

LE MICROSCOPE OPTIQUE

CLAUDE GONON MICROSCOPIE

www.cgmicroscopie.jimdo.com

D'après Jean-Pierre Armand

INTRODUCTION A LA MICROSCOPIE OPTIQUE

ORIGINE DU NOM

- Le mot microscope vient du grec "mikro" qui signifie petit et de "scope" qui veut dire j'examine.
- Le premier microscope a été fabriqué en 1590 par le hollandais JANSSEN qui mérite toute notre admiration.

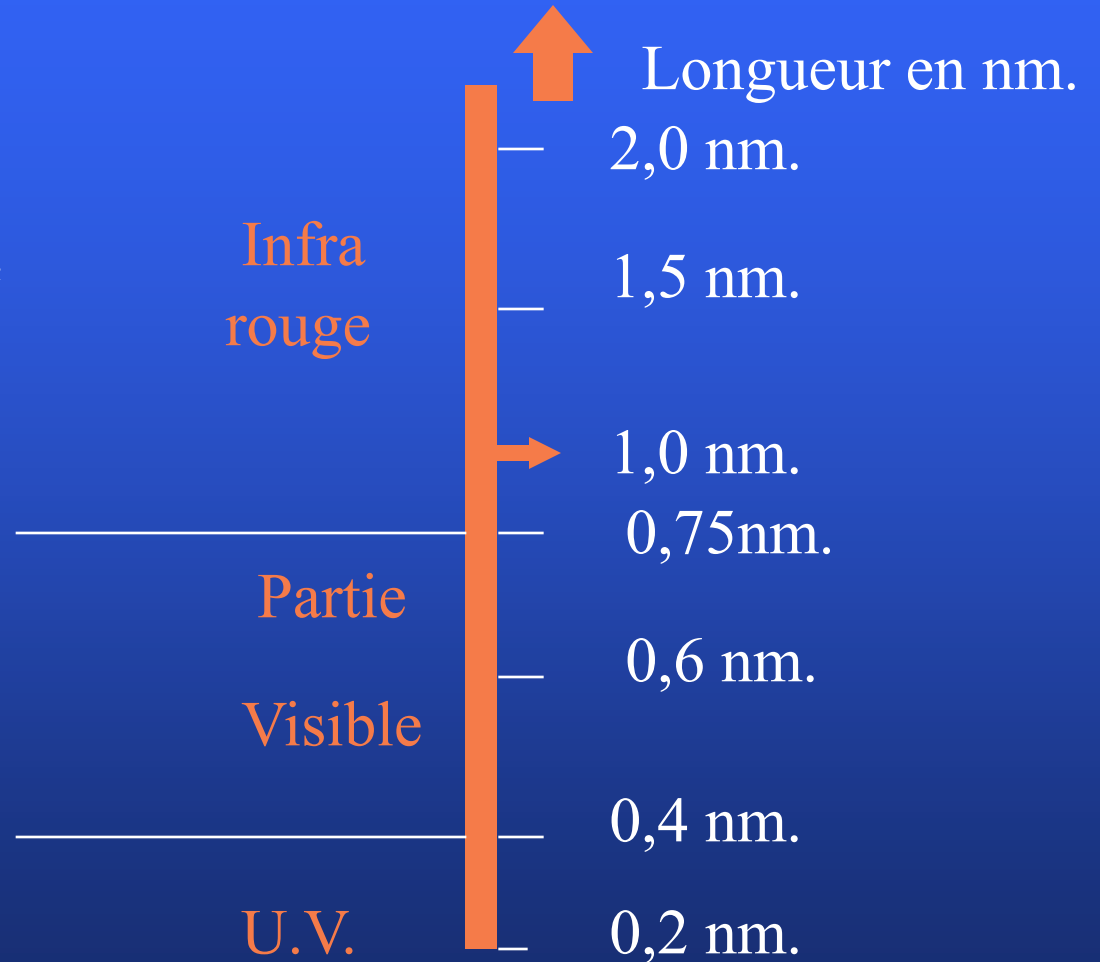
LE PRINCIPE DE BASE

- Le principe de base de la microscopie est simple. Les propriétés d'un faisceau de lumière sont modifiées lorsqu'il traverse un échantillon. Ces modifications contiennent des informations spécifiques de l'échantillon. Les lentilles des objectifs intégrés au microscope permettent l'amplification et la transformation de ces informations en une image visible à l'oeil.
- La taille des objets que l'on peut observer est limité à la longueur d'onde de la lumière visible qui est de 0,4 micron (violet) et ce, quel que soit l'agrandissement de l'objet.

LA LONGUEUR D'ONDE

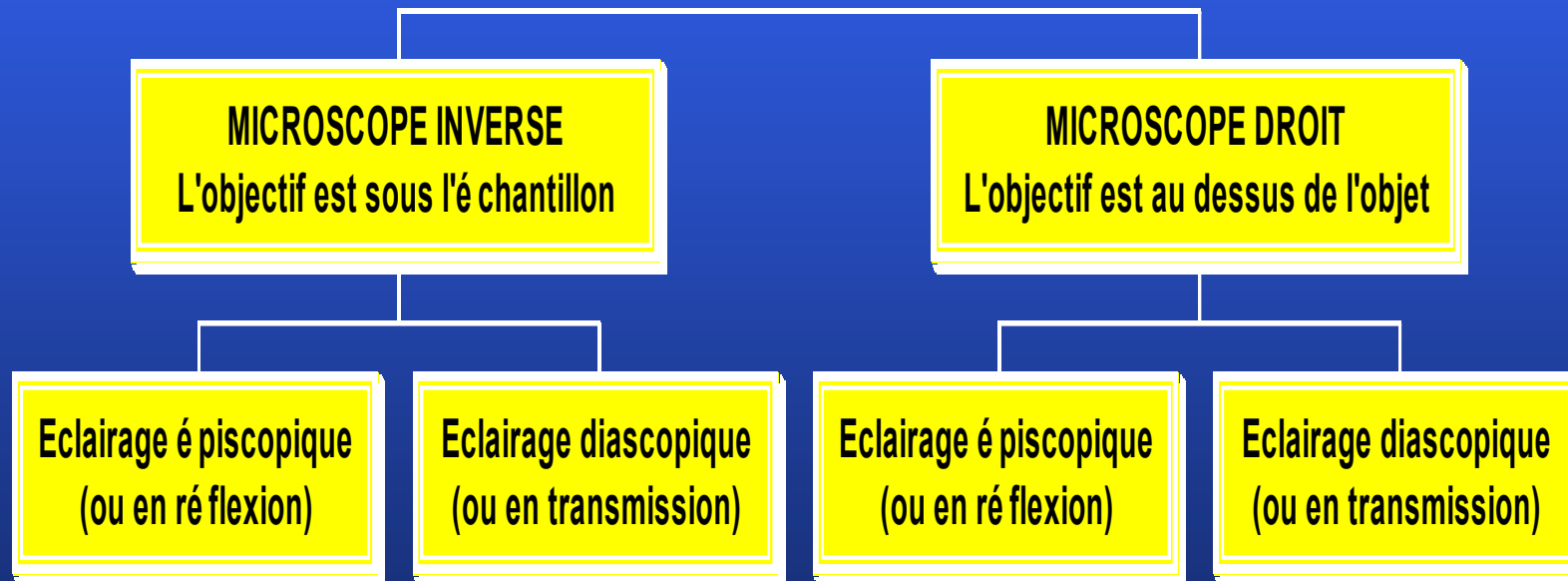
- Le dictionnaire nous dit :
Distance entre deux points consécutifs de même phase d'un mouvement ondulatoire qui se propage en ligne droite.

rouge
jaune
vert
bleu
violet

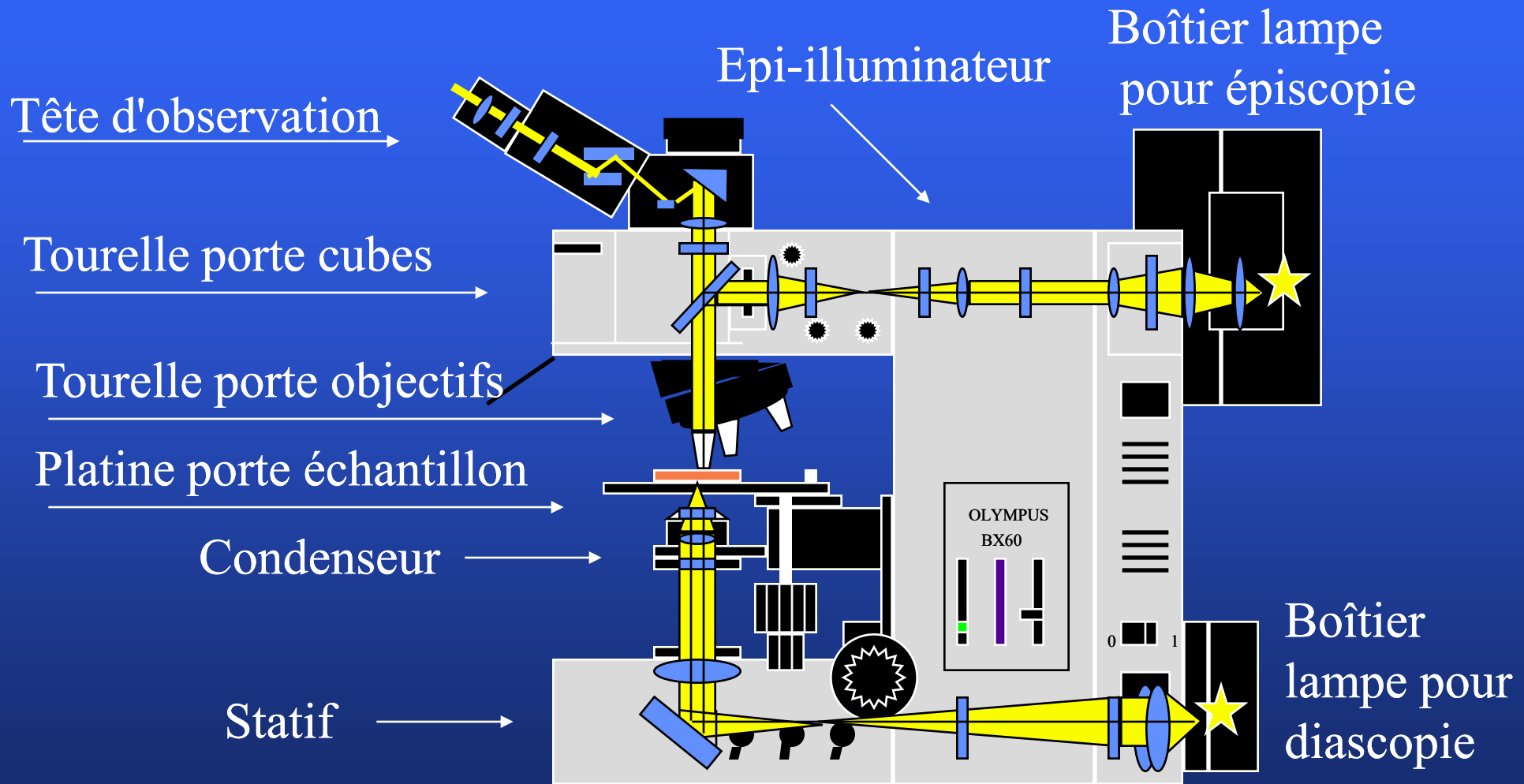


STRUCTURE D'UN MICROSCOPE

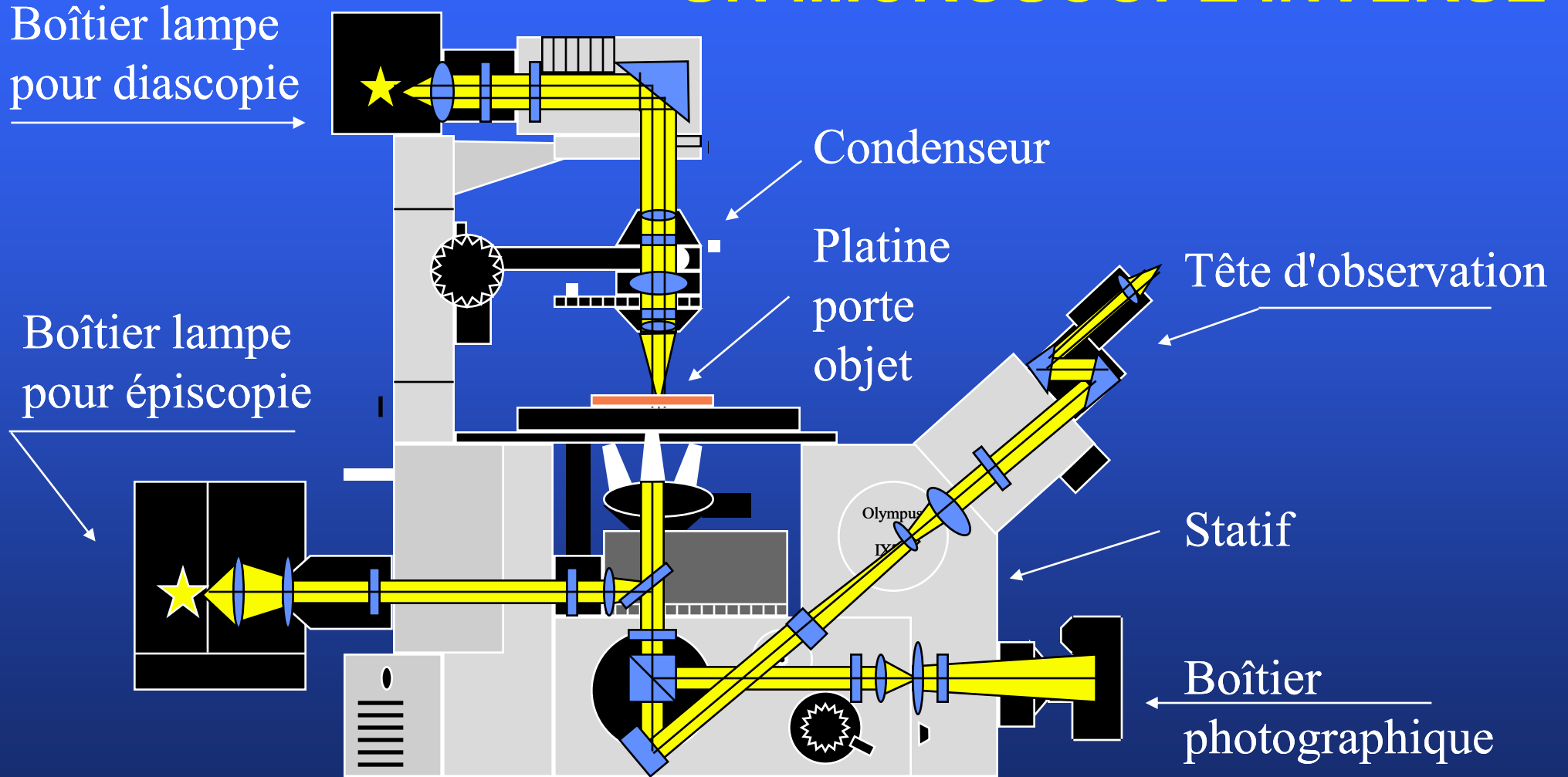
- Il existe deux structures mécaniques et deux modes d'éclairage.



TRAJET OPTIQUE DANS UN MICROSCOPE DROIT



TRAJET OPTIQUE DANS UN MICROSCOPE INVERSE



LES MODES D'OBSERVATION

- LE FOND CLAIR : Le plus courant. Eclairage coaxial qui permet le contrôle des motifs et restitue les couleurs.
- LA LUMIERE POLARISEE: Permet le contrôle de la biréfringence des substances.
- LE CONTRASTE DE PHASE : Il permet l'observation de coupes non colorées
- LE FOND NOIR : Eclairage rasant. Il permet le contrôle des contours.
- LE CONTRASTE INTERFERENTIEL : Il permet de connaître le relief de surface des échantillons.

- **L'EPIFLUORESCENCE** : Ce mode permet d'observer et de localiser des substances organiques qui fluorescent sous des longueurs d'ondes définies.
- **L'INFRA ROUGE** : L'observation se fait à l'aide de caméra dans des longueurs d'ondes qui ne sont plus visible à l'oeil.
- **LE CONFOCAL** : La lumière est focalisée sur une très petite zone d'un plan donné de l'échantillon. On évite ainsi beaucoup de diffraction. Un système de balayage permet de reconstituer l'image sur une surface correcte.

LE FOND NOIR

- Cette technique est utilisée pour l'observation d'échantillons non colorés
- Elle consiste à éclairer latéralement l'objet qui apparaît alors lumineux sur un fond sombre.
- Il est nécessaire que l'indice de diffraction de l'objet soit différent de l'environnement.
- Image très contrastée.
- Elle nécessite un accessoire complémentaire dans le condenseur ou l'illuminateur (si on est en réflexion) pour permettre un éclairage parfaitement réparti
- En épiscopie des objectifs particuliers sont également nécessaires.

LA LUMIERE POLARISEE

- Cette technique est basé sur les propriétés de certains échantillons anisotropes ou biréfringents. (minéraux, vitamines, chlorophylle, collagène...) Ils apparaissent (en blanc ou en couleur) sur un fond noir
- Ce mode d'observation est très utilisé en géologie, pour l'étude des muscles, des membranes cellulaires,...
- Elle demande un polariseur et un analyseur pouvant tourner l'un par rapport à l'autre
- Ce sont deux filtres de même nature. Le polariseur est placé entre le boîtier lampe et l'objet. L'analyseur est placé après l'objectif sur le trajet de retour.

LE CONTRASTE DE PHASE

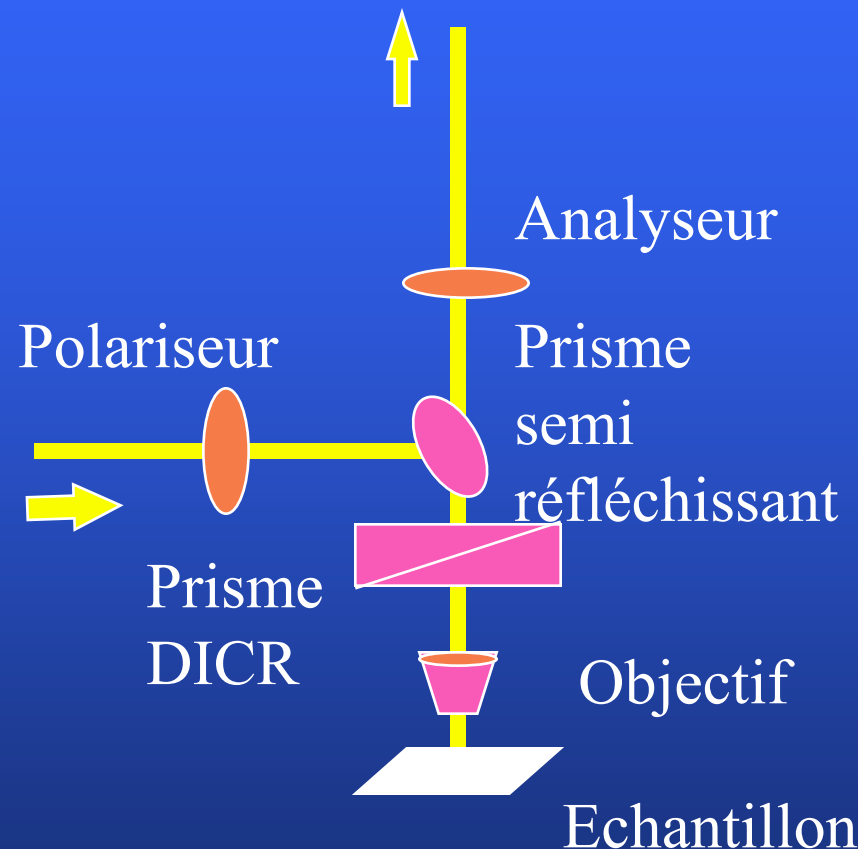
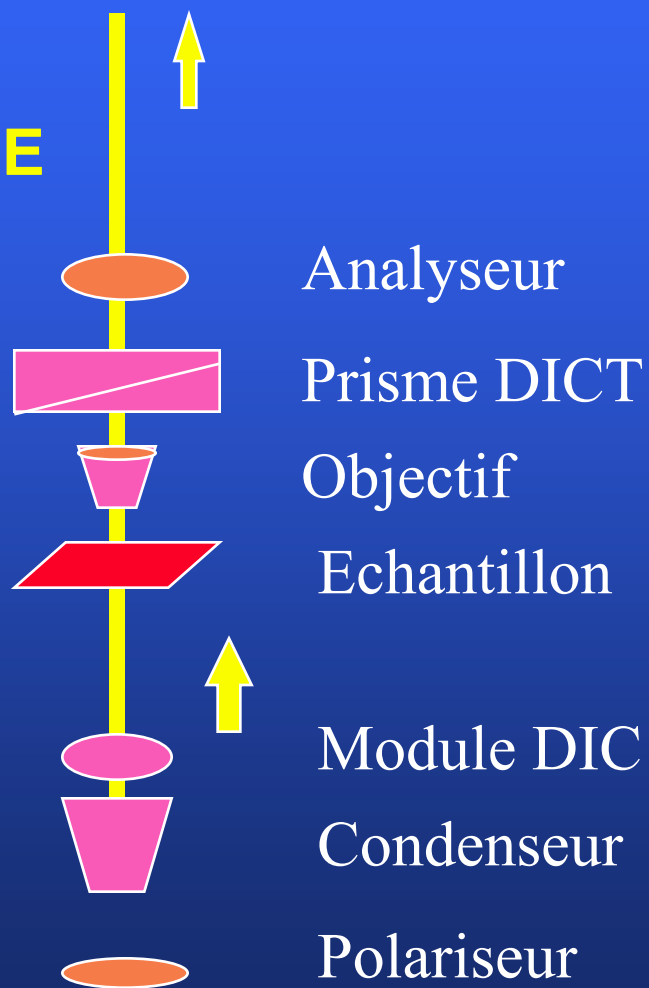
- Inventé en 1932 par Zernicke. cette méthode exploite les différences d'indice de réfraction et d'épaisseur d'un échantillon qui retardent plus ou moins la lumière.
- Permet l'observation de coupes ou cellules non colorées.
- L'inconvénient, est la formation d'un halo lumineux autour des composants peu réfléchissants.
- Le microscope doit avoir un condenseur capable de recevoir des anneaux de phase centrables.
- L'utilisation d'objectifs particuliers avec un anneau de métallisation est nécessaire.

LE CONTRASTE INTERFERENTIEL

- 1952 : M. Nomarski (français) dépose le brevet.
- Le contraste interférentiel sépare complètement les rayons lumineux directs et réfractés.
- Cette méthode évite la formation du halo constaté en contraste de phase et donne une idée du relief de surface de l'échantillon.
- Nécessité de polariser la lumière avec un polariseur et un analyseur croisé.
- Montage d'un prisme de Nomarski
- Utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique
- Utilisation d'un condenseur adapté pour recevoir les modules nécessaires.

LE CONTRASTE INTERFERENTIEL

**EN
DIASCOPIE**



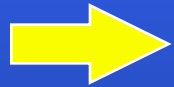
EN EPISCOPIE

L'EPIFLUORESCENCE

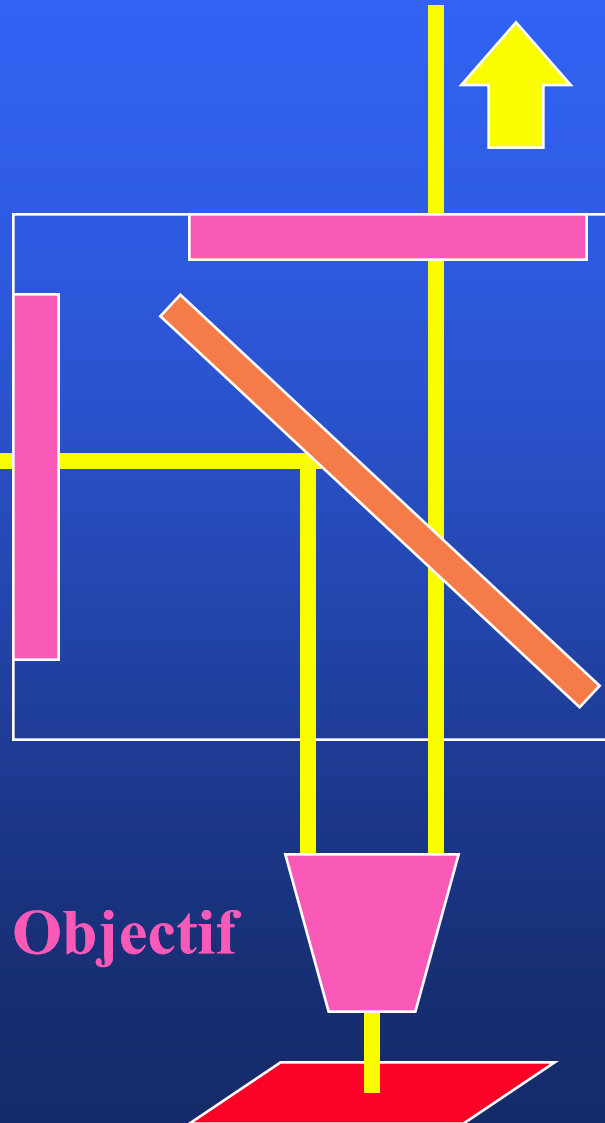
- On utilise la fluorescence naturelle de certaines substances (autofluorescence) ou une fluorescence induite par interaction chimique (marqueurs).
- Elle permet de localiser certaines molécules ou de composants cellulaires
- Le phénomène est éphémère.
- Il est possible de combiner plusieurs fluorescences.
- Le microscope doit disposer d'un éclairage très puissant (lampe à vapeur de mercure)
- Les objectifs doivent être très lumineux
- Nécessité d'intercaler sur le trajet optique :
 - un filtre d'émission,
 - un miroir dichroïque
 - un filtre d'arrêt

L'EPIFLUORESCENCE : EXEMPLE

**Lumière blanche
Grande puissance
(Lampe Vapeur Mercure)**



Filtre à l'excitation :
ne laisse passer que
les longueurs d'onde
460 - 490 nm. (bleu)



Filtre d'arrêt :
supprime les signaux
indésirables.
BP 515 à 550 nm.

Miroir dichroïque :
réfléchi la lumière
inférieure à 510 nm.
et laisse passer tout
ce qui est supérieur.

Objectif

**L'échantillon fluoresce
et émet à 520 nm.**

L'OBSERVATION

UNE EVIDENCE

Il est quelques fois bon de rappeler des évidences.

Un très bon microscope, même très bien réglé ne pourra rendre une bonne image que si l'échantillon placé sur sa platine a été parfaitement préparé.

NE L'OUBLIEZ JAMAIS

LA TERMINOLOGIE

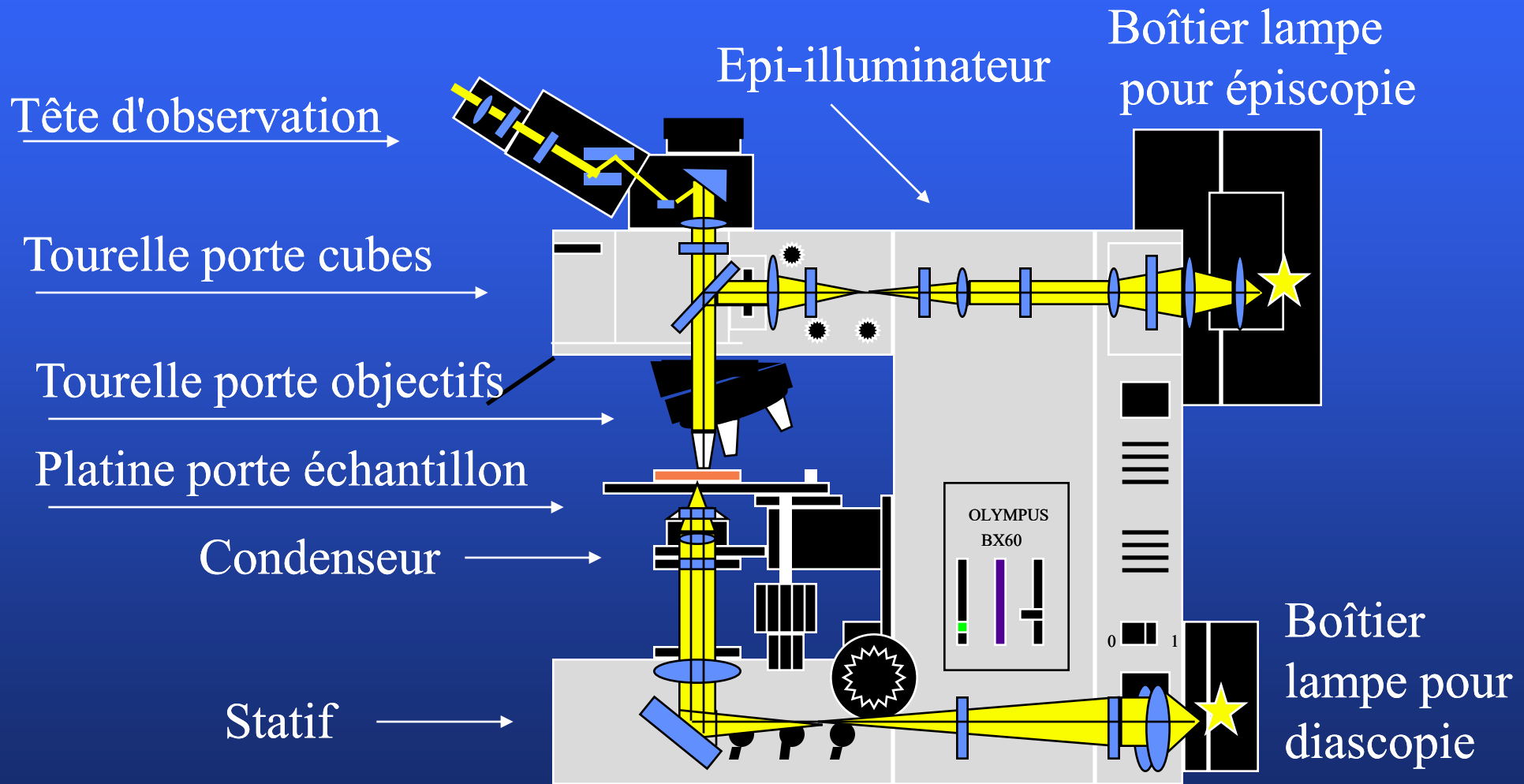
- **LE STATIF** : C'est la pièce maîtresse. Le support mécanique. Il doit être d'une grande stabilité. Il reçoit le système de mise au point, le support platine et conditionne l'ergonomie générale de l'appareil.
- **LE BOITIER LAMPE** : Il doit être sécurisé et faciliter le remplacement de la lampe. Il peut utiliser des lampes tungstène, halogène, led , xénon ou à vapeur de mercure.
- **LA PLATINE** : Elle a la tâche de recevoir l'échantillon. Ses dimensions doivent être adaptées au travail et elle doit être très résistante à l'abrasion. Sa mécanique doit aussi être soignée et résistante car elle est toujours l'élément le plus sollicité du microscope.

- **LA TOURELLE** : Elle reçoit les objectifs. Sa capacité peut varier selon les modes d'observation. Dans certains cas elle peut être centrable , voire motorisée.
- **L'ILLUMINATEUR** : Utilisé pour l'épiscopie. il permet d'amener la lumière sur l'échantillon dans les meilleures conditions possibles. Il comporte un ou deux diaphragmes.
- **LE CONDENSEUR** : Utilisé pour la diascopie. Comme l'illuminateur il sert à éclairer l'échantillon. Son bon réglage est très important. Ses caractéristiques sont liées au mode d'observation (fond clair, fond noir, contraste de phase, etc)
- **LE TUBE D'OBSERVATION** : Fixe ou orientable. Il est binoculaire ou trinoculaire (photo ou vidéo). Il reçoit les oculaires et se caractérise par son indice de champ.


- **L'OBJECTIF** : L'élément essentiel pour le résultat final. Son grossissement peut varier de 1,25 à 250 fois. Un même microscope peut recevoir plusieurs centaines d'objectifs différents. Le choix se fait en fonction du mode d'observation, du grossissement, de l'ouverture numérique, de la distance frontale et aussi (il faut bien l'avouer) du prix.
- **LES OCULAIRES** : Ils se montent sur le tube d'observation. Ils permettent l'exploitation de l'image par un grandissement de 8 à 15 fois. Ils se caractérisent aussi par leur indice de champ.
- **LE DIAPHRAGME DE CHAMP** : Situé dans l'illuminateur (en épiscopie) ou à la base du statif (en diascopie) il permet de cerner le champ éclairé sur l'échantillon.

- **LE DIAPHRAGME D'OUVERTURE** : Il est situé sur l'illuminateur en épiscopie ou sur le condenseur en diascopie. Son ajustement est lié à l'objectif utilisé et est **TRES IMPORTANT** pour obtenir une bonne image. Il permet de compenser le manque de profondeur de champ de certains objectifs. A signaler que certains objectifs intègrent un diaphragme à iris assimilable à un diaphragme d'ouverture.

TRAJET OPTIQUE DANS UN MICROSCOPE DROIT



LES NOTIONS DE BASE




■
L'ouverture
Numérique
d'un Objectif

Caractéristique principale d'un objectif. Elle agit directement sur la résolution et la profondeur de champ.

Elle dépend de l'indice de réfraction du milieu séparant l'objectif de l'objet (air, eau ou huile)

- La formule est : $O.N. = I_r \times \sin a$
 I_r = indice de réfraction (1 pour l'air et 1,5 pour l'huile)

a = la moitié de l'angle d'ouverture du cône de rayons captés par l'objectif. Cet angle augmente avec le grossissement et est voisin de 70° pour un objectif de 100 fois.



**Le Pouvoir
séparateur
(ou pouvoir
de résolution)**

Il s'agit de la capacité, pour un système optique, à séparer deux points distinctement.

Cette résolution dépend de la longueur d'onde de la lumière utilisée et de l'ouverture numérique de l'objectif.

-
La formule est : $R = 0,61 \times (L/O.N.)$

R = résolution

L = Longueur d'onde de la lumière utilisée

O.N.= Ouverture numérique de l'objectif



La profondeur
de champ

Troisième notion fondamentale :

Il s'agit de la profondeur (en micron) pour laquelle un système optique fournit une image nette.

Cette profondeur de champ diminue avec le grossissement et l'ouverture numérique de l'objectif.

Elle est aussi dépendante de l'indice du milieu (air, eau, huile) et du grandissement des oculaires.

TABLEAU RECAPITULATIF

GROSSISSEMENTS, RESOLUTIONS ET PROFONDEURS DE CHAMP

Gross. Obj. x Ocul.	Ouverture numérique	Prof. de champ	Résolution
2 x 10 = 20	0,08	300 microns	4,0 microns
4 x 10 = 40	0,13	70 microns	2,5 microns
10 x 10 = 100	0,30	16 microns	1,1 micron
20 x 10 = 200	0,50	6 microns	0,7 micron
40 x 10 = 400	0,75	1 micron	0,4 micron
100 x 10 = 1000	1,30	0,5 micron	0,25 micron



**Grossissement
et
grandissement**

Il faut savoir que dans un microscope optique, les oculaires ne servent qu'à grandir l'image pour la rendre exploitable par l'œil mais qu'ils n'apportent rien au pouvoir séparateur.

En pratique, un objectif est exploitable jusqu'à 1000 fois son ouverture numérique. Des oculaires 15 ou 20 x associés à un objectif 10 peuvent parfois apporter un certain confort d'observation, mais n'enrichissent pas l'observation avec un objectif 100.

En revanche, ils réduisent le diamètre du champ observé, la profondeur de champ, et augmentent nettement l'impression de flou.



La distance
frontale

Il s'agit simplement de la distance qui sépare l'objet observé de la lentille frontale de l'objectif.

Les objectifs de fort grossissement et de grande ouverture numérique ont des distances frontales très faibles (de 1 à 3 dixième de mm.)



Aberrations

Dans un système optique, il y a des aberrations géométriques (déformation d'images) et des aberration chromatiques (non respect des couleurs).

Ce sont les objectifs qui corrigent ces défauts.

Il existe différentes catégories (achromatiques, plan achromatiques, plan fluorite, plan apochromatique) qui seront choisies en fonction de l'usage de l'appareil et du mode d'observation. (les plus chers ne sont pas toujours les meilleurs)



Champ d'observation

Il s'agit du diamètre de la surface observée à l'oculaire.

Il est égal à l'indice de champ divisé par le grossissement de l'objectif.

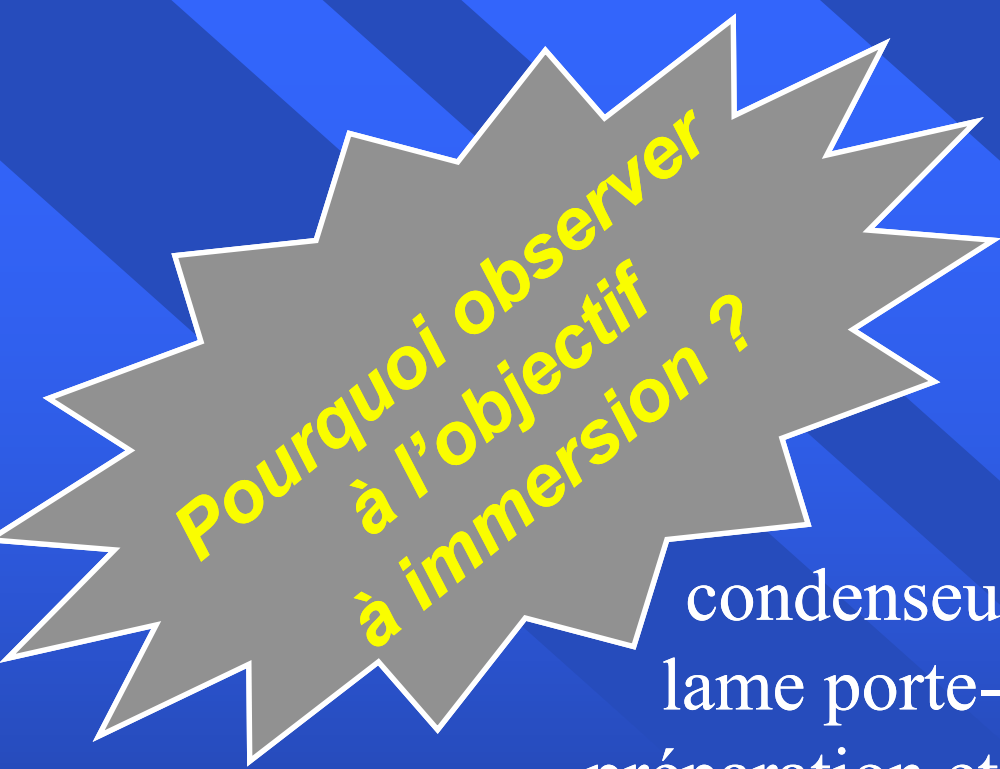
L'indice de champ IC est une valeur exprimée en mm. qui est propre à chaque microscope. Elle est la conséquence du choix des oculaires et de la tête d'observation. Les microscopes récents ont des indices de champ supérieur à 20 mm. Donc $\emptyset = IC / x \text{ obj}$

- Par exemple, le diamètre observé avec un objectif 10x sera ici de 2 mm ($20/10=2\text{mm}$).



Température de couleur

Une couleur est caractérisée par sa température qui est exprimée en degré Kelvin. La lumière du jour est à 5400°K , une lampe halogène donne une lumière jaune à 3200°K . Des filtres permettent de compenser cet écart pour pouvoir regarder l'échantillon avec des couleurs naturelles (filtre bleu). Ceci est très important en microphotographie si l'on veut obtenir un rendu exact des couleurs.



Principe : la lumière qui sort du condenseur doit traverser une couche d'air, une lame porte-objet, le milieu dans lequel baigne la préparation et une lame couvre objet.

Ce parcours entraîne des distorsions optiques que l'immersion élimine largement, car l'huile possède un indice de réfraction nettement supérieur à l'air.

En outre, l'objectif à immersion a un pouvoir de résolution plus grand (0,35 pour l'objectif 10 x à 1,3 pour l'objectif à immersion de 100 x).

LES REGLAGES

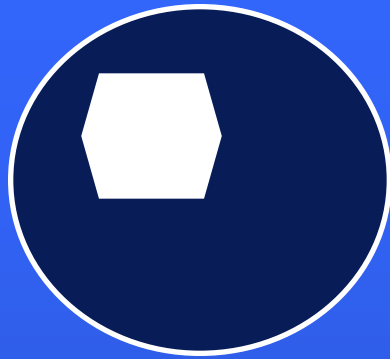
Dès que l'on s'installe devant un microscope un certain nombre de gestes sont à faire systématiquement.

Ces gestes doivent devenir des réflexes.

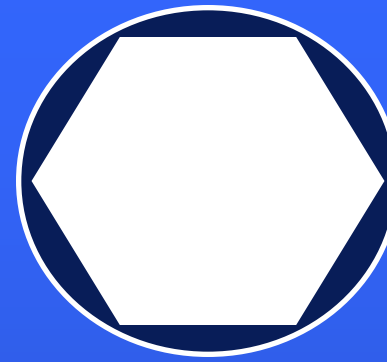
LE RESPECT DE CES REGLES EST CAPITAL POUR
PRESERVER L'HYGIENE DE VOTRE VUE ET
OPTIMISER LES IMAGES.

LA BONNE CONDUITE

- La première chose est d'être correctement installé et de prendre le temps nécessaire au réglage de son siège.
- La deuxième est de faire une première mise au point succincte.
- La troisième est de régler immédiatement l'écart inter pupillaire des oculaires. L'image que reçoit l'oeil droit doit être parfaitement superposée à celle que reçoit l'oeil gauche.
- La quatrième, (extrêmement importante) est de faire sa correction dioptrique. Pour cela, on doit faire une mise au point fine sur l'oculaire fixe avant de vérifier et de corriger la netteté sur le deuxième oculaire qui est réglable. SUR UN MICROSCOPE, IL EST INDISPENSABLE QUE LES IMAGES PERCUES PAR CHAQUE OEIL SOIENT NETTES.



Le diaphragme est net mais pas correctement centré



La bonne position

- La cinquième opération est de centrer le diaphragme de champ. (réglage de Köhler.) En épiscopie, il suffit d'utiliser les vis de réglage mais en diascopie, il faut d'abord rechercher la netteté de ce diaphragme. Il faut, pour cela, trouver la bonne position (en z) du condenseur avant de centrer ce dernier. Ceci fait, on se positionne sur le plus faible des objectifs et on ouvre le diaphragme de champ jusqu'à ne plus le voir.

Pour les microscopes simples, il n'y a plus qu'à travailler après avoir vérifié la présence du filtre "lumière du jour" et en ajustant le diaphragme d'ouverture à chaque changement d'objectif.

(TRES IMPORTANT POUR OPTIMISER L'IMAGE.)

Mais, pour certains appareils il est encore nécessaire de faire des réglages complémentaires.

- La lumière polarisée : Il est nécessaire de vérifier la présence des deux filtres et de les faire tourner l'un par rapport à l'autre pour obtenir l'extinction de la lumière.
- Le contraste interférentiel : Il faut polariser la lumière avant de mettre en place le module lié à l'objectif et le prisme de contraste. On fera varier ce contraste en avançant ou reculant le prisme.

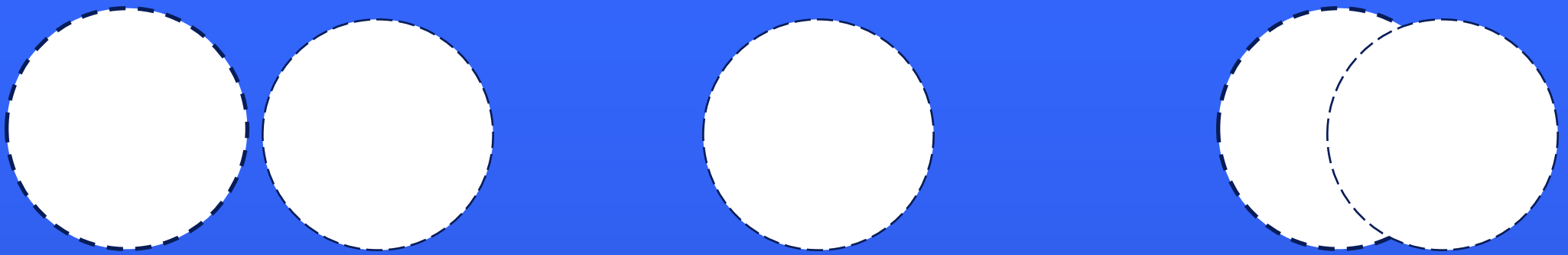


Les anneaux lumineux du condenseur ne sont pas correctement centrés



La bonne position

- Le contraste de phase nécessite le centrage des anneaux de lumière situés dans le condenseur avec les anneaux de métallisation fixes qui se trouvent dans les objectifs

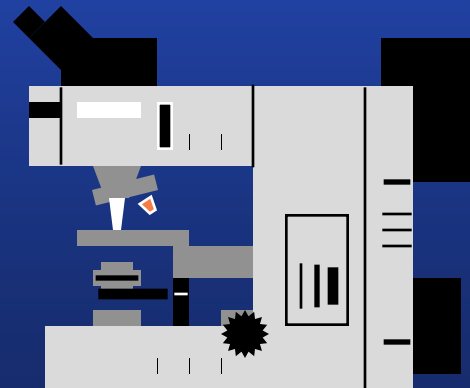


Mauvaises positions

Bonne position

- Centrage de la lampe : Les microscopes équipés en épiscopie et particulièrement les appareils utilisant des lampes à vapeur de mercure (épi-fluorescence) demande un centrage rigoureux de la lampe. Il faut que le spot de lumière renvoyé par le miroir du boîtier soit identique à celui envoyé directement par le filament (ou l'arc). Il ne faut, ensuite que le superposer partiellement pour ne pas surchauffer la lampe. Ne pas oublier qu'une lampe HBO peut exploser et qu'elle doit être remplacée toutes les 100 heures (HBO 50w) ou 300 heures (HBO 100w).

**ET MAINTENANT, TOUS
SUR LE MICROSCOPE**





L'IMAGERIE

LES DIFFERENTES MANIERES D'EDITER UN DOCUMENT A PARTIR D'UN MICROSCOPE

- Le 24x36, le Polaroid et le plan film grand format donnaient des photographies de grande qualité, mais ont été abandonnés.
- L'impression thermique à partir d'une caméra analogique.

Aujourd'hui sont utilisés :

- la photographie numérique sur papier qualité photo.
- Le stockage sur ordinateur à partir d'une caméra numérique.
- La vidéo à partir d'une caméra numérique sur un ordinateur.
- L'analyse d'images sur ordinateur à l'aide de logiciels spécifiques.

LES PIEGES DE L'IMAGERIE

- Pour réaliser une bonne image sur un microscope, il faut d'abord prendre son temps et être conscient que les images ne pourront être réussies que si :
 - 1 - Le microscope est parfaitement réglé.
 - 2 - La mise au point est correctement faite.
 - 3 - Les filtres de couleur sont bien utilisés.
 - 4 – La balance des blancs (WB) bien équilibrée.
- Pour retrouver des couleurs exactes, il faut utiliser un filtre bleu et augmenter la tension de lampe aux $\frac{3}{4}$ de l'éclairage maxi.
Rajouter alors les filtres gris pour réduire l'intensité lumineuse.
- Pour le noir et blanc un filtre vert augmentera les contrastes.

L'ENTRETIEN DU MICROSCOPE

- A chaque utilisation nettoyer à sec les objectifs à immersion.
- Au quotidien : Nettoyer les oculaires à sec avec une petite soufflette et du papier optique.
- Chaque soir recouvrir le microscope avec sa housse
- Chaque semaine : Nettoyer la platine, les oculaires et les lentilles frontales des objectifs à l'aide d'un papier optique imbibé (lunettes)
- Régulièrement vérifier le compteur de la lampe HBO pour ne pas dépasser les 2 ou 300 heures de fonctionnement et s'assurer que l'on a bien en réserve une ou deux lampes.
- Une fois par an : faire réviser l'équipement par un spécialiste.

Merci pour votre attention

CLAUDE GONON MICROSCOPIE

35, allée de la Syrah 83270 St Cyr sur Mer

 04 83 16 36 30 Port. 06 33 15 29 62

Email : gonon.microscopie@sfr.fr