

LE MICROSCOPE OPTIQUE

Le microscope optique est un instrument d'optique muni d'un système objectif et d'un système habituellement binoculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions (ce qui caractérise son grossissement) et de séparer les détails de cette image (et son pouvoir de résolution) afin qu'il soit observable par l'œil humain.

Il est utilisé en biologie cellulaire, pour observer les cellules, les tissus, en pétrographie pour reconnaître les roches, en métallurgie et en métallographie pour examiner la structure d'un métal ou d'un alliage. Il comprend des parties mécaniques d'une très grande précision et des optiques tout aussi fragiles.

Les lentilles du microscope optique sont utilisées sur pour obtenir une image agrandie de l'échantillon à observer. Un système microscopique est constitué d'un **objectif** et d'un **oculaire**, permettant de résoudre le problème des conjugaisons pupillaires (suppression du vignettage par la pupille de l'œil qui peut ici être placée sur la pupille de sortie du microscope) et celui de la correction des aberrations de champ (système global "épais" constitué de plusieurs lentilles ou multipléts).

La technique d'illumination la plus utilisée en microscopie à champ large classique est l'illumination de Köhler, qui garantit une qualité d'image optimale.

Parties composantes du microscope (figure 2) :

A. Parties mécaniques

a. Statiques

- [1]. La potence
- [2]. Pied ou socle
- [3]. Platine

b. Mobiles

- [4]. Vis macrométrique
- [5]. Vis micrométrique
- [6]. Vis de déplacement avant-arrière
- [7]. Vis de déplacement latéral
- [8]. Vis du condenseur (déplacements haut-bas)

B. Parties optiques

- [9]. Oculaire
- [10]. Port-oculaire
- [11]. Revolver
- [12]. Objectifs
- [13]. Préparation (lame)
- [14]. Condenseur
- [15]. Diaphragme
- [16]. Lampe
- [17]. Interrupteur

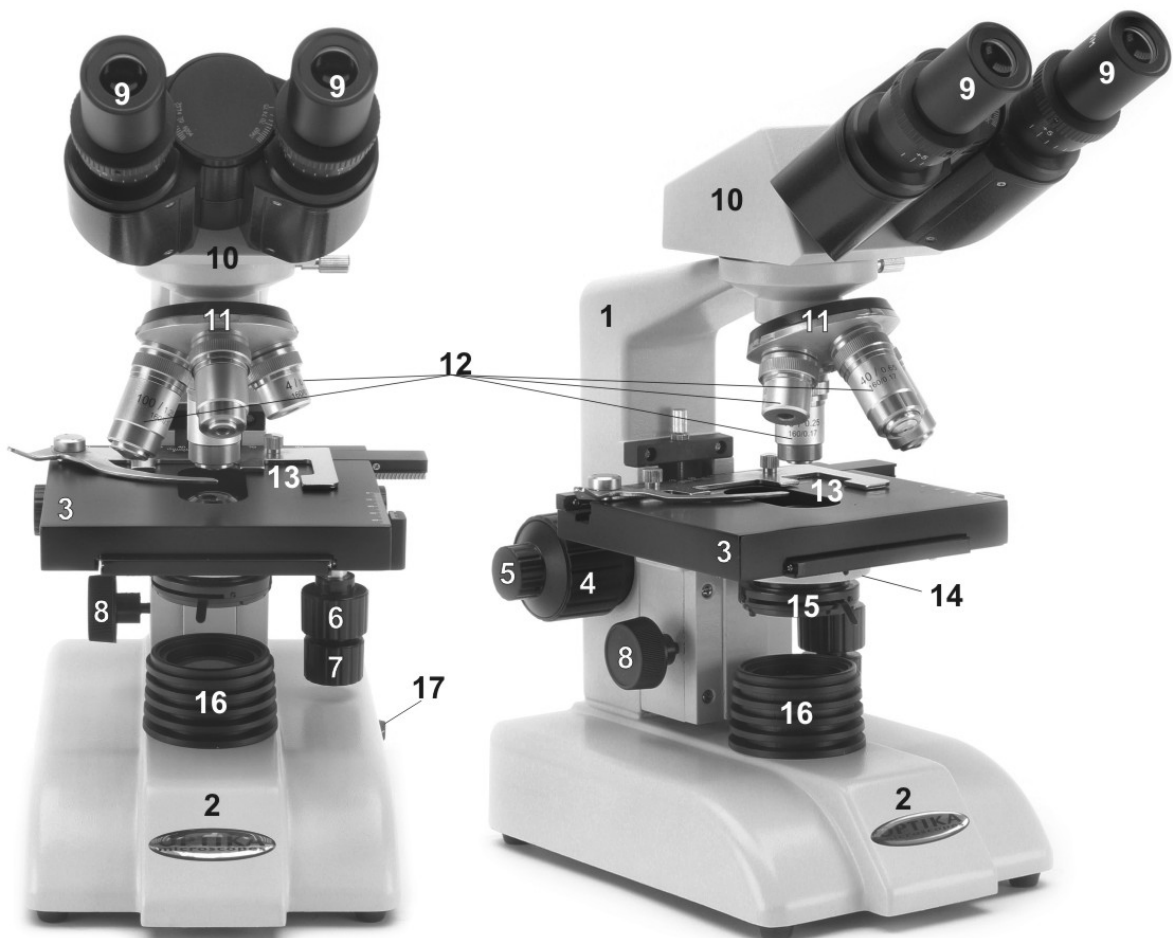


Figure 2. Parties composantes du microscope optique

Comment utiliser le microscope optique:

Placer correctement le microscope devant soi, travailler assis, les coudes posés sur la table.

- Vérifier que le petit objectif (x10) est en place et bien enclenché.
- Allumer l'éclairage.
- Placer la préparation microscopique (lame) sur la platine; positionner l'objet à étudier dans le cône de lumière. La lame se glisse sur la platine, comprise par les valets, de telle façon que la partie que nous désirons observer, soit au dessus et placée au milieu du trou central.
- Faire la mise au point grossière en tournant la vis macrométrique puis ajuster finement avec la vis micrométrique.
- Dans la préparation microscopique, rechercher puis centrer une zone favorable à l'observation demandée.
- Adapter l'intensité de la lumière en jouant sur la commande du diaphragme.
- Passer à un grossissement supérieur si nécessaire: sans descendre la platine ; tourner la tourelle revolver avec précaution (surtout avec le gros objectif x40) jusqu'à encliqueter l'objectif. Retoucher la mise au point: pour les objectifs x20 et x40, n'utiliser que la vis micrométrique pour ne pas casser lame et lamelle !

A chaque changement de grossissement, refaire le centrage de la préparation et le réglage de la lumière.

La limite de résolution (transverse) d d'un microscope, c'est-à-dire la plus petite distance en-dessous de laquelle deux points voisins ne seront plus distingués, peut être exprimée à l'aide de la longueur d'onde d'illumination λ , de l'indice de réfraction n en sortie d'objectif, et du demi angle du cône de lumière maximum accessible α .

$$d = \lambda / 2n \sin\alpha = \lambda / 2NA$$

où NA désigne le produit $n \sin\alpha$ ou ouverture numérique de l'objectif.

La résolution peut être augmentée de deux manières :

- en augmentant l'indice de réfraction. Ceci peut être réalisé en utilisant un objectif à immersion: on immerge la frontale de l'objectif dans un liquide dont l'indice de réfraction est proche du maximum de 1,5 - celui du verre.
- en diminuant la longueur d'onde. Toutefois, si on reste dans la lumière visible, il n'est pas possible de descendre en-dessous de 400 nm.

La limite de résolution d'un microscope photonique est d'environ **0,2 μm** .

Le microscope électronique en transmission atteindra, lui, une limite 100 fois plus petite.

LA MICROSCOPIE EN FLUORESCENCE

La **fluorescence** représente une émission lumineuse induite par formes variées d'excitation sauf la chaleur (on dit parfois de « lumière froide »). Elle se distingue de la phosphorescence en ce que la production de lumière intervient immédiatement ou rapidement après l'excitation. Elle peut entre autres servir à caractériser un matériau. Le processus de phosphorescence se produit en quelque sorte semblable à la fluorescence, mais avec une durée plus longue.

La fluorescence est un membre de la famille des processus dans lequel molécules sensibles émettent de la lumière dans des états électroniquement excités induites soit par physiques (par exemple, l'absorption de la lumière), mécanique (friction), ou mécanisme chimique. Les molécules qui possèdent cette propriété de fluorescence incluent dans leur structure des groupements chimiques appelés *chromophores* qui sont responsables de cette propriété.

Les plus fréquemment rencontrés dans les molécules organiques sont les noyaux benzéniques. Sous l'impact des photons, le chromophore passe à un état excité, puis il revient à son état fondamental (en physique quantique, les états fondamentaux d'un système sont les états quantiques de plus basse énergie) en émettant de la lumière.

La fluorescence est la propriété de quelques atomes et molécules pour absorber la lumière à une longueur d'ondes particulière et par la suite émettre la lumière de longueur d'ondes plus longue après un intervalle bref, a désigné la durée de vie (fonctionnement) de fluorescence.

Par différence à d'autres types de microscopie optique qui sont basés sur les caractéristiques du spécimen macroscopique comme des gradients de phase, l'absorption de la lumière, ou la biréfringence, la microscopie en fluorescence est capable de former l'image de la distribution des espèces moléculaires simples qui émettent de la fluorescence.

On peut surveiller l'endroit précis des composants intracellulaires marqués avec les fluorophores spécifiques, en utilisant la microscopie de fluorescence, aussi bien que leurs coefficients de diffusion, caractéristiques de transport, et interactions associés avec d'autres biomolécules.

En outre, les changements dans la fluorescence aux variables environnementales localisées permettent la recherche sur le pH, la viscosité, l'indice de réfraction, les concentrations ioniques, le potentiel de membrane, et la polarité dissolvante dans les cellules et les tissus vivants.

Types de fluorescence

En fluorescence on distingue deux types d'objets :

- ceux qui émettent de la lumière fluorescente par eux-mêmes, on parle de fluorescence primaire ou autofluorescence (chlorophylle, huile, collagène, élastine, fibrilline, flavine, indolamine, pigments, aminoacides etc.).
- ceux qui doivent être combinés à une substance fluorescente pour émettre de la fluorescence on parle donc de fluorescence secondaire. La microscopie en fluorescence est limitée par la diffraction de la lumière, donc le pouvoir de résolution est de 200 nm environ.

Applications microscopiques de la fluorescence

Les techniques de fluorescence peuvent être appliquées avec différents types de microscope :

- un *microscope optique classique*. On peut faire passer le faisceau excitateur par l'objectif et non pas par dessus du spécimen. On parle alors de microscopie à épifluorescence ;

- un *microscope confocal à balayage laser*. Le microscope confocal atteint une résolution bien meilleure que le microscope optique classique, et permet de réaliser des images en trois dimensions de l'objet ;

- un *microscope de fluorescence par réflexion totale interne*. Il permet notamment d'obtenir une meilleure profondeur de champ (200 nm) que la microscopie confocale (600 nm), mais uniquement à la base de l'échantillon, et plus précisément au niveau de l'interface entre l'échantillon et le support.

Applications pratiques du marquage fluorescent

Le marquage simple se fait par affinité entre un fluorochrome et la molécule à marquer (ex. DAPI qui marque l'ADN et fluoresce en bleu).

Un exemple est représenté par la comparaison parmi 3 fluorochromes avec spectres d'absorption et d'émission différents. La fluorescéine (FITC – **F**luoresceine **I**so-**T**hio-**C**yanate) absorbe les radiations bleues (max 490 nm) et restitue une fluorescence verte (max 520 nm). La rhodamine (TRITC – **T**etra-methyl **R**hodamine **I**so-**T**hio-**C**yanate) absorbe les radiations vertes (max 541 nm) et restitue une fluorescence rouge (max 572 nm). Le DAPI (**D**i **A**minido **P**henyl **I**ndol) absorbe les radiations violettes (max 372 nm) et restitue une fluorescence bleue (max 456 nm). Les résultats varient selon le type de fluorochrome spécifique pour certains éléments sous-cellulaires (figure 5).

L'immunofluorescence (figure 6) est utile si on veut détecter, par exemple, une substance X non soluble (donc fixée) dans la cellule. Premièrement, on utilise la substance X comme un antigène et l'on injecte à une autre espèce (ex. lapin)(6A). Cette espèce réagit en fabriquant des anticorps (immunoglobulines) anti-X (6B). On sépare les anticorps de cette espèce par chromatographie d'affinité. Les anticorps anti-X se fixent spécifiquement sur X, sur la préparation cellulaire, chez la première espèce (6C). On pourrait fixer une molécule de fluorescéine directement sur ces anticorps mais il est plus utile de coupler des anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin soudés à une molécule de fluorescéine (6D). Irradiée en lumière ultraviolette, la fluorescéine fixée émet en vert et permet de localiser la substance X (6E).

Autres techniques de marquage fluorescent sont :

- La technique du FISH (**F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization) sert à marquer des séquences nucléotidiques par des sondes marquées à l'aide d'un marqueur fluorescent et utilisées sur des coupes en microscopie. Le FISH est une technique de cytogénétique permettant de voir des éléments à l'intérieur de la cellule
- Le FRAP (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching – redistribution de la fluorescence après photoblanchiment) consiste à appliquer un flash lumineux (laser) sur une zone restreinte de l'échantillon. Dans cette région, les molécules ne seront plus fluorescentes. Quand même, si les molécules sont mobiles dans le milieu, les populations fluorescentes sont redistribuées jusqu'à l'homogénéisation. Ces techniques permettent d'étudier la diffusion latérale des molécules marquées, caractéristique de la vitesse de

déplacement des molécules dans le milieu (plus la vitesse de diffusion est élevée plus la fluorescence ré-augmente rapidement).

- Le FRET (Forster Resonance Energy Transfer - transfert d'énergie entre molécules fluorescentes par résonance de type Forster) utilise deux fluorochromes, un donneur qui va transmettre son énergie à un autre fluorochrome accepteur. Elle permet d'étudier des interactions entre deux molécules.
- Le BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), comme le FRET sinon que le donneur est bioluminescent (luciférase).

LA MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE

Le contraste de phase est une technique largement utilisée qui permet de mettre en valeur les différences d'indices de réfraction comme différence de contraste. Elle a été développée par le physicien hollandais Frederik Zernike dans les années 1930 (il reçut pour cela le prix Nobel en 1953).

Le microscope de contraste de phase utilise le fait que la lumière passant par une partie transparente du spécimen voyage plus lentement et, pour cette raison est retardée comparée à la lumière non influencée. Cette différence dans la phase n'est pas visible à l'œil humain. Cependant, le changement de la phase peut être augmenté à la moitié d'une longueur d'ondes par une plaque de phase transparente dans le microscope et peut générer une différence dans la luminosité. Cela fait l'objet transparent plus lumineux que son environnement.

La microscopie est un outil largement utilisé particulièrement pour les cellules vivantes, non-fixées et non-colorées. La méthode est aussi actuellement utilisée simultanément avec la fluorescence reflétée pour révéler les secteurs d'un spécimen qui n'est pas fluorescent. Les techniques de microscopie de phase sont particulièrement utiles avec les spécimens qui sont minces et dispersés dans le champ visible.

Applications de la microscopie en contraste de phase

Le contraste de phase est une méthode excellente pour augmenter le contraste de spécimens minces, transparents sans perte de résolution et a prouvé pour être un outil de valeur dans l'étude d'événements dynamiques dans des cellules vivantes, non-fixées, non-colorées

La technique de contraste de phase est largement appliquée dans la recherche biologique et médicale, particulièrement partout dans les domaines de cytologie et l'histologie. On peut examiner :

- des cellules vivantes,
- des tissus non-fixés, non-colorés
- les microorganismes qui sont transparents sous l'illumination à fond clair
- les composants cellulaires internes,
 - la membrane,
 - des noyaux,
 - mitochondries,
 - le fuseau mitotique et les chromosomes,
 - l'appareil de Golgi
 - les granules cytoplasmiques des cellules végétales ou animales

De plus, la microscopie de contraste de phase est largement utilisée pour le diagnostic de cellules tumorales et la croissance, la dynamique et le comportement d'une large variété de cellules vivantes dans la culture. Ces cellules des cultures sont examinées particulièrement par un microscope inverse en contraste de phase.

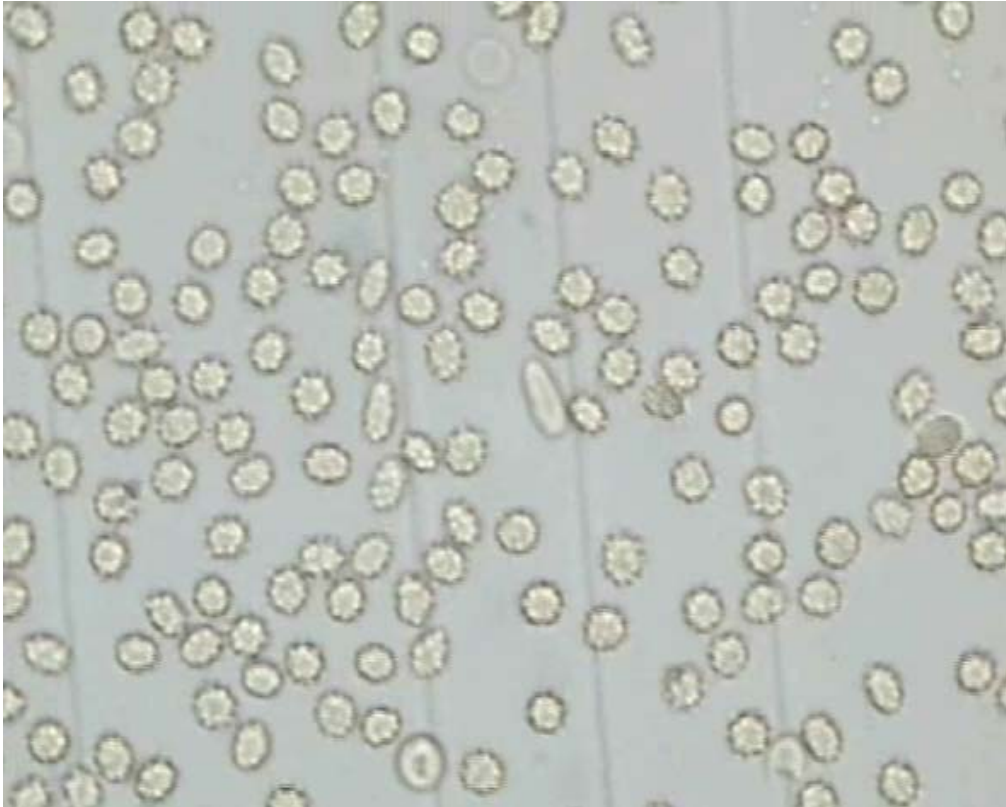


Figure 8. Hématies en contraste de phase (x400)

On put utiliser le microscope en contraste de phase pour l'hématologie, la virologie, la bactériologie.

LA MICROSCOPIE EN LUMIERE POLARISEE

Le microscope polarisant, ou microscope polariseur-analyseur est représenté par un microscope optique qui comprend deux filtres polarisants: polariseur et analyseur. Il est utilisé particulièrement en minéralogie mais aussi en biologie et la recherche biomédicale.

La biréfringence (figure 10) peut être :

- positive : si le rayon ordinaire est transmis plus vite que le rayon extraordinaire (ex. collagène, fibres myéliniques, fibres du muscle strié)
- négative : si le rayon extraordinaire est transmis plus vite que le rayon ordinaire (ex. calcite, fibres nucléoprotéiques)
- biréfringence intrinsèque : décrit les matériaux naturels qui ont l'indice de réfraction asymétrique dépendant de la direction. Exemples : cristaux anisotropes, minéraux et produits chimiques normaux et synthétiques
- biréfringence de structure : dépend de la structure et est aussi sensible aux variations de l'indice de réfraction du milieu environnemental. On l'observe pour les composés macromoléculaires biologiques tels que les chromosomes, les fibres musculaires, des microtubules, l'ADN cristallin liquide, et des structures fibreuses de protéine telles que des cheveux.
- biréfringence cristalline, spécifique pour les cristaux protéiques ou lipidiques
- biréfringence de tension : qui apparaît dans des structures soumises aux tensions mécaniques (muscles, tissus embryonnaires, polymères, lentilles en plastique)

Applications de la microscopie en lumière polarisée

Ce type de microscopie est utilisé dans plusieurs disciplines : médecine, biologie, géologie, science des matériaux, industrie alimentaire.

Un avantage important du microscope en lumière polarisée est qu'il peut distinguer les matériaux isotropes des matériaux anisotropes. Les matériaux isotropes, tels que les cristaux cubiques, les liquides et les gaz ne sont pas restreints en termes de vibration de la lumière qui les traverse. Par contre, les matériaux anisotropes ont une large gamme des propriétés réfringentes. Environ 90% de substances solides sont les matériaux anisotropes.

Pour la microscopie en lumière polarisée on peut utiliser la lumière réfléchie (incidente ou **e**pi) ou la lumière transmise. La lumière réfléchie est utile pour l'étude des matériaux opaques tels que la céramique, les oxydes et les sulfures minéraux, les métaux, les alliages, les composés, et les gaufrettes de silicium.