

LE MICROSCOPE OPTIQUE

Principes

Marc Moreau, Directeur de recherche CNRS

Catherine Leclerc, Chargé de recherche CNRS

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse CEDEX 09

marc.moreau@univ-tlse3.fr

catherine.leclerc@univ-tlse3.fr

Le microscope est un instrument optique qui donne une image grandie d'un objet en général transparent. Il est constitué d'un banc optique dont une partie se trouve devant l'objet : l'éclairage, l'autre partie derrière l'objet pour l'observation. Ce banc doit être rigide et posséder tous les organes de centrage des pièces optiques (fig.1).

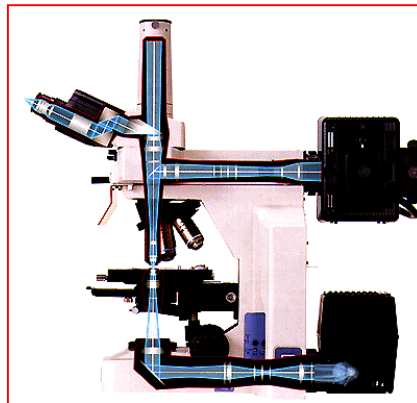


Figure 1 : coupe d'un microscope moderne

Il existe des microscopes dits droits (objectif pointant vers le bas) et des microscopes dits inversés (objectifs pointant vers le haut).

1. Principe :

L'objet est transformé en une image réelle à l'aide d'un objectif. L'image se forme au plan focal d'un oculaire qui va pouvoir en donner ensuite une image virtuelle située à l'infini (fig2). On peut déduire de ce simple schéma que le grossissement de l'appareil dépend non seulement des objectifs et des oculaires mais aussi des distances qui séparent les composants.

Initialement, pour la plupart des constructeurs, la longueur de tube était de 160 mm, sauf Leica qui utilisait des tubes de 170 mm et certains microscopes métallographiques avec des tubes de 250 mm. L'image se forme à 14 mm du plan focal de l'oculaire. Le pas de vis et le diamètre de la monture étaient fixés et universels. Ainsi, on pouvait passer un objectif d'un microscope d'une marque à un microscope d'une autre marque.

Toutefois, depuis quelques années les constructeurs ont mis sur le marché les optiques dites à l'infini. Ces objectifs ne forment plus d'image en un plan défini mais à l'infini. Le faisceau sortant de l'objectif est donc parallèle. Ceci permet de positionner l'oculaire n'importe où. Quel est l'avantage ? On peut intercaler entre l'objectif et l'oculaire autant d'accessoires que l'on veut sans être obligé de rajouter des lentilles additionnelles de correction. Cependant, les tailles de montures et de pas de vis ont été modifiés rendant impossible le transfert des objectifs d'une marque à l'autre.

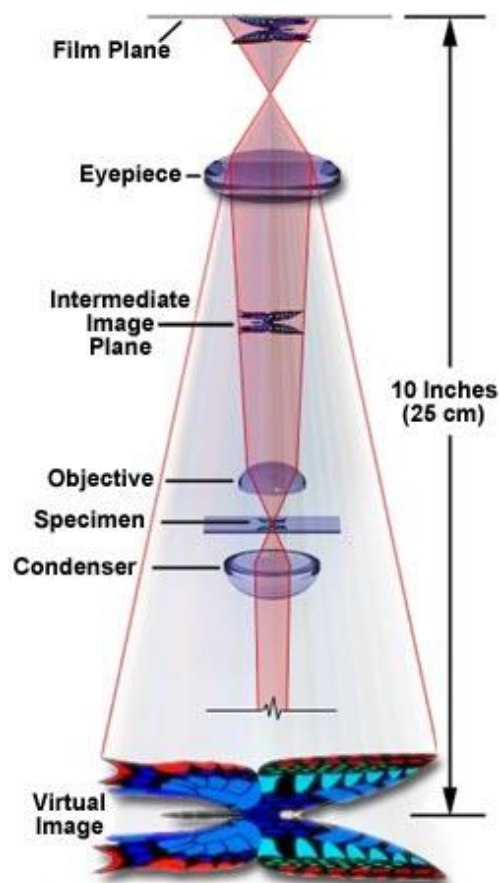


Figure 2 : formation de l'image (principe optique)

2. Mécanique

Le microscope comporte :

- une base
- une potence qui supporte le revolver porte-objectif, le tube porte-oculaires
- la platine qui se déplace dans deux dimensions
- le support du condensateur
- Des systèmes de crémaillères permettent de réaliser une mise au point rapide et fine. Différentes mécaniques existent pour réaliser ces réglages.

3. Optique

Les objectifs sont les éléments les plus critiques d'un microscope. Ils déterminent sa qualité optique.

Un objectif est un système à lentille convergente plus ou moins complexe avec une distance focale courte, qui projette l'image agrandie et inversée de l'échantillon vers le plan focal inférieur de l'oculaire, de sorte que celui-ci puisse "voir" et grossir encore l'image.

Les objectifs sont placés dans une tourelle porte-objectifs ou tourelle revolver qui comporte six ou sept objectifs avec des grossissements différents. En général les caractéristiques sont écrites sur l'objectif (fig.3).

Il existe un certain nombre de constantes :

- l'ouverture numérique (angle maximum sous lesquels les rayons issus de l'objet peuvent pénétrer dans le système optique)
- le grandissement
- contraste de phase ou pas
- immersion

- longueur du tube
- épaisseur de la lamelle couvre-objet.



Figure 3 : tourelle d'objectifs et leurs caractéristiques.

De la qualité de l'objectif dépend la qualité de l'image.

L'ouverture numérique

OBJECTIF

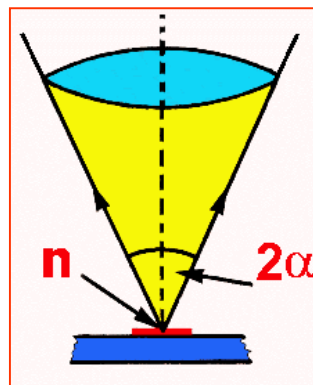


Figure 4 : l'ouverture numérique

$$O.N = n \sin \alpha$$

Cette expression indique la largeur maximale du cône de lumière pénétrant dans la lentille. On peut voir que l'ouverture numérique est directement proportionnelle à l'indice de réfraction n du milieu situé entre l'échantillon et la lentille de l'objectif (fig.4).

Pouvoir séparateur- Résolution

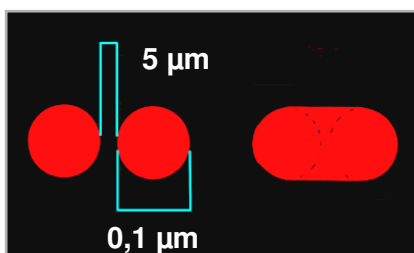
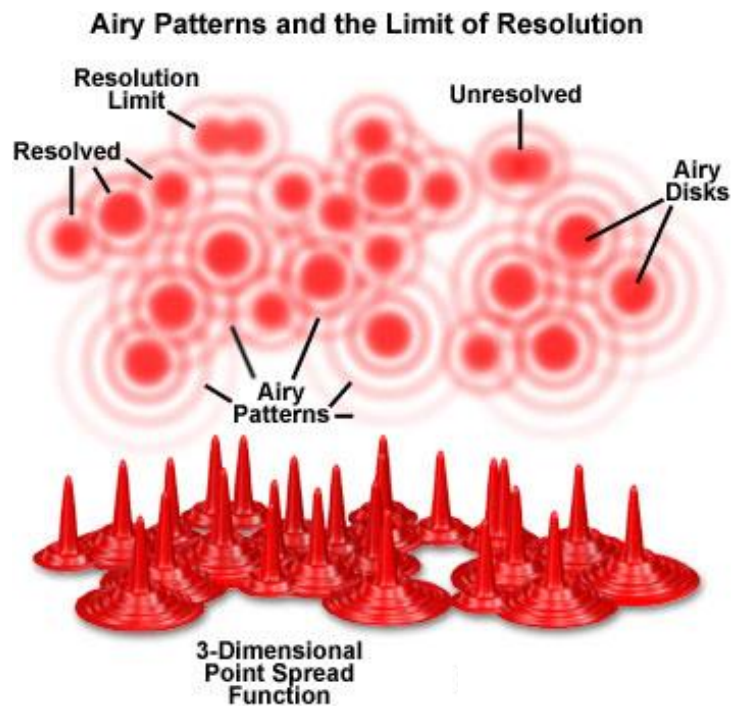


Figure 5 : pouvoir séparateur de l'oeil

Le pouvoir séparateur est la capacité de distinguer deux points adjacents comme distincts. L'œil a la capacité de distinguer des particules d'un diamètre pouvant atteindre $0.1 \mu\text{m}$. Toutefois,

elles doivent être séparées entre elles d'une distance d'au moins 5 μm . Le pouvoir séparateur de l'œil est de 5 μm .



L'image reconstruite à travers le microscope après illumination n'est pas constituée de points mais de figures circulaires de diffraction (figure ci-contre). La région comportant 84 % de l'énergie lumineuse est appelée disque d'Airy.

Le diamètre du disque d'Airy est donné par la relation

$$R_{\text{Airy}} = 1.22 \lambda / O.N.$$

Deux points pour être résolus doivent être séparés par au moins une distance égale au rayon du disque d'Airy

La résolution de l'objectif est donc :

$$R_{\text{obj}} = 0.61 \lambda / O.N.$$

C'est la loi d'Abbe.

La qualité d'un microscope ne dépend pas du grossissement mais du

pouvoir séparateur, c'est-à-dire de la capacité que possède cet instrument pour séparer 2 points voisins. Rien ne sert d'agrandir une image qui serait floue ! Le pouvoir séparateur est inversement proportionnel à l'O. N. et à l'indice de réfraction du milieu, alors qu'il est directement proportionnel à la longueur d'onde de la lumière. Ce n'est pas par hasard si les meilleurs objectifs ont l'ouverture numérique la plus élevée, comme dans le cas des objectifs à immersion.

Pour accroître le pouvoir séparateur on peut faire varier λ , n ou $\sin \alpha$. Pour faire varier α il faut utiliser de courtes focales. Dans ces conditions, on se rapproche de l'objet et intuitivement, on comprend que la lumière sera moins dispersée. On peut aussi faire varier λ . Dans ces conditions, il faut utiliser une lumière monochromatique de courte longueur d'onde. Pour faire varier n , on utilise l'immersion, en général une interface d'huile, autrefois l'huile de cèdre, maintenant une huile synthétique. L'indice à 20°C est fixé à 1.514 par convention.

L'ouverture numérique de 0.90 est difficilement dépassée pour les apochromatiques à sec, c'est-à-dire pour les objectifs dont la lentille frontale est séparée de la lamelle couvre objet par une couche d'air. Les rayons venant de l'objet subissent des réflexions multiples sur la lamelle et ne pénètrent pas dans l'objectif si l'ouverture est supérieure à 1.00.

D'une manière générale le pouvoir séparateur d'un bon microscope se situe aux environs de 0.2 μm

Ex : actuellement sur le marché l'angle moyen des objectifs est de 70° $\sin 70^\circ = 0.94$

- si $\lambda = 450$ et $N = 1$ (air), on a $D = 0.292 \mu\text{m}$
- si immersion $N = 1.5$, on a $D = 0.194 \mu\text{m}$

On ne peut dépasser la valeur de l'O.N. de 1.40, car pour augmenter l'ouverture numérique, l'objectif doit être de plus en plus proche de la surface de l'échantillon et la distance de travail, DT, n'est jamais nulle. L'angle 2α maximum (180°) est formé lorsque la lentille frontale touche l'échantillon, or ceci est bien sûr irréalisable.

On peut abaisser le pouvoir de résolution avec des artifices informatiques, ce n'est plus de l'observation directe mais de la reconstitution.

Ex marquage avec de billes d'or de 5 nm (point brillant). On calcule la séparation de 2 points connaissant le diamètre de la bille.

La correction

Les objectifs ACHROMATIQUES sont corrigés de sorte que deux longueurs d'onde, généralement le vert et le rouge, soient focalisées. C'est la raison pour laquelle, lorsque l'on utilise deux objectifs, un filtre vert se révèle utile, rendant monochromatique la lumière pour laquelle l'objectif a été corrigé.

Les objectifs en FLUORITE permettent une meilleure correction, rapprochant de plus en plus les points de focalisation des rayons avec diverses couleurs, mais les objectifs APOCHROMATIQUES restent les meilleurs de tous, car ils sont corrigés pour trois longueurs d'ondes : le vert, le rouge et le bleu.

Les objectifs achromatiques ne portent aucune indication sur leur corps, alors que les objectifs en fluorite portent le marquage F ou FL, voire FLUOR (ce qui ne signifie pas qu'ils conviennent à la fluorescence, même s'ils peuvent effectivement être utilisés dans ce cas), et les objectifs apochromatiques portent l'indication APOCHROMATIQUE.

En microphotographie, la COURBURE DE CHAMP est très importante, l'image d'objets plats tels qu'une section histologique, étant reproduite sous forme concave ou convexe, c'est-à-dire non focalisée au centre et sur les côtés. Les objectifs corrigés pour la courbure de champ sont dits PLANS et portent l'indication PLAN sur leur corps.

Le condenseur

Dans un microscope droit, le condenseur est situé sous la platine du microscope. Le condenseur recueille, ou "condense", le cône de lumière provenant de l'éclairage sur le plan de l'échantillon et de là envoie le faisceau vers le plan focal arrière de l'objectif. La hauteur du condenseur doit être réglée avec exactitude, sinon des distorsions chromatiques apparaissent et on observe une perte de netteté. C'est la seule pièce du microscope permettant un centrage. Le condenseur doit être centré avec exactitude, sinon l'éclairage du champ n'est pas homogène.

Le condenseur sert à réaliser l'éclairage dit de Köhler. La méthode dite "méthode de Köhler" est un moyen simple et pratique de régler l'éclairage du microscope défini par August Köhler, un spécialiste allemand des microscopes. Cette méthode présente plusieurs avantages pratiques :

1. Reproductibilité des conditions d'observation;
2. Répartition homogène de la lumière dans le champ;
3. Exploitation maximale de l'O. N. de l'objectif;
4. Elimination à la fois des rayons marginaux et de la lumière diffusée qui entraînent une réduction de la qualité de l'image.

C'est un système optique que l'on doit soigner. L'ouverture numérique du condenseur doit être en rapport avec l'ouverture numérique de l'objectif.

Les oculaires.

Les oculaires non seulement grossissent l'image intermédiaire fournie par l'objectif, mais ils peuvent aussi corriger certaines aberrations, comme les aberrations chromatiques de grossissement (oculaires compensateurs). Il ne faut pas que l'oculaire détériore la qualité de l'image fournie par l'objectif.

Préparation de l'échantillon.

Dans la plupart des cas nous observons des cellules tuées, fixées. La fixation a pour but de rendre les composés insolubles et résistants aux traitements ultérieurs. Une bonne fixation doit en quelque sorte immobiliser la cellule dans un état donné à un instant T sans faire apparaître d'artéfacts. Le fixateur le plus employé est le mélange formaldéhyde-alcool. On obtient une dénaturation des protéines et des acides nucléiques conduisant à une réticulation des groupes amines par liaisons covalentes. Le fixateur stabilise les accolements protéines-protéine, protéines-acides nucléiques en les rendant insolubles. Les préparations sont, ensuite incluses dans la résine ou la paraffine et coupées en tranches de quelques μm d'épaisseur.

Contraste

Le pouvoir de résolution du microscope on l'a vu est de $0.2 \mu\text{m}$ ceci devrait permettre de voir des organites comme les mitochondries qui mesurent $1 \mu\text{m}$. Mais la plupart du temps les constituants sont transparents c'est à dire qu'il absorbent la lumière de la même manière que les autres constituants. Pour les mettre en évidence il faut utiliser des techniques de contrastes.

La méthode la plus simple est la coloration. Des substances chimiques se fixent sur des structures particulières pour réaliser des complexes colorés avec les Protéines, acides nucléiques etc.

Si on veut travailler sur du vivant, on peut aussi utiliser des artifices optiques.

- fond noir.
- Contraste de phase
- Nomarski (contraste interférentiel)

Le fond noir

La microscopie à fond noir révèle la présence, mais pas la structure, d'échantillons qui sont invisibles en fond clair, car ils sont transparents ou au-dessous du pouvoir de séparation du microscope.

Le contraste de phase

C'est Zernicke en 1938 qui a inventé le contraste de phase (prix Nobel). Les objets à observer sont très fins et transparents et souvent invisibles. Néanmoins, la lumière qui est renvoyée par l'échantillon, même s'il est invisible à l'œil nu, contient son image. Dans ce système le degré de luminance dépend de l'indice de réfraction des organites. De très faibles variations d'indices vont permettre de mettre en évidence les composés grâce à un système de déphasage entre lumière transmise et lumière diffractée.

Le contraste interférentiel

Le microscope à contraste interférentiel différentiel (DIC), inventé par NOMARSKI, est basé sur l'interférence de deux rayons lumineux polarisés dans des plans perpendiculaires. Il permet d'augmenter le contraste des objets de phase et ainsi de les rendre visibles.