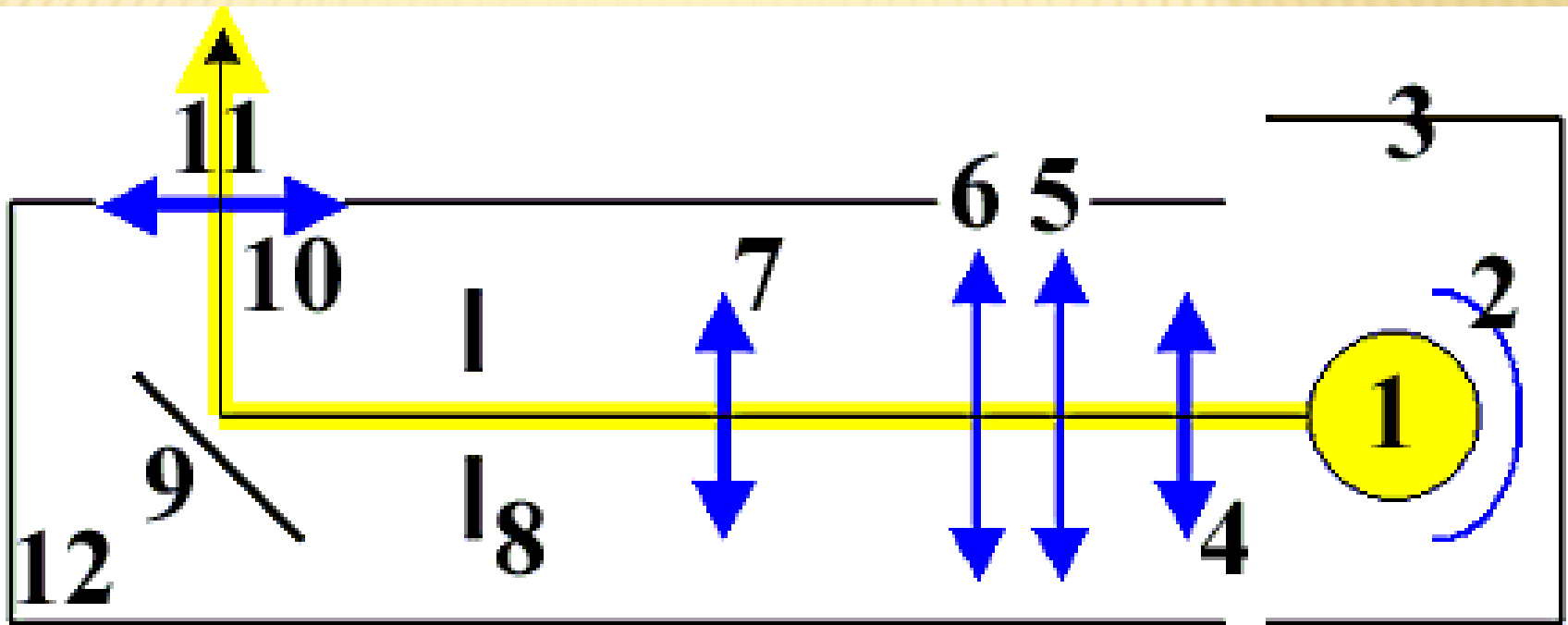


Figure 28 : Schéma de principe de différents oculaires

COLLECTEUR ET SOURCE DE LUMIÈRE



Le microscope optique à fond clair par Jean-Pierre GAVERIAUX <http://www.u2ac-illle.fr/mycorio/microdescript03.htm>

COLLECTEUR ET SOURCE DE LUMIÈRE

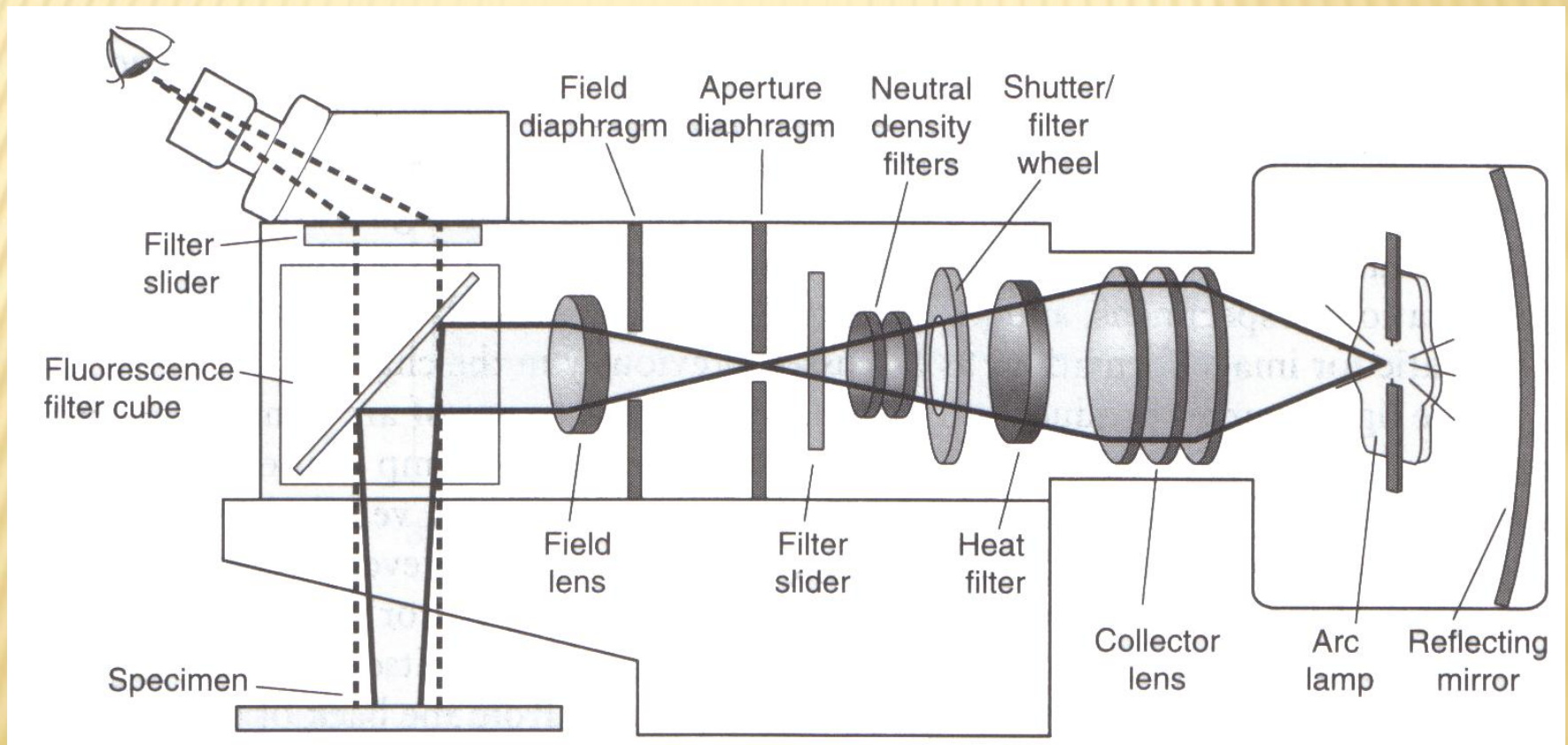


Figure 30 : Eclairage épiscopique (microscopie à fluorescence)

L'ÉCLAIRAGE DE KÖHLER

- ✖ 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

L'ÉCLAIRAGE DE KÖHLER

- ✗ Voir l'objet et non les défauts de l'éclairage
- ✗ Assurer une cohérence partielle entre l'éclairage et la limite de résolution
- ✗ Limiter la lumière parasite

UTILISATION DU MICROSCOPE PHOTONIQUE

À FOND CLAIR AVEC « ÉCLAIRAGE DE KÖHLER »

- ✗ Mettre au point avec l'objectif utilisé pour l'observation finale
- ✗ Régler la vision binoculaire (réglage inter pupillaire voir dioptrique)
- ✗ Centrer le diaphragme de champ
- ✗ Régler la hauteur du condenseur
- ✗ Régler l'ouverture du diaphragme de champ
- ✗ Centrer et régler la source (si possible et/ou nécessaire)
- ✗ Régler l'ouverture du diaphragme d'ouverture
- ✗ Régler la luminosité et affiner la mise au point

LES AUTRES TECHNIQUES MICROSCOPIQUES PHOTONIQUES *UTILISÉES EN SCIENCES BIOMÉDICALES*

La microscopie à fond noir

La microscopie en contraste de phase

La microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel (DIC)

La microscopie à fluorescence (classique)

La microscopie confocale (à balayage laser)

LA MICROSCOPIE À FOND NOIR

Principe

Eléments optiques
spécifiques

Domaine d'utilisation

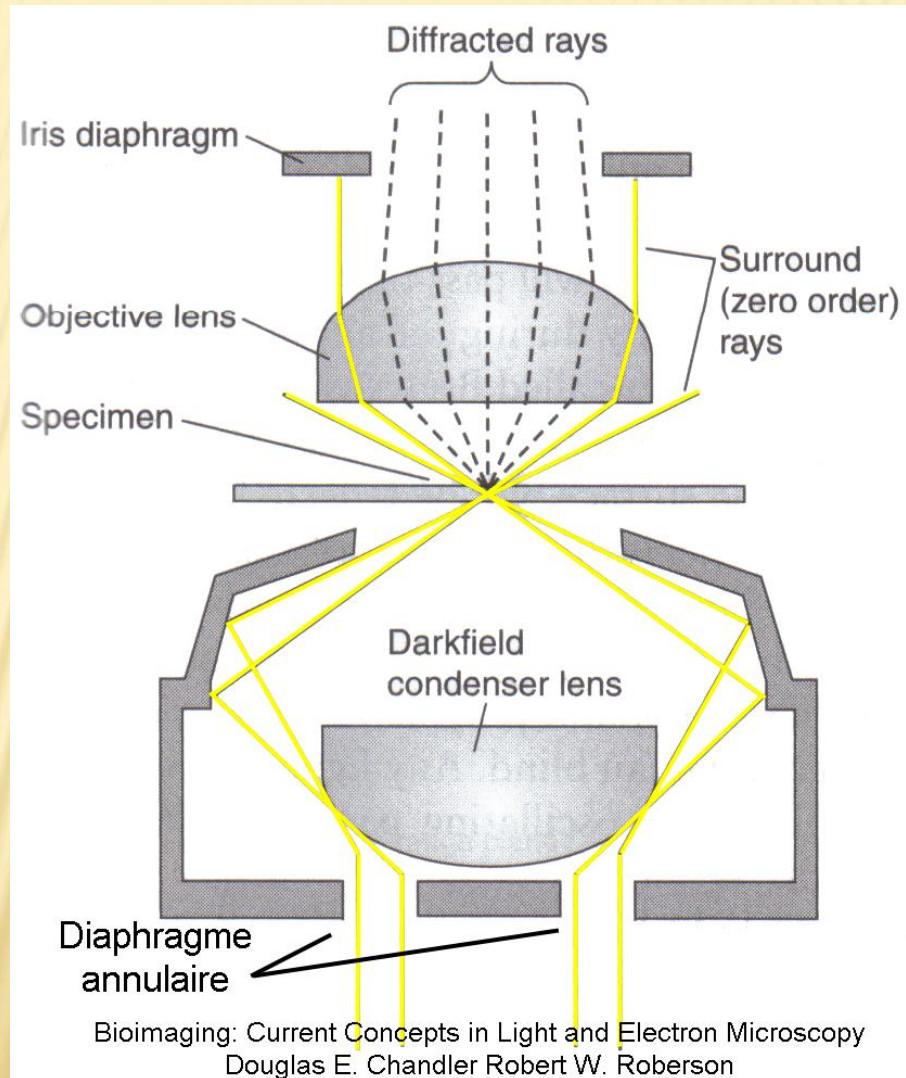


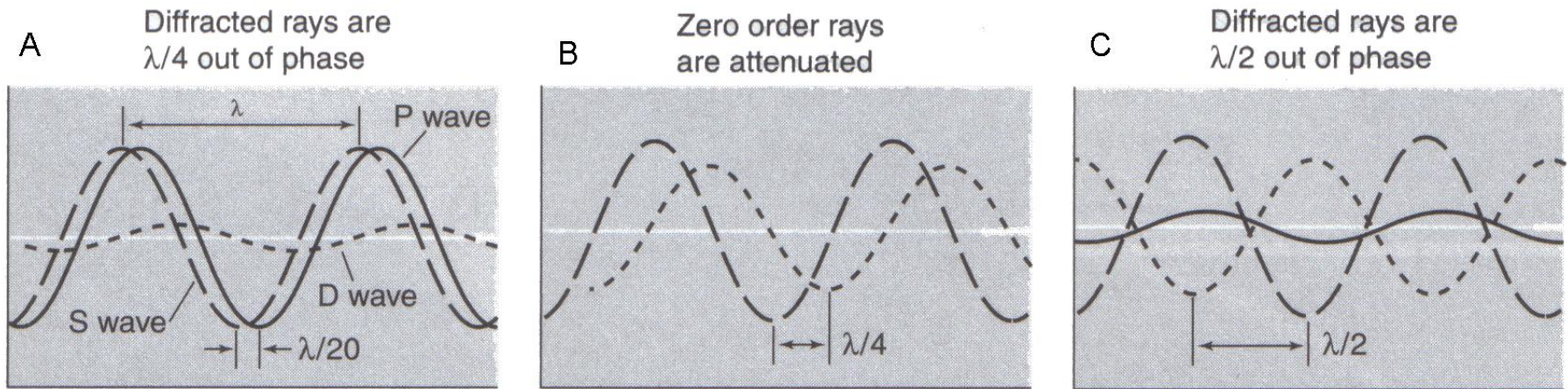
Figure 31 : Condenseur à fond noir

LA MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE

Principe

Eléments optiques
spécifiques

Domaine d'utilisation



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

LA MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE

Principe

Eléments optiques
spécifiques

Domaine d'utilisation

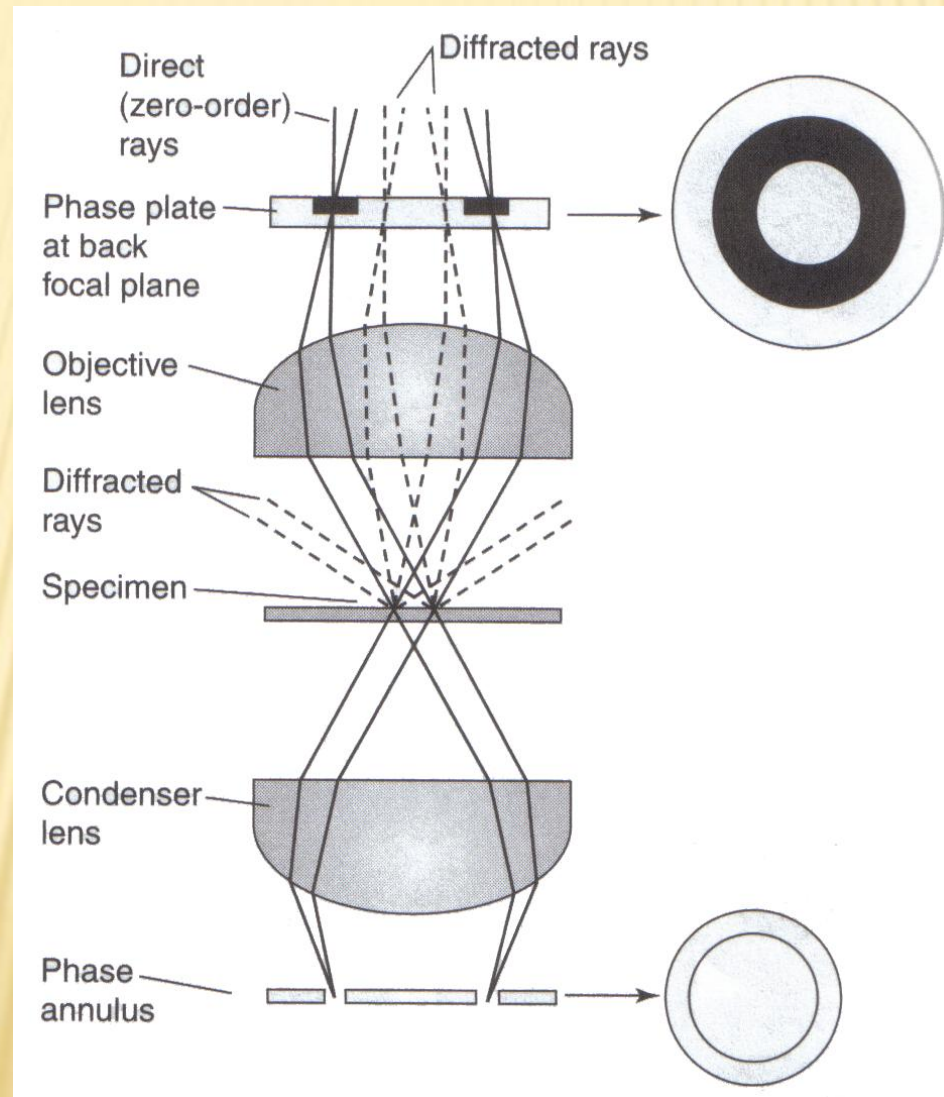


Figure 33 : Couple condenseur - objectif en contraste de phase

LA MICROSCOPIE À CONTRASTE INTERFÉRENTIEL DIFFÉRENTIEL

Principe

Domaine d'utilisation



DIC image of a fixed cell 100 μ m * 100 μ m
<http://www.jpk.com/home.2.en.html>

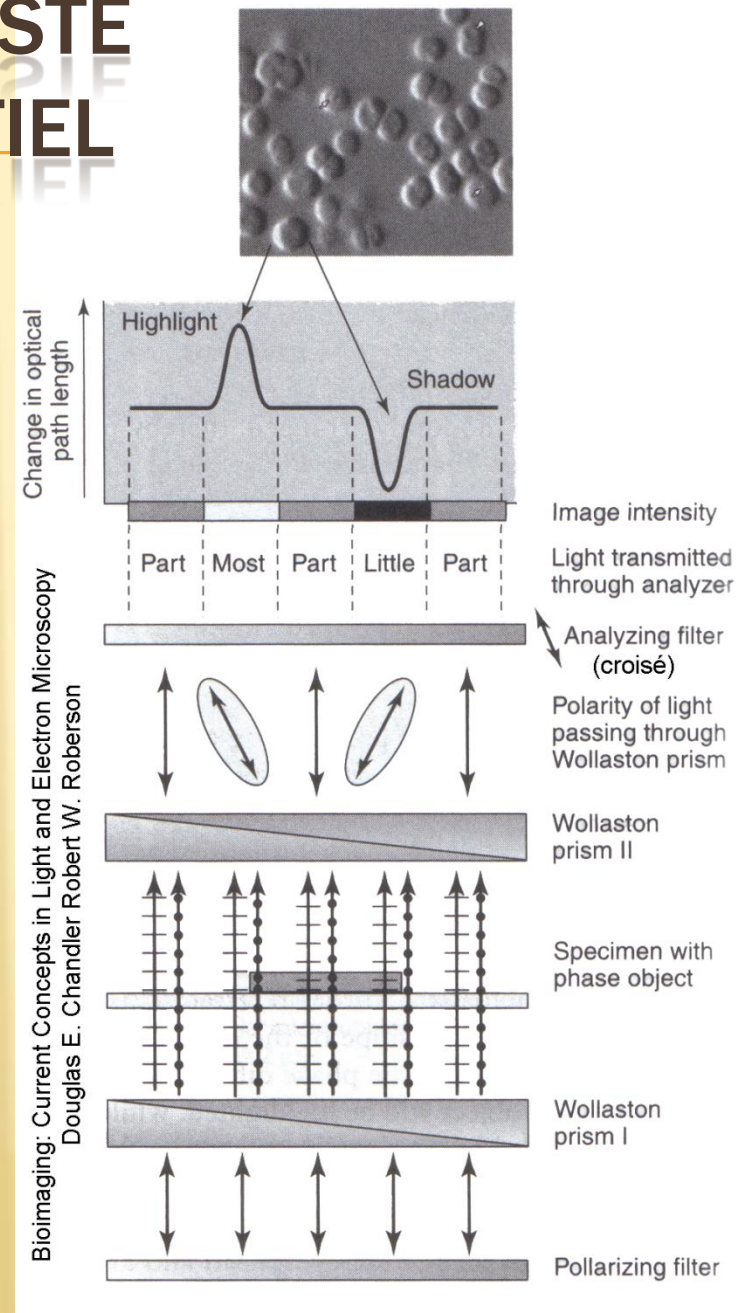


Figure 34 : Principe microscopie à contraste interférentiel Différentiel (DIC)

LA MICROSCOPIE À FLUORESCENCE (CLASSIQUE)

Principe

Éléments optiques spécifiques

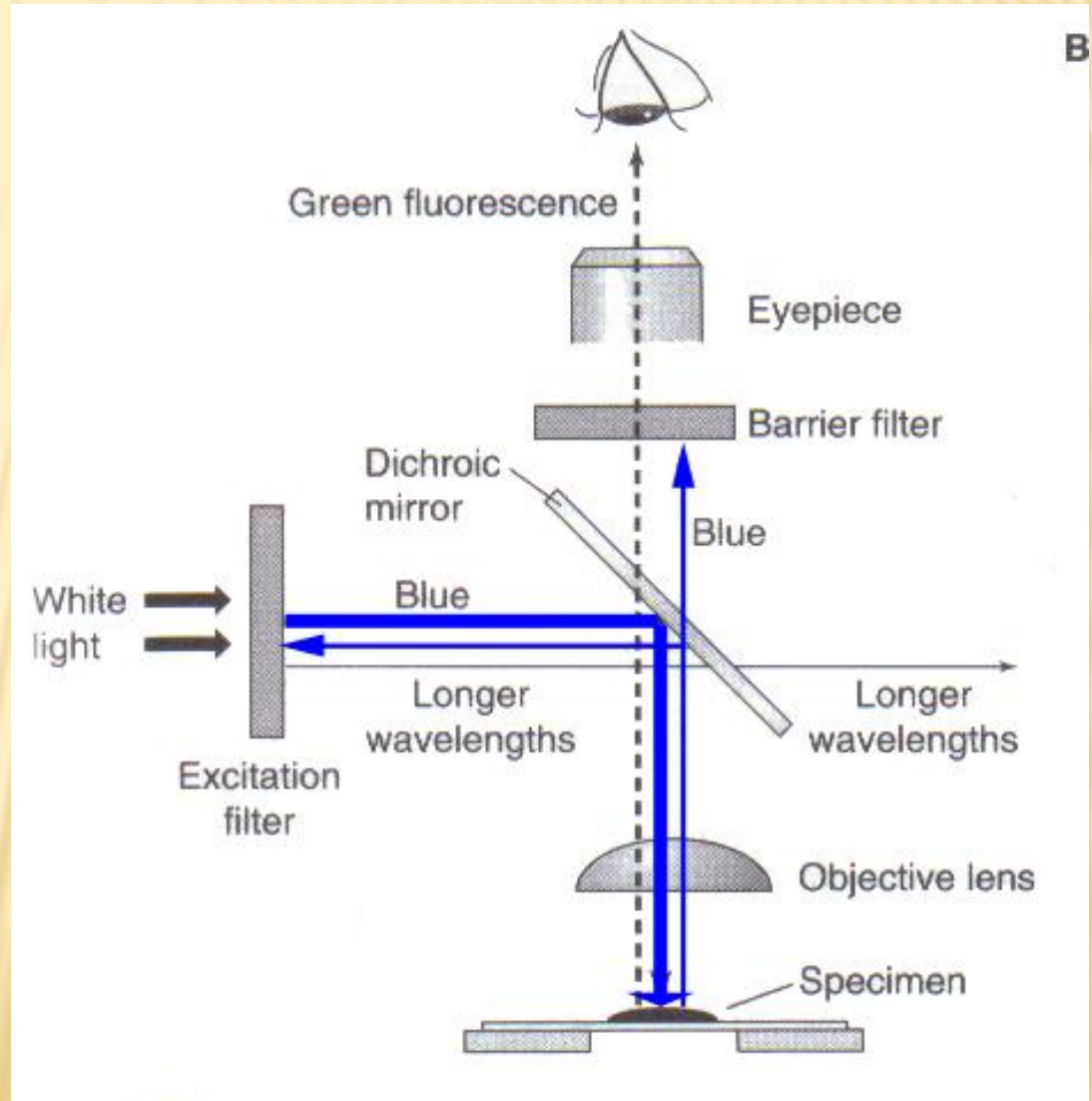
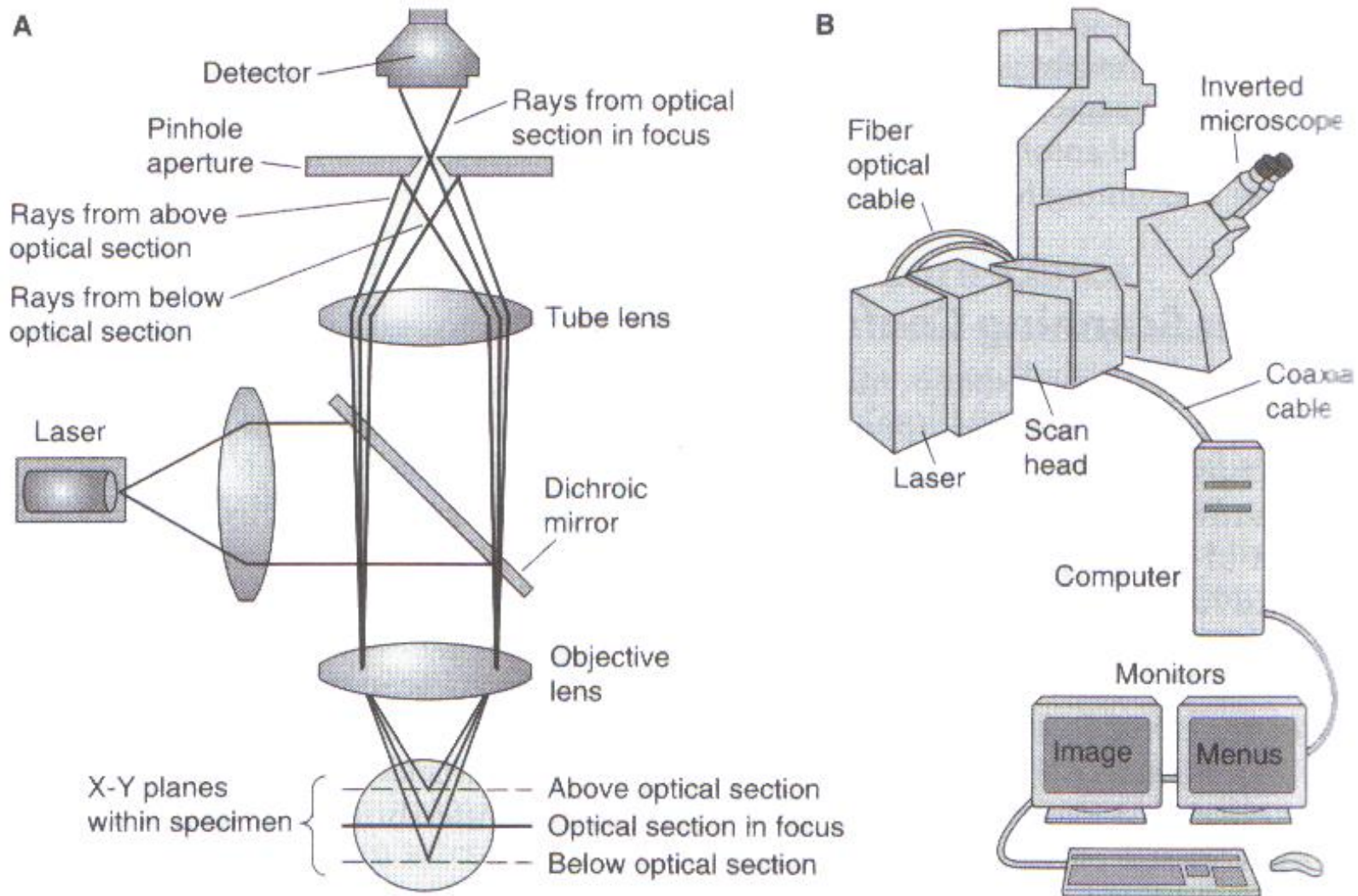


Figure 35 : Epi-illumination en fluorescence

LA MICROSCOPIE CONFOCALE (À BALAYAGE LASER)



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

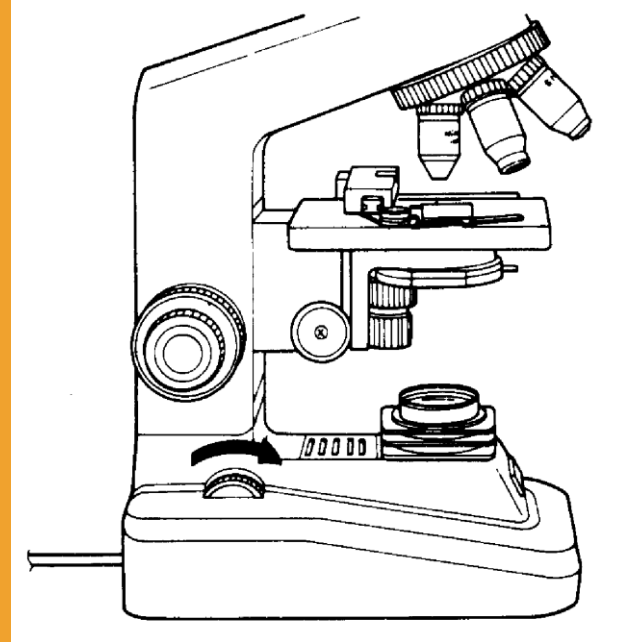
Figure 36 : Microscopie confocale (à balayage laser)

UTILISATION DU MICROSCOPE PHOTONIQUE À FOND CLAIR

AVEC «ÉCLAIRAGE DE KÖHLER »

METTRE AU POINT AVEC L'OBJECTIF UTILISÉ POUR L'OBSERVATION FINALE

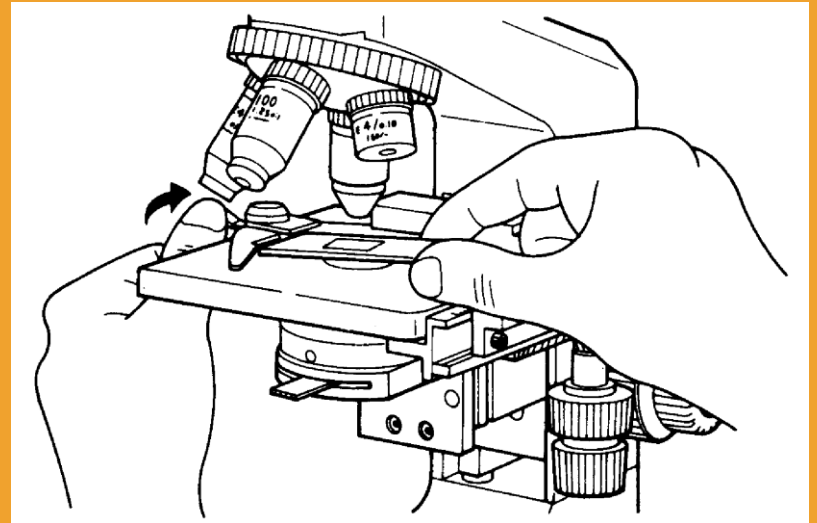
1. Mettre sous tension la source de lumière après s'être assuré que le potentiomètre de réglage de l'intensité lumineuse se trouve sur sa position minimale.



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 dû à une intensité lumineuse trop élevée

METTRE AU POINT AVEC L'OBJECTIF UTILISÉ POUR L'OBSERVATION FINALE

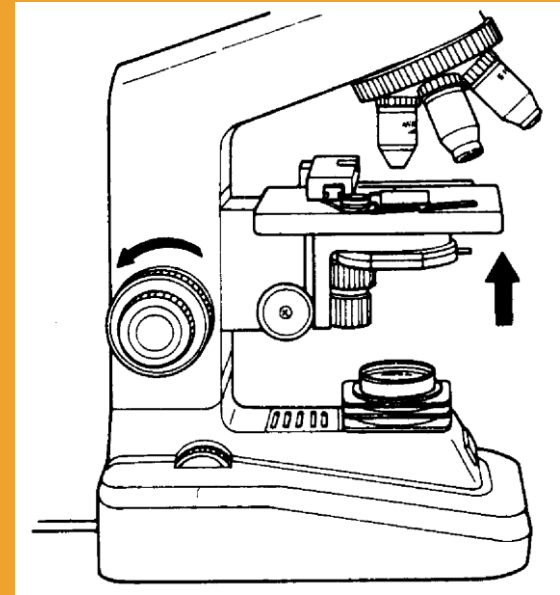
2. Ouvrir les diaphragmes de champ (au-dessus du collecteur de lumière situé après la lampe) et d'ouverture (à l'entrée du condenseur).
3. Positionner la préparation à observer sur la platine porte objet.



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).

METTRE AU POINT AVEC L'OBJECTIF UTILISÉ POUR L'OBSERVATION FINALE

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 côté du microscope, ses yeux ne sont pas sur les oculaires. Tourner le revolver porte objectif pour (éventuellement) positionner un objectif de faible grossissement (x10).



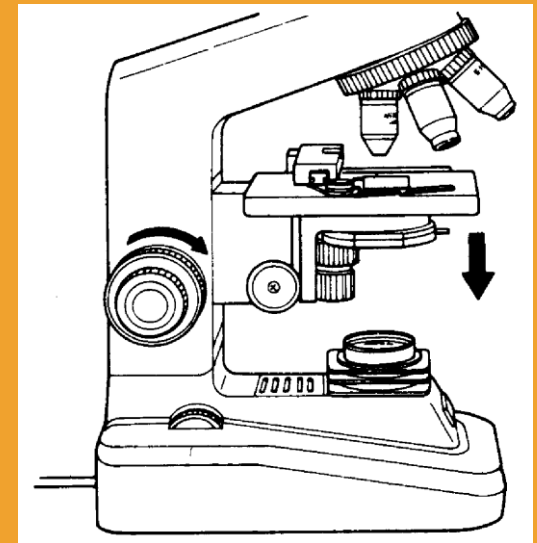
Tous les microscopes n'ont pas de système de réglage de la pré focalisation. La recherche de la mise au point en « aveugle » (⇔ les yeux sur les oculaires sans pré focalisation préalable) :

- 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.*

METTRE AU POINT AVEC L'OBJECTIF UTILISÉ POUR L'OBSERVATION FINALE

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.

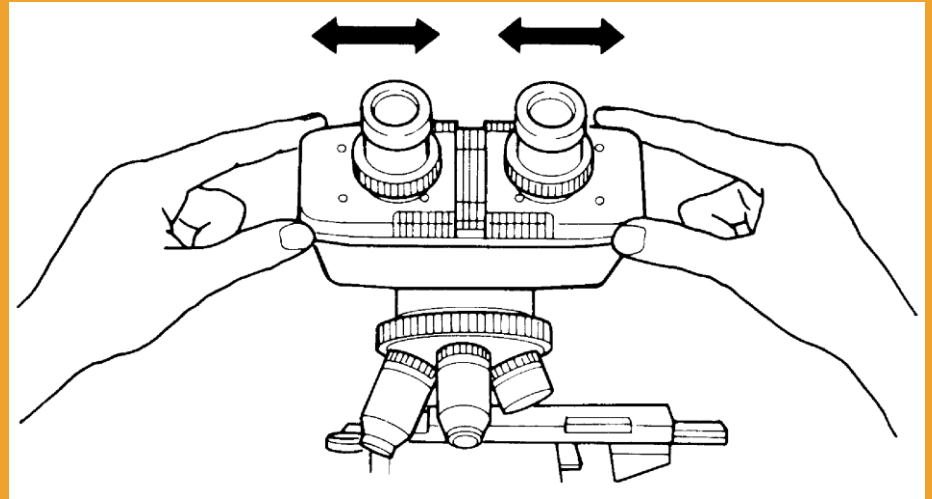
5 bis. Si la mise au point n'est pas trouvée, il est préférable de remonter la platine porte objet en regardant sur le côté du microscope et reprendre à l'étape 4.



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

RÉGLER LA VISION BINOCULAIRE

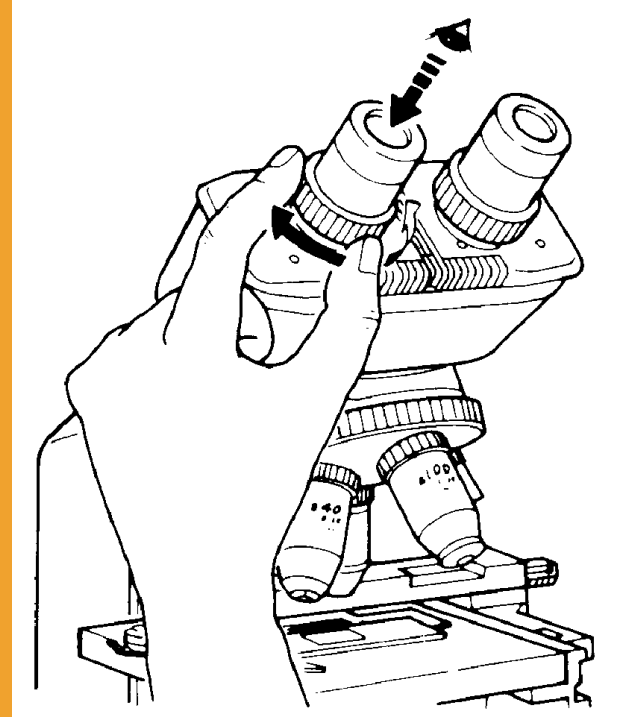
6. Régler l'écartement inter pupillaire des oculaires pour obtenir une parfaite superposition des deux images vues par chaque œil. On observe alors une seule image circulaire.



RÉGLER LA VISION BINOCULAIRE

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).

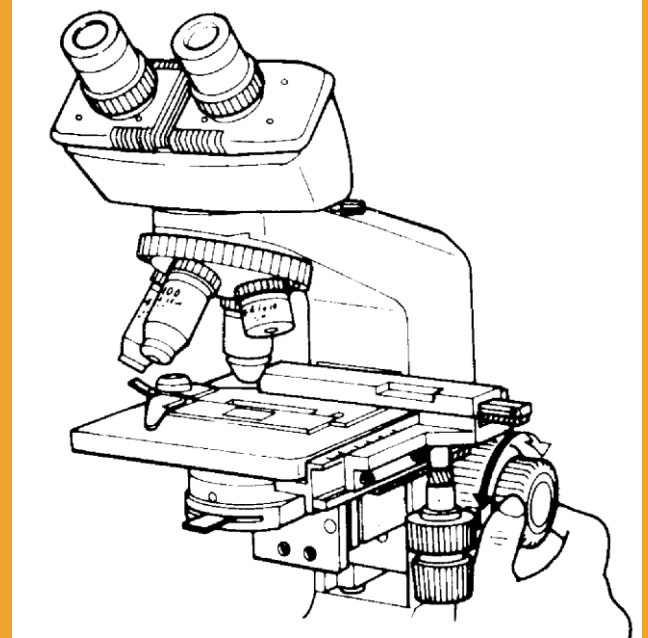


Permettre à l'utilisateur ayant une différence d'acuité visuelle entre ses deux yeux de profiter du confort de l'observation binoculaire.

METTRE AU POINT AVEC L'OBJECTIF UTILISÉ POUR L'OBSERVATION FINALE

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).

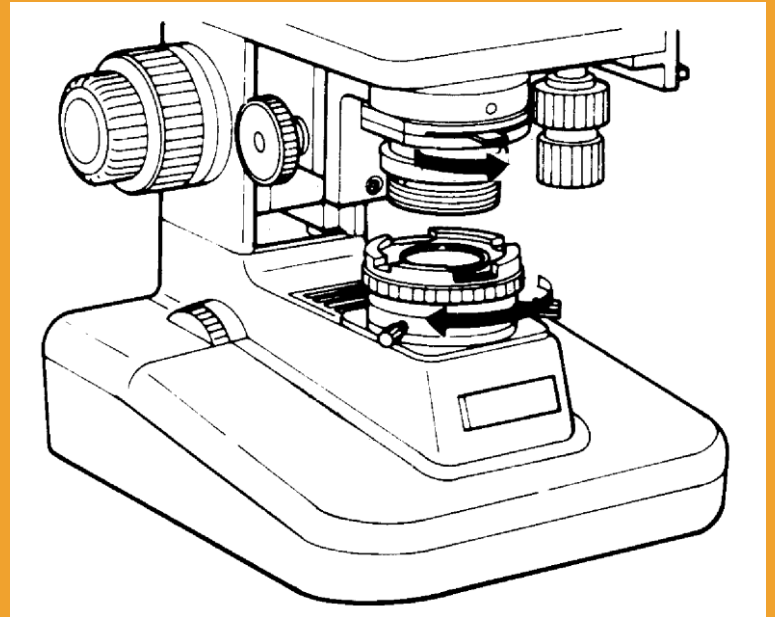
8 bis. Les étapes suivantes de réglage des éléments de l'optique d'éclairage peuvent éventuellement se réaliser en retirant la préparation en prenant garde de ne pas changer la mise au point



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

CENTRER LE DIAPHRAGME DE CHAMP

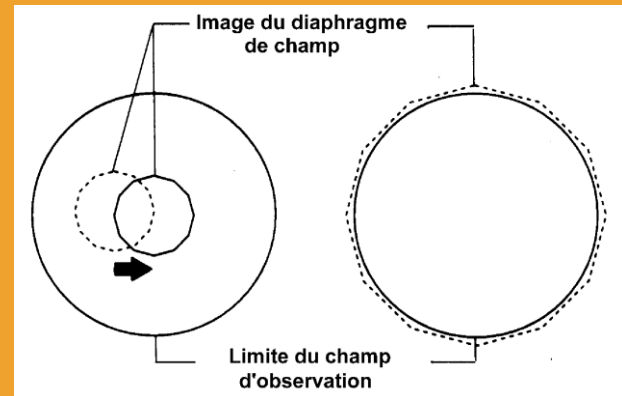
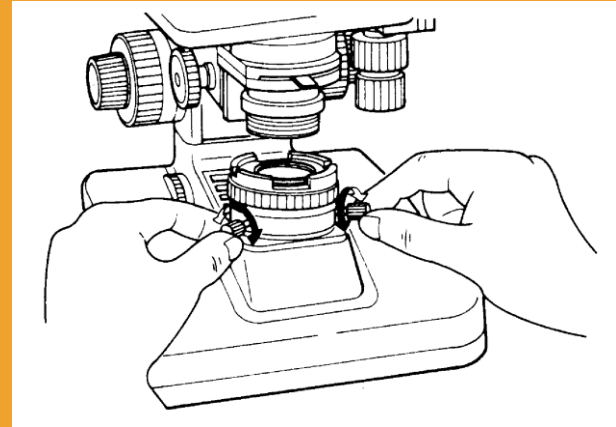
9. Fermer progressivement les diaphragmes de champ et d'ouverture (respectivement sur le collecteur et sous le condenseur) pour n'éclairer qu'une partie du champ observé. Le diamètre de la colonne de lumière qui monte de la source est plus petit que le champ présent sous la lentille de l'oculaire.



CENTRER LE DIAPHRAGME DE CHAMP

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)

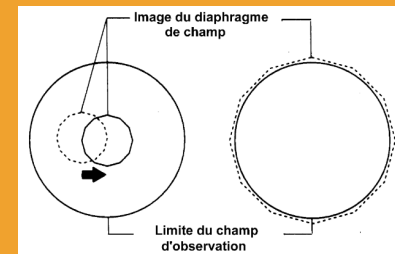
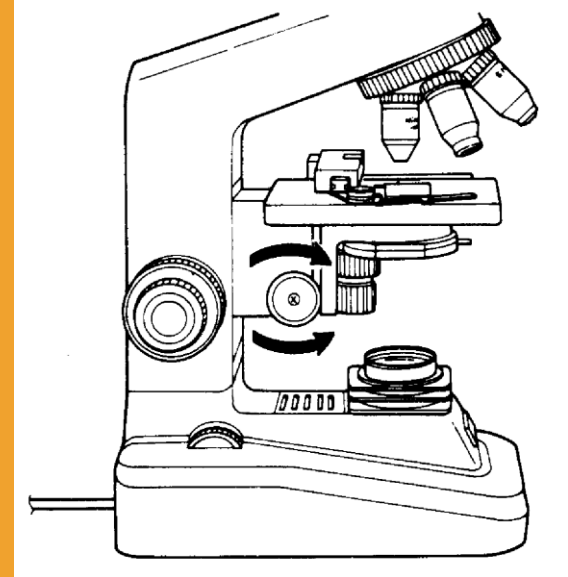
L'axe du faisceau d'éclairage qui traverse l'objet et l'axe de l'objectif doivent être alignés.



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

RÉGLER LA HAUTEUR DU CONDENSEUR

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.

CENTER ET RÉGLER LA SOURCE

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.

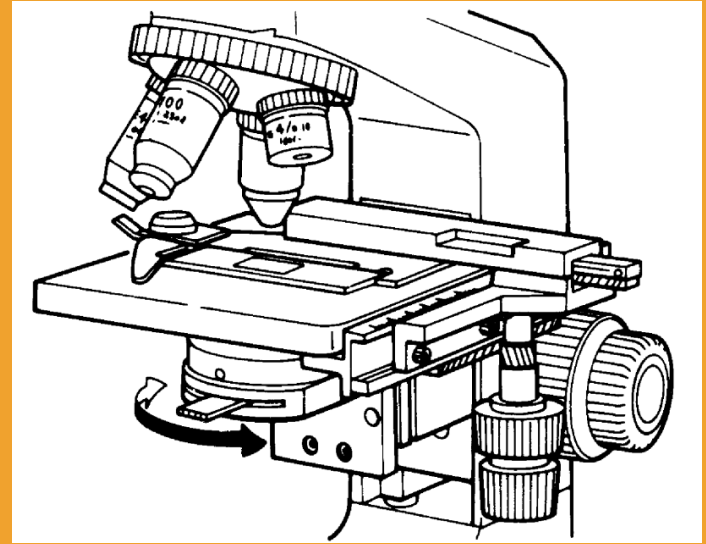
En l'absence d'objet, l'obtention d'un fond uniformément clair où chaque point de la source éclaire l'ensemble du champ d'observation et de la rétine nécessite d'avoir une source lumineuse réglée et centrée ; le principe de l'éclairage de Köhler est de projeter l'image de la source lumineuse dans le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

RÉGLER L'OUVERTURE DU DIAPHRAGME D'OUVERTURE

12. Régler le diaphragme d'ouverture (situé à l'entrée du condenseur) :

Pour les objets très contrastés ($\Leftrightarrow$ 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 ».



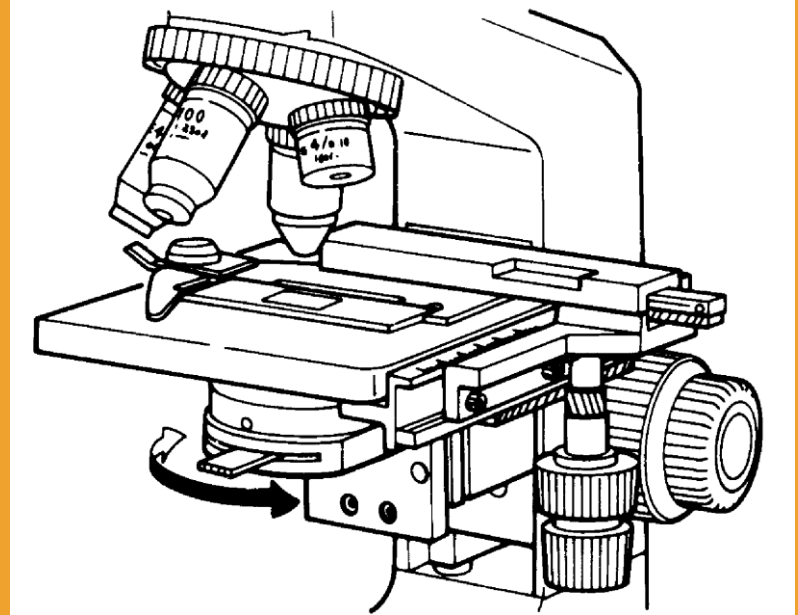
Si le D.O. est trop ouvert des rayons diffractés ou diffusés hors de la zone observée pénètrent dans l'objectif (ouverture d'éclairage supérieure à l'ouverture numérique de l'objectif) et diminuent les contrastes. Si le D.O. est trop fermé l'image est sombre et des franges de diffraction apparaissent ; 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 côté 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.

RÉGLER LA LUMINOSITÉ ET AFFINER LA MISE AU POINT

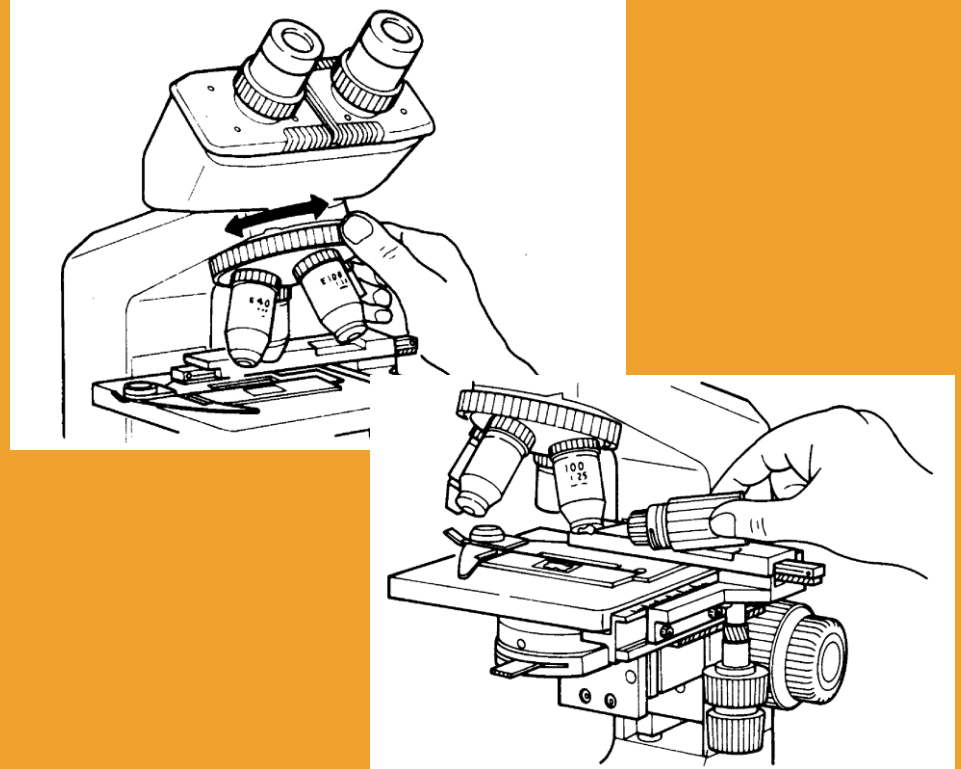
13. La clarté se règle sur le potentiomètre de modulation de l'intensité lumineuse. C'est le seul réglage qu'il faut modifier en attendant votre professeur : intensité lumineuse au minimum.



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).

POURSUIVRE L'OBSERVATION

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 grossissements. Les autres objectifs ne doivent pas entrer en contact avec l'huile à immersion.

Il faut ajuster le réglage des diaphragmes au nouvel objectif

TERMINER L'OBSERVATION

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 housse de protection sur le microscope

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