

# Anatomie et fonctionnement du microscope optique

Corentin Spriet, François Waharte.

L'objectif de ce cours est de fournir les bases de la microscopie photonique en s'appuyant sur quelques connaissances simples en optique. La compréhension du fonctionnement du microscope est nécessaire à sa bonne utilisation et à une interprétation correcte des données obtenues avec cet instrument. Ce cours ne prétend pas être exhaustif, il s'agit juste d'une introduction très simplifiée et limitée à la microscopie.

Nous commencerons par aborder quelques généralités sur la lumière elle-même étant donné que le microscope sert seulement à en utiliser les propriétés. Nous verrons ensuite quelques principes d'optique géométrique, puis nous aborderons le microscope en transmission, son principe, les éléments le constituant.

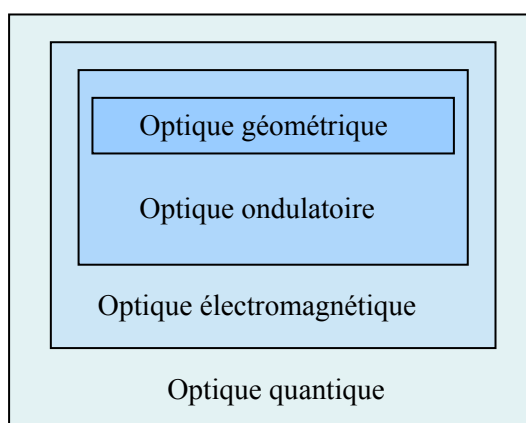
Nous terminerons par l'étude rapide du microscope à fluorescence qui offre des possibilités très intéressantes et qui est la base du microscope confocal.

## Généralités sur la lumière

Afin de mieux comprendre le principe et le fonctionnement d'instruments d'optiques comme le microscope, il est important d'avoir une connaissance plus précise des propriétés de la lumière. Nous allons donc voir quelle est la nature de la lumière, puis les propriétés de la lumière importantes dans le cadre de la microscopie.

### Nature de la lumière

La question de la nature de la lumière a fait l'objet de vives discussions pendant des siècles et a conduit au développement de différentes théories, chaque nouvelle théorie incluant les précédentes (voir figure).



La lumière a d'abord été vue comme un flux s'écoulant selon des lignes droites, les rayons. Cette description, proposée par Kepler au XVII<sup>ème</sup> siècle, a donné naissance à la première théorie de la lumière : *l'optique géométrique*. Selon cette théorie, la lumière se réduit à des rayons qui obéissent à des lois géométriques et dont l'interaction avec la matière est réduite à une unique propriété : *l'indice de réfraction*. Malgré sa simplicité, elle est parfaitement

utilisable pour la conception et la réalisation de nombreux instruments d'optique comme le microscope.

Néanmoins, l'optique géométrique ne dit rien de la nature de la lumière. De plus, certains phénomènes comme la couleur restent inexplicables. Newton en 1704 y répond en proposant que la lumière est composée de particules. Euler, lui, pense que la lumière est une onde qui se propage en ligne droite. Les deux visions ont tour à tour eu la faveur des scientifiques au fil des années suivant leur pertinence pour l'explication de chaque nouvelle propriété de la lumière. Elles se sont perfectionnées en parallèle, mais pourtant, arrivé au XXème siècle, la confusion était totale et l'on se résigna à avoir deux descriptions pour la lumière sans pouvoir trancher pour l'une ou l'autre.

La lumière est donc vue comme une forme d'énergie dont la nature est duale : elle peut être décrite soit comme une onde électromagnétique, soit comme un flux de particules. De façon générale, la description ondulatoire convient bien pour tous les phénomènes ayant trait à la propagation de la lumière et la formation des images. Par contre, lorsqu'il y a une interaction entre la lumière et la matière, la notion de particule, le photon prédit par Einstein, est plus adaptée.

Enfin, Niels Bohr comprit en 1927 que la lumière est *à la fois* onde et particule. C'est donc bien le même phénomène que l'on voit soit comme une particule, soit comme une onde suivant les conditions d'observation.

Cette constatation est à la base d'une nouvelle théorie qui permet une synthèse des deux descriptions : l'électrodynamique quantique. Cette théorie considère que le photon possède une onde associée, comme toute particule selon la théorie quantique.

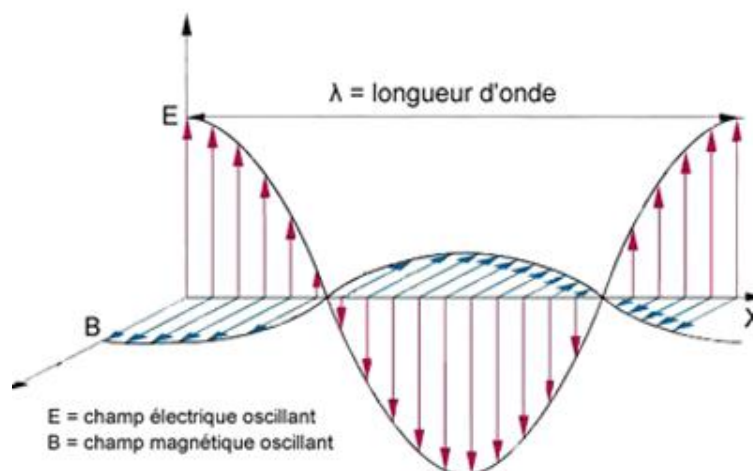
Dans le cadre de la microscopie, on pourra généralement se contenter des lois de l'optique géométrique. En effet, lorsque la longueur d'onde de la lumière (voir plus bas) est beaucoup plus petite (environ 500 nm pour le visible) que la taille des objets qu'elle rencontre (plusieurs mm ou cm), on peut considérer la lumière comme un simple rayon se propageant en ligne droite dans un milieu homogène. L'optique géométrique est donc une approximation de l'optique ondulatoire justifiée la plupart du temps dans le cas du microscope simple que nous allons voir plus loin. Une exception concerne la définition de la résolution optique du microscope qui doit être traité par l'optique ondulatoire. La description corpusculaire sera utile pour comprendre la fluorescence ou le fonctionnement des détecteurs.

## Propriétés de la lumière

La lumière peut donc être décrite comme une onde, un rayon ou un flux de photons suivant le phénomène que l'on veut décrire.

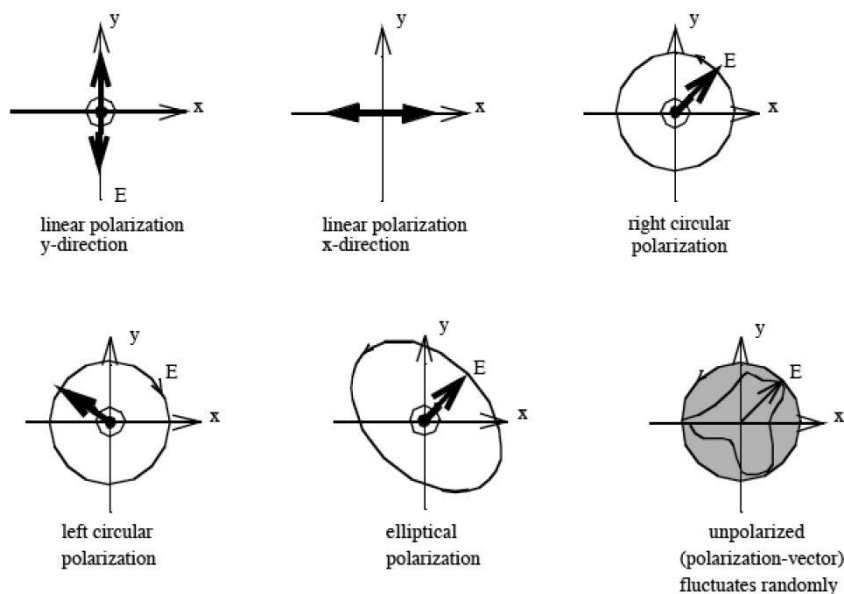
### Propriétés ondulatoires

La lumière possède les propriétés usuelles d'une onde électromagnétique, avec le champ électrique perpendiculaire à l'axe de propagation et au champ magnétique. L'amplitude des deux champs varie (dans un cas simple) comme une sinusoïde. Les propriétés de cette onde sont (voir figure) :



*Structure d'une onde électromagnétique.*

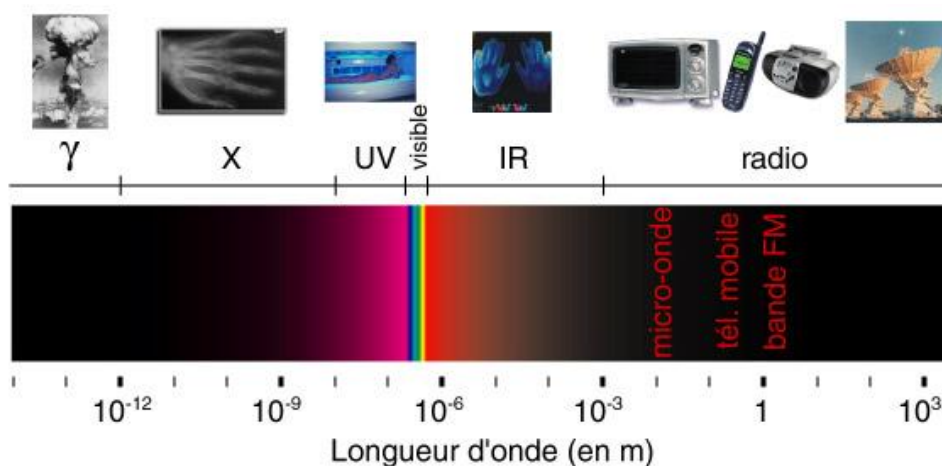
- la longueur d'onde ( $\lambda$ ): c'est la plus petite distance entre deux points de la courbe ayant la même phase (c'est-à-dire la même amplitude) ;
- la vitesse de propagation, notée  $c$  dans le vide. Elle constitue la vitesse limite de tout objet matériel et elle est constante dans le vide quelque soit le référentiel (c'est une des constantes universelles). Sa valeur est de  $2,99792458 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$ , ce qui correspond à un trajet d'environ 7 fois le tour de la Terre en 1 s.
- la polarisation : c'est la façon dont évolue la direction du champ électrique au cours de la propagation. Comme on le voit sur la figure suivante, elle peut être linéaire, circulaire ou aléatoire (dans ce cas, on parle d'onde non-polarisée).



*Les différentes polarisations de la lumière.*

### Spectre de la lumière

Une propriété importante en pratique, notamment en microscopie de fluorescence, est le spectre de la lumière utilisée, c'est-à-dire l'ensemble des longueurs d'onde présentes. Le spectre de la lumière ne se restreint pas au domaine visible mais s'étend des rayonnements gamma aux ondes radios (voir figure).



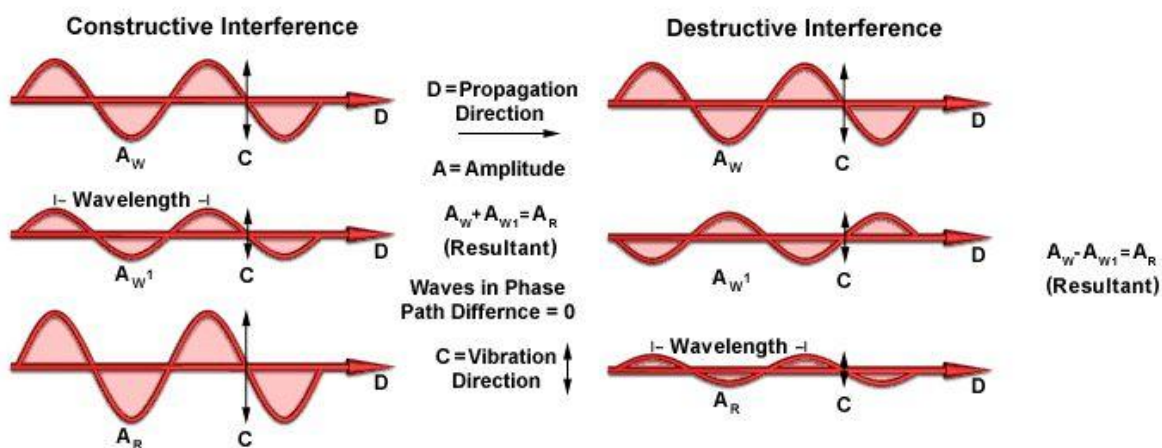
En microscopie, nous nous intéresserons surtout aux longueurs d'onde situées entre les UV (200 nm) et les infrarouges proches (1000 nm).

### Interaction avec la matière

Lors de l'interaction de la lumière avec la matière, le milieu traversé peut être décrit par une propriété unique : l'indice de réfraction, noté  $n$ . La vitesse de la lumière dépend de l'indice pour une longueur d'onde donnée suivant la formule suivante :  $n(\lambda) = c / v(\lambda)$ . L'indice est toujours supérieur ou égal à 1 ( $n = 1,33$  pour l'eau, 1,5 pour le verre).

## Les interférences

C'est un phénomène commun à toutes les ondes. Chaque onde a une phase, c'est-à-dire que le champ électrique est à son maximum à un temps donné, a priori différent pour deux ondes différentes. Si deux ondes se superposent et qu'elles sont de phases identiques, leurs amplitudes vont s'additionner pour créer une onde unique avec une amplitude plus grande : c'est une interférence constructive. À l'inverse, si les deux ondes sont en opposition de phase (l'une est à son maximum quand l'autre est à son minimum), l'onde résultante va avoir une amplitude plus faible, voire nulle : c'est une interférence destructive (voir figure).



## Le phénomène de diffraction

Lorsque la lumière passe par une ouverture assez petite, il se produit un phénomène particulier appelé diffraction. Si l'on place un écran après l'ouverture, on ne verra pas simplement la forme de l'ouverture projetée sur l'écran, mais des franges ou des anneaux clairs et sombres alternés autour de cette projection.

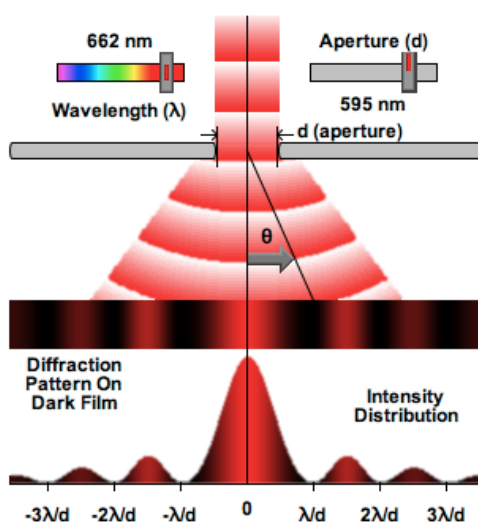


Figure de diffraction de la lumière passant par une fente fine.  
On obtient sur un écran une alternance de bandes claires et noires, centrées sur une bande claire correspondant à la projection de la fente elle-même.

Ceci peut s'expliquer en considérant que la lumière est ré-émise à partir d'une multitude de petites sources au niveau de la fente, avec des phases différentes ce qui produit des

interférences et par conséquent une figure de diffraction comme celle montrée sur la figure ci-dessus.

### **Propriétés photoniques**

Les propriétés que nous utiliserons sont simples. Nous considérerons le photon comme une particule de vitesse  $c$  et d'énergie  $E = h \nu$ , où  $h$  est la constante de Planck ( $6.626\ 0693 \cdot 10^{-34}$  J.s) et  $\nu$  est la fréquence de l'onde associée.

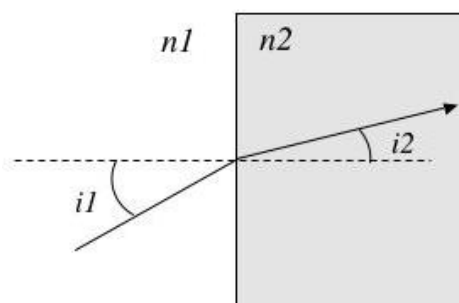
## Bases de l'optique géométrique

Pour bien comprendre le fonctionnement d'un microscope et ses limitations, quelques rappels d'optique géométrique sont nécessaires.

### La réfraction

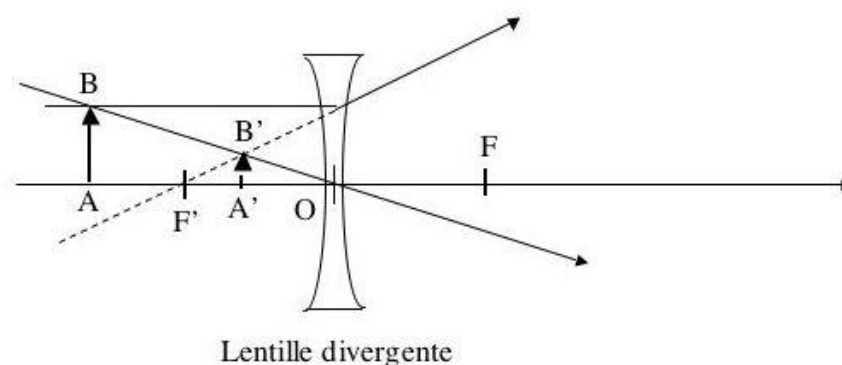
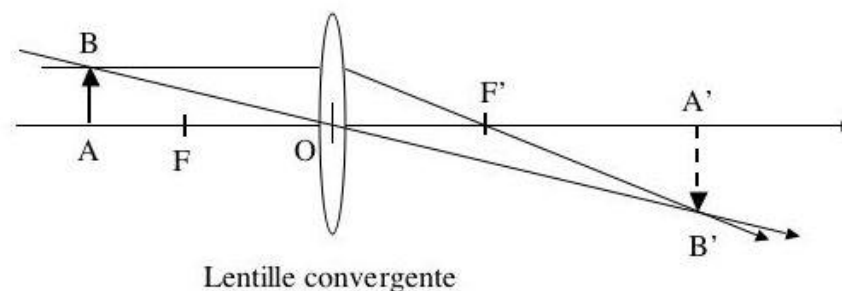
Le phénomène de réfraction apparaît lors du passage de la lumière d'un milieu d'indice  $n1$  dans un milieu d'indice  $n2$ . Le trajet de la lumière est alors dévié d'un angle qui dépend de l'angle d'incidence et du rapport des indices de réfraction des deux milieux, suivant la formule :

$$n1 \sin(i1) = n2 \sin(i2)$$



### Les lentilles

Les lentilles sont les éléments de base du microscope. Deux principaux types de lentilles se retrouvent dans un microscope : les lentilles divergentes et les lentilles convergentes. Les lentilles convergentes permettent de focaliser un faisceau de rayon parallèle à une distance donnée par la distance focale de la lentille. L'objectif de microscope est un système assez complexe de lentilles qui peut cependant être modélisé par une lentille convergente unique. Le schéma ci-dessous rappelle les lois de construction de l'image d'un objet (AB) par une lentille convergente ou divergente (dans l'approximation de lentilles minces et de rayons proches de l'axe optique). Les deux principes de base sont que les rayons parallèles à l'axe optique coupent celui-ci au point focal image de la lentille ( $F'$ ) et que les rayons passant par le centre de la lentille (O) ne sont pas déviés.



*Construction géométrique de l'image d'un objet  
par une lentille convergente ou divergente.*

Attention: l'image formée par la lentille divergente ci-dessus est une image dite "virtuelle" car on ne peut pas la projeter sur un écran, elle est visible si l'on regarde par la lentille avec notre œil (parce que le cristallin, une lentille convergente, forme une image réelle sur la rétine).

### Les aberrations

Les images formées par un système optique, même aussi simple qu'une lentille, comportent dans la réalité des défauts. Ces défauts sont appelés aberrations et nous allons en apercevoir trois dans cette section.

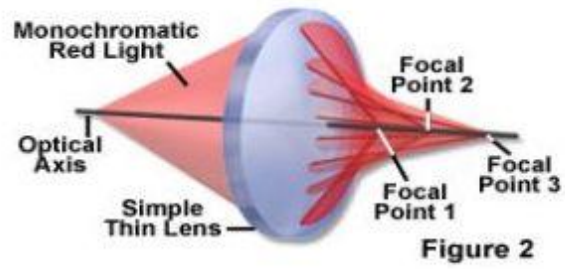
- L'aberration chromatique : ce défaut provient du fait que des rayons lumineux de longueurs d'onde différentes ne sont pas focalisés au même point de l'axe optique. Cette aberration peut être corrigée en ajoutant d'autres lentilles. Ceci explique que les objectifs de microscope avec une correction chromatique sont plus chers, car plus complexes.

- L'aberration de sphéricité : elle est due à une focalisation des rayons lumineux à une distance différente de la lentille suivant la distance entre le centre de la lentille et le point d'incidence du rayon sur cette dernière. Ceci implique que le plan image n'est pas bien défini.

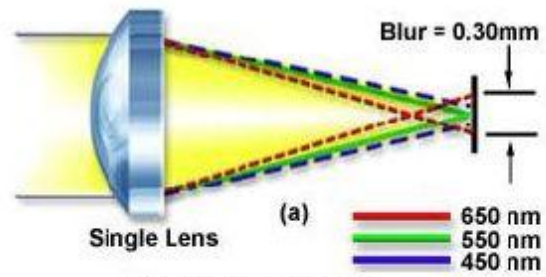
- La coma : c'est une aberration due à une différence de focalisation des rayons ayant un angle important par rapport à l'axe optique. Lorsque l'angle incident des rayons change, l'angle de sortie change lui aussi d'après les lois de la réfraction. De ce fait, les rayons arrivant au centre de la lentille et ceux arrivant en périphérie ne sont pas focalisés au même endroit. Le résultat est une image déformée, allongée, rappelant la queue d'une comète.



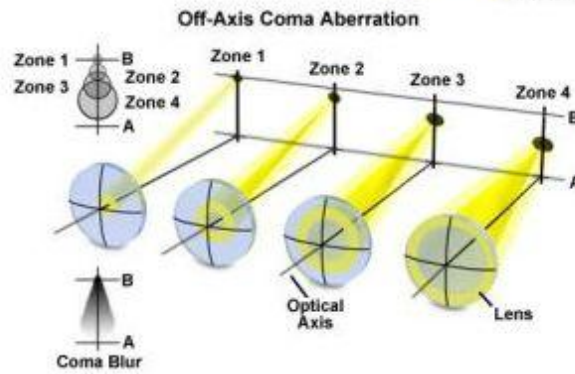
Sphérique



Chromatique



Coma

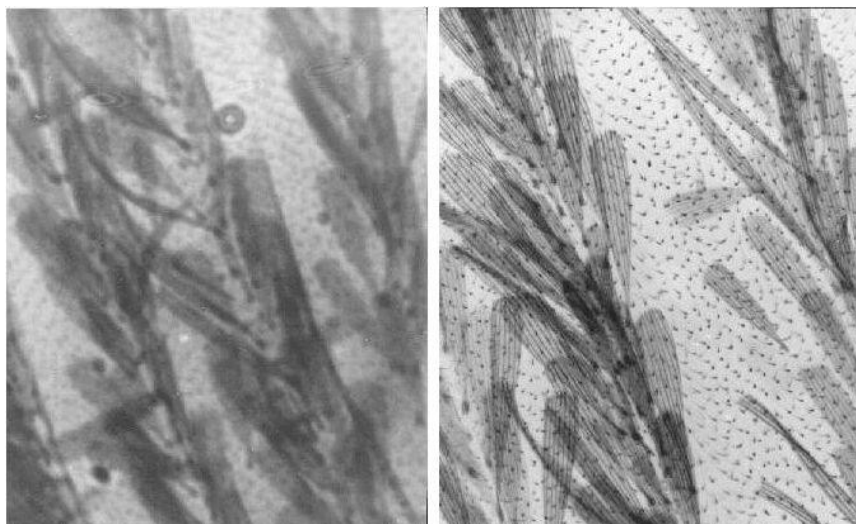


*Les principales aberrations optiques.*

## La microscopie en transmission

Le but du microscope est de donner accès à la structure microscopique des objets observés. Un microscope sert donc à voir des détails plus fins de l'objet et pas seulement à en faire une image agrandie. La performance principale de cet instrument est donc sa résolution, c'est-à-dire sa capacité à séparer ces détails.

Une illustration en est donnée sur la figure suivante où deux images ont été obtenues avec un même grossissement mais une optique différente.



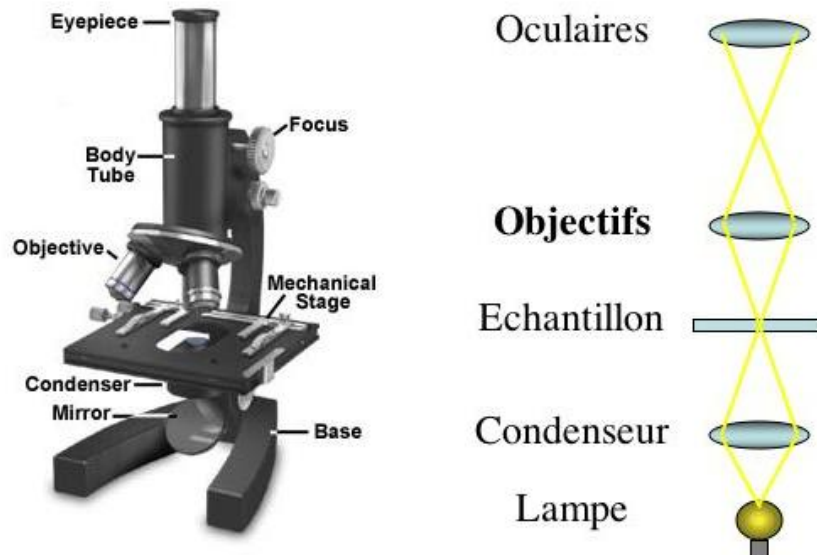
*Comparaison entre deux images d'un détail d'une aile de moustique obtenues avec un microscope "grand public" et un microscope professionnel. Le grossissement est le même dans les deux cas, seules la qualité et les caractéristiques des optiques changent.*

Nous verrons donc après une présentation des différents éléments du microscope et du principe optique, une discussion sur la résolution de l'instrument. Les différents éléments du microscope seront ensuite vus ainsi que leur influence sur la qualité des images.

Enfin, bien que le microscope en transmission soit le premier type de microscope ayant été inventé (depuis environ 350 ans !), il reste d'un usage très courant dans les laboratoires, notamment grâce à des techniques de contraste donnant des informations intéressantes sur certains échantillons biologiques. Nous verrons donc ces techniques dans le cadre de l'imagerie en transmission.

## Anatomie d'un microscope

Un microscope à transmission comporte principalement les éléments suivants : une source lumineuse, un condenseur, un objectif et des oculaires (voir figure ci-dessous).



*Les principaux éléments d'un microscope*

### Source

La première source utilisée était le soleil. Maintenant, la lampe hallogène a remplacé la source naturelle, offrant plus de puissance, une intensité plus constante et indépendante des nuages !

### Condenseur

C'est principalement une lentille servant à concentrer la lumière de la source lumineuse sur l'échantillon. Son rôle est essentiel pour la qualité des images, notamment le contraste et la résolution.

### Objectif

L'objectif est le cœur du microscope, l'élément essentiel. Il peut se résumer à une simple lentille à fort pouvoir grossissant. C'est lui qui détermine la résolution optique du microscope. La figure suivante montre un objectif avec un grossissement 60 fois (60x) et une ouverture numérique (N.A. : Numerical Aperture) de 1.4.



*Exemple d'objectif à fort grossissement. La coupe à droite montre la complexité de la structure de ce type d'objectif.*

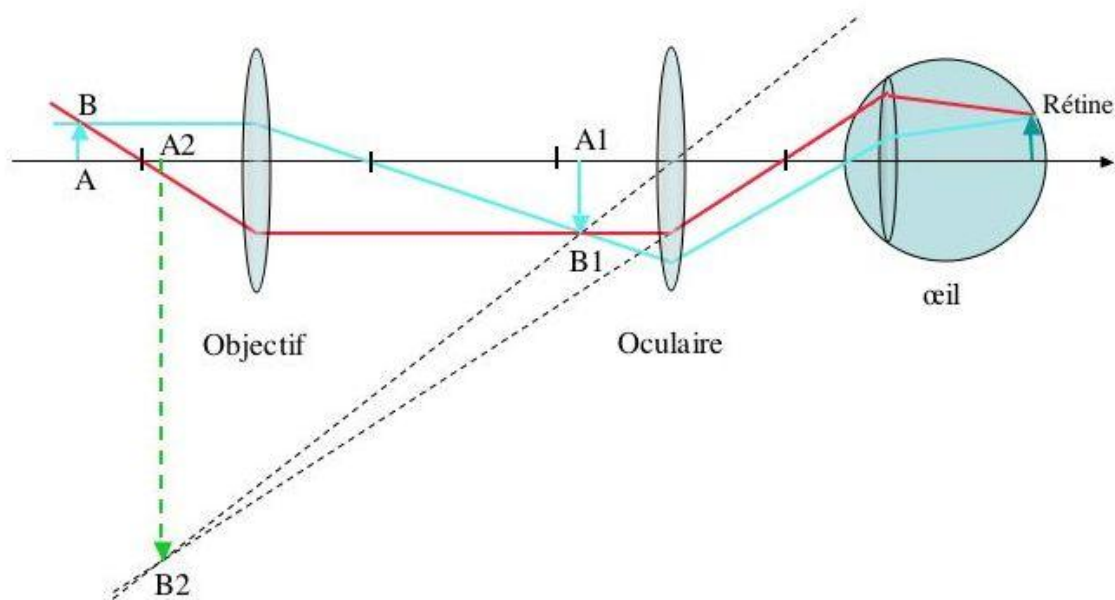
## Oculaires

Les oculaires servent à grandir l'image fournie par l'objectif (comme une loupe) et à pouvoir regarder l'échantillon sans que l'œil doivent accommoder, pour le confort de l'utilisateur.

## Principe optique du microscope

Le microscope dans sa forme la plus réduite est constitué d'un simple objectif et d'un oculaire, c'est-à-dire de deux lentilles convergentes.

Ces deux lentilles forment une image très agrandie de l'objet et permettent d'observer des détails fins dans l'échantillon. Nous allons voir ici la construction de l'image étape par étape en utilisant les lois de l'optique géométrique pour le trajet de rayons lumineux à travers des lentilles convergentes (voir plus haut).



*Principe optique du microscope*

Dans ce schéma simplifié, l'objectif donne de l'objet AB observé une image réelle A1B1 renversée et très agrandie qui joue pour l'oculaire le rôle d'objet réel. L'oculaire donne de cet objet une image virtuelle A2B2 agrandie, vue par l'observateur : l'oculaire est utilisé comme une loupe. Enfin, l'œil forme une image de l'objet A2B2 sur la rétine.

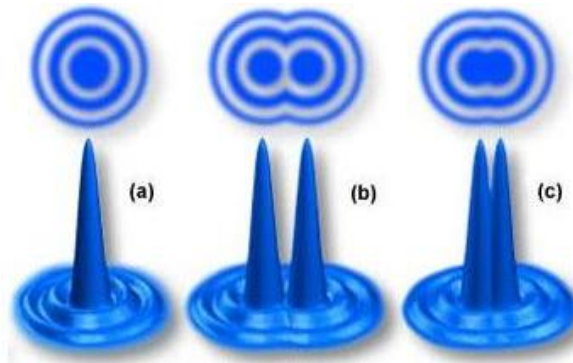
Le grossissement commercial  $G_m$  du microscope, rapport du diamètre apparent de l'image définitive à celui de l'objet observé à l'œil nu à la distance conventionnelle de 250 mm est :

$$G_m = \text{grossissement (objectif)} \times \text{grandissement (oculaire)}$$

Ainsi la puissance et le grossissement du microscope sont égaux aux produits du grandissement de l'objectif et, respectivement, de la puissance et du grossissement de l'oculaire (grossissement final jusqu'à 2000x). Le grandissement de l'objectif et le grossissement de l'oculaire sont habituellement gravés sur les montures de ces éléments.

## Résolution optique

La résolution d'un microscope ne peut pas se déterminer par l'optique géométrique, mais par l'optique ondulatoire. En effet, si l'on considère que l'objet étudié est constitué d'un ensemble de points lumineux, chaque point forme une figure de diffraction dans le plan image appelée PSF (*Point Spread Function*). La figure de diffraction d'un point (également appelée tache d'Airy) est représentée sur la figure suivante (a).

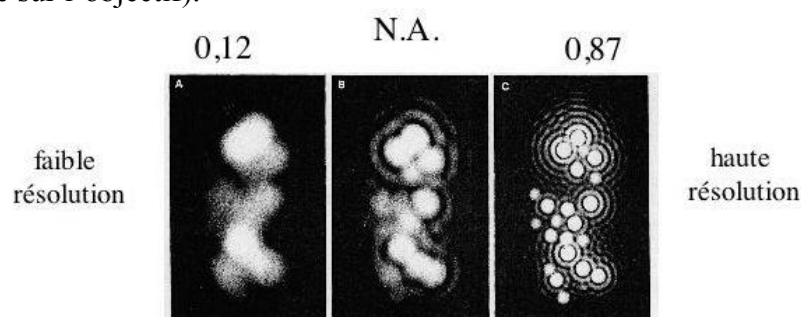


*Taches de diffraction d'un point source (a) et de deux points rapprochés (b et c).*

Suivant la distance entre deux points de l'objet, le microscope sera capable ou non de les *résoudre*, c'est-à-dire que ces points resteront séparables dans l'image finale. Dans la figure, les points dans le cas (b) sont résolus car les taches de diffraction ne se superposent pas trop. Le cas (c) est à la limite de la résolution et il sera difficile de bien séparer les points. La taille de la tache de diffraction est conditionnée par l'objectif utilisé et la longueur d'onde de la lumière. Plus précisément, la résolution est définie comme la distance minimale entre deux points séparables sur l'image finale et se calcule par la formule suivante:

$$d = 0,61 \lambda / NA$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde et  $NA$  l'ouverture numérique de l'objectif (valeur entre 0,2 et 1,4, toujours inscrite sur l'objectif).



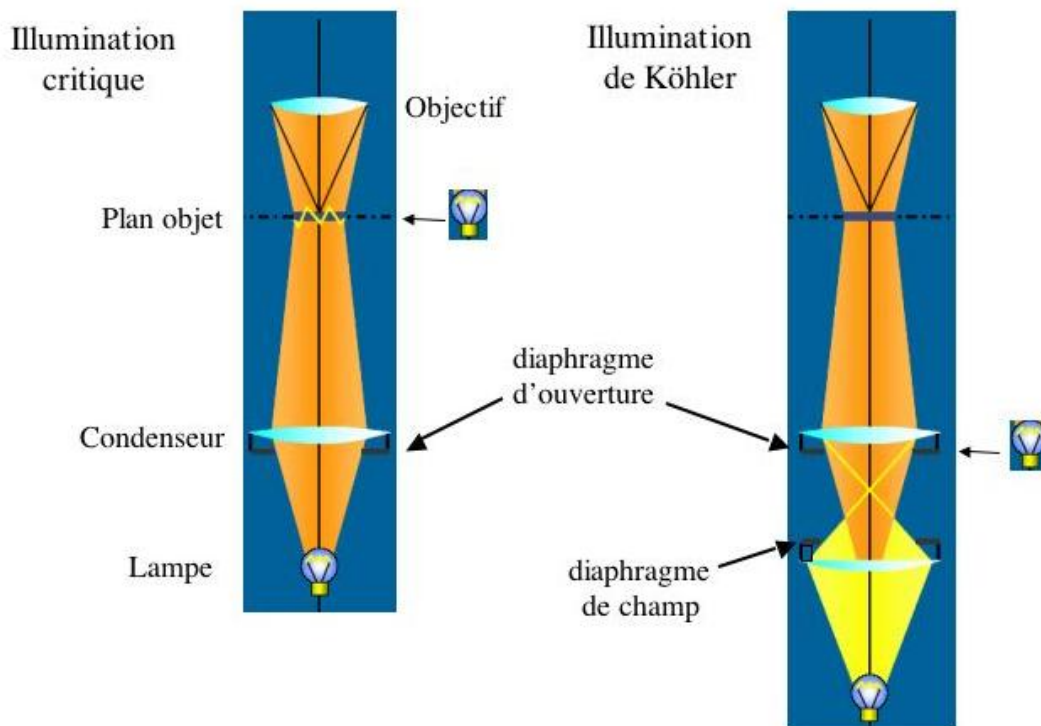
*Influence de l'ouverture numérique sur la séparation d'objets sphériques.*

Il est important de noter que **la résolution ne dépend absolument pas du grossissement de l'objectif !** Un objectif 100x ne donne pas forcément une résolution meilleure qu'un objectif 63x.

Par contre, le mode d'illumination de l'échantillon joue sur la résolution et il convient d'avoir un réglage correct du microscope pour obtenir la meilleure résolution possible.

### Illumination de l'échantillon

Il existe deux principales méthodes pour éclairer l'échantillon, l'illumination critique et l'illumination de Köhler, bien que seule la dernière soit utilisée dans les microscopes de recherche actuels.



### Eclairage critique

C'est la méthode la plus simple. Elle consiste à focaliser la lumière de la source sur l'échantillon de sorte que l'image de la source soit projetée sur l'échantillon. Le gros inconvénient de cette technique est que la source n'est généralement pas homogène et par conséquent, l'échantillon ne sera pas éclairé uniformément.

### Eclairage de Köhler

Cette illumination permet d'avoir un échantillon éclairé uniformément et d'obtenir la meilleure résolution possible du microscope. En effet, l'image de la source est formée cette fois sur le diaphragme d'ouverture et le condenseur va éclairer l'échantillon avec des rayons parallèles, de façon homogène.

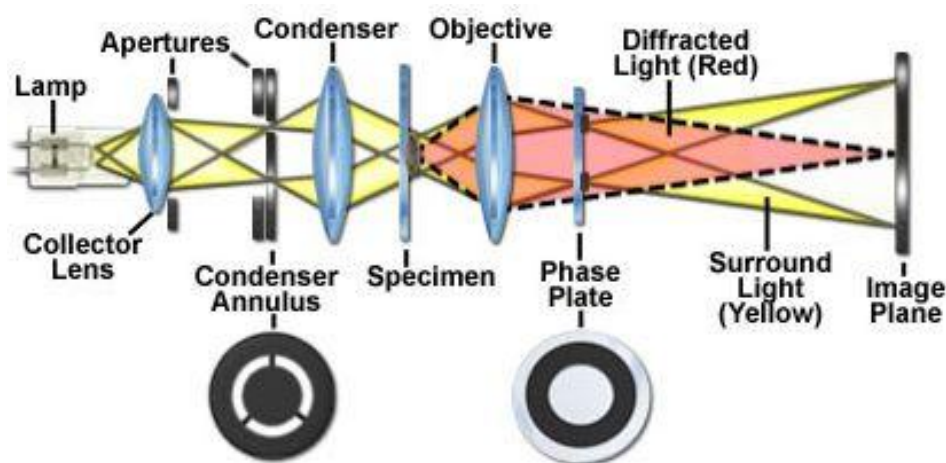
Le réglage du diaphragme d'ouverture du condenseur va jouer sur le contraste et la résolution des images. De façon générale, il faut ajuster l'ouverture du condenseur à l'ouverture numérique de l'objectif pour avoir une résolution optimale.

## Autres méthodes de contraste

La microscopie en transmission n'offre pas beaucoup de contraste pour les objets transparents comme les cellules isolées. Pour obtenir des observations plus informatives, il faut utiliser d'autres techniques optiques permettant de révéler les structures de l'échantillon. Deux de ces méthodes, largement utilisées en biologie, sont présentées ci-dessous.

### Contraste de phase

Cette technique permet de transformer une différence d'indice de réfraction dans l'échantillon en une différence d'intensité. Le principe consiste à éclairer l'échantillon avec un anneau lumineux (obtenu en plaçant une plaque percée d'un anneau dans le condenseur) et à récupérer la lumière avec un objectif spécial comportant une plaque de phase, c'est-à-dire une plaque avec un anneau (de la taille de l'image de l'anneau du condenseur par l'objectif) entraînant un déphasage de la lumière le traversant.



Seule la lumière non-déviée par l'échantillon passera par cet anneau et sera ainsi en opposition de phase avec la lumière diffractée (qui passe dans le reste de la plaque de phase). Il s'ensuit des interférences destructrices au plan image ce qui permet d'observer des variations d'amplitude correspondantes à des variations de l'indice de réfraction de l'échantillon. L'alignement de la plaque de phase et de l'anneau du condenseur est particulièrement important pour obtenir cet effet.

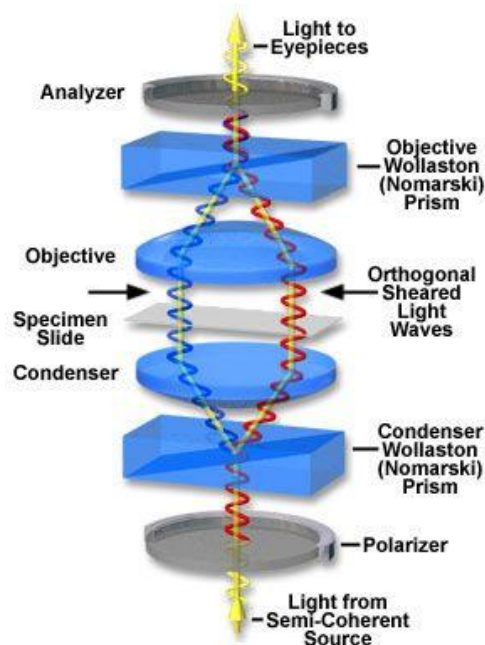
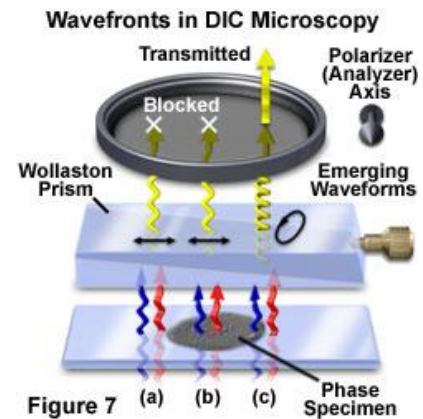


Un des avantages de cette technique est qu'elle est insensible aux changements de polarisation ou à la biréfringence, elle est donc utilisable pour regarder des cellules vivantes sur différents supports (dont les boîtes de Petri en plastique, d'où son utilisation intensive en culture cellulaire).

### DIC ou Nomarski

La technique de DIC (Differential Interferential Contrast) ou Nomarski (du nom de son inventeur) est basée sur une transformation des changements d'indice de réfraction dans l'échantillon en un changement d'amplitude lumineuse, observable à l'œil.

Expérimentalement, on éclaire l'échantillon avec une lumière séparée en deux polarisations à l'aide d'un prisme de Wollaston. Ces deux rayons vont traverser l'échantillon en passant par des chemins qui peuvent être un peu différents, puis ils seront combinés à nouveau par un deuxième prisme pour former des interférences. Ces interférences destructives et constructives révèlent les structures intracellulaires, en particulier les membranes (qui présentent souvent une forte variation d'indice de réfraction).



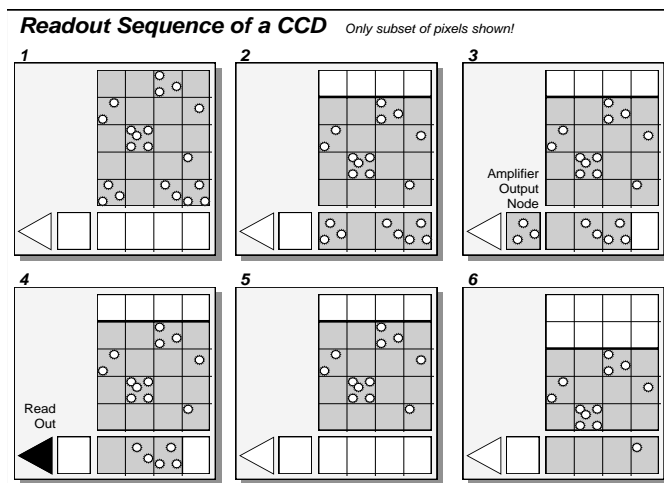
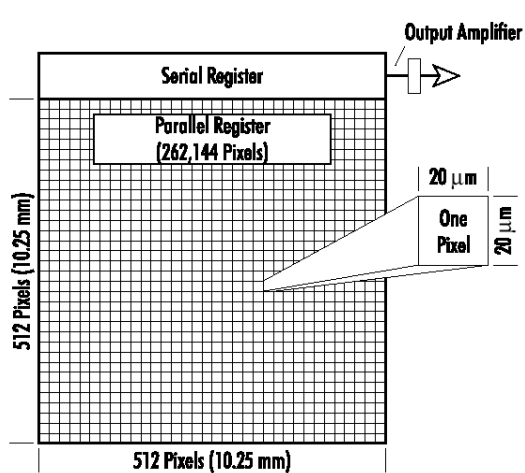
*Trajet lumineux dans la technique du DIC.*

L'inconvénient de cette méthode est la « délicatesse » des réglages et sa sensibilité au type de support utilisé pour l'échantillon (elle est notamment inutilisable sur boîte plastique).



### Observation de l'image. Ex : les caméras.CCD

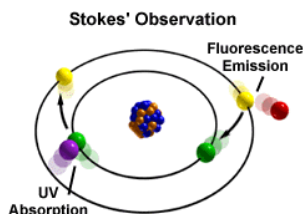
Un capteur CCD 2D peut être considéré comme une matrice de puits de potentiels arrangés sous forme de colonne. Chaque colonne est isolée de façon permanente des colonnes voisines afin d'éviter les migrations latérales de charge. En revanche, sur la longueur de la colonne, la charge est contenue dans des puits individuels par l'intermédiaire de potentiels appliqués entre chaque puits (gate potentials). De cette façon, il est possible de créer une matrice 2D de puits de potentiel indépendants. Ces puits sont appelés pixels. Chaque pixel est capable de stocker la charge induite par les photons incidents. Cette matrice 2D de pixels est appelée le « registre parallèle ». Une image dont la mise au point est réalisée sur le registre parallèle du CCD produit une matrice de charges, lesquelles sont proportionnelles à l'intégration du flux lumineux des photons sur le pixel correspondant. La matrice CCD peut être programmée pour collecter les charges à intervalles de temps réguliers. La charge totale collectée pour un pixel est alors égale au produit du taux de génération de charge par le temps d'exposition. A l'issue d'une exposition, une séquence programmée des électrodes (« gate potentials ») permet de transférer les charges dans un registre série. Une fois dans ce registre série, les paquets de charges sont alors individuellement déplacés vers l'amplificateur de sortie. L'amplificateur de sortie produit alors un signal proportionnel à la quantité de charge du paquet. Lorsque le registre parallèle est vidé de ces charges, une nouvelle acquisition peut alors commencer.



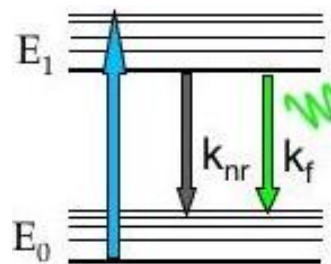
## Le microscope à fluorescence

La microscopie à fluorescence offre un type de contraste complètement différent des techniques précédentes. En effet, il ne s'agit pas cette fois de mettre en évidence des changements d'indice de réfraction de l'échantillon avec la lumière transmise. Il s'agit de marquer les molécules ou les structures d'intérêt avec une sonde fluorescente capable d'émettre elle-même de la lumière, de sorte que l'on observe seulement ce qu'on a choisi de marquer. Le reste de l'échantillon est noir et on a un contraste très fort, bien meilleur qu'avec les méthodes précédentes. Ceci permet même de détecter des molécules uniques et d'en suivre la dynamique.

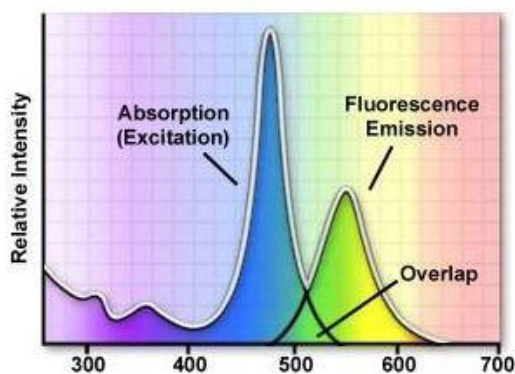
### Notion de fluorescence



Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par un photon d'une énergie suffisante (i.e. avec la bonne longueur d'onde), elle se désexcite en émettant un photon d'énergie plus basse (à cause des relaxations d'énergie vibrationnelle). A gauche, nous voyons un schéma du phénomène d'un point de vue atomique et à droite, d'un point de vue énergétique avec  $E$  les états énergétiques,  $K_{nr}$  le taux de désexcitation non radiatif et  $K_f$  le taux d'émission de fluorescence



Ainsi, un fluorophore excité par de la lumière bleue émettra dans le vert (décalage de Stokes). En réalité, comme on le voit sur la figure suivante, il existe une gamme de longueur d'onde où l'on peut exciter la molécule (*spectre d'excitation*) et la lumière émise comporte également un ensemble de longueur d'ondes différentes (*spectre d'émission*).

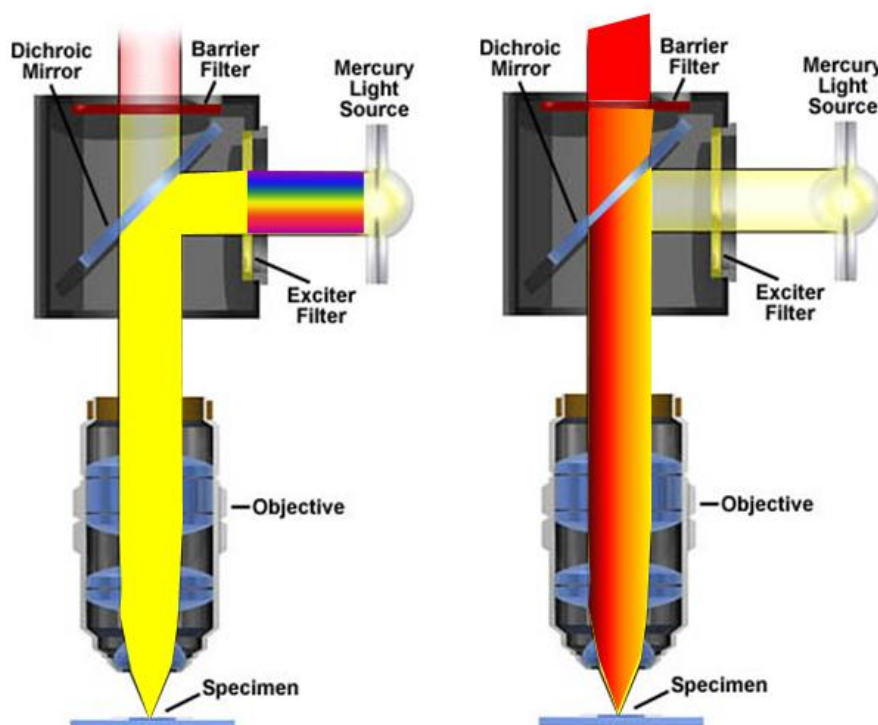


Exemple de spectres d'excitation et d'émission

### Principe optique du microscope

Le microscope à fluorescence possède les mêmes éléments qu'un microscope à transmission (en général les deux types d'éclairage sont disponibles sur le même microscope), à part la source de lumière qui a des propriétés particulières et la présence de filtres permettant une sélection spectrale.

Dans le cas le plus courant, le microscope est également en éclairage épiluminescent, c'est-à-dire que la lumière excitatrice passe par l'objectif qui sert alors de condenseur (voir figure). Ceci implique que l'ouverture numérique du condenseur est la même que celle de l'objectif sans faire aucun réglage et que la résolution est toujours optimale.



*Schéma du trajet optique dans un microscope en épifluorescence à l'excitation (gauche) et à l'émission (droite).*

Sur la figure ci-dessus, la lumière part de la source (en haut à droite) passe à travers le filtre d'excitation puis est réfléchiée par le filtre dichroïque vers l'objectif jusqu'à l'échantillon. Les fluorophores présents dans l'échantillon sont alors excités et la fluorescence émise est collectée par l'objectif, traverse le dichroïque puis le filtre d'émission (barrier filter) pour aller vers les oculaires ou un détecteur (caméra CCD, appareil photo...).

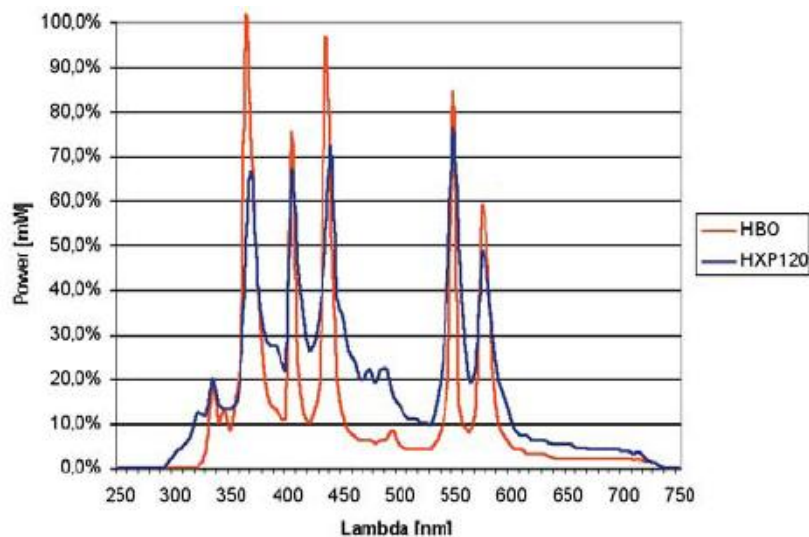
## Sources de lumière

La source de lumière la plus utilisée pour la fluorescence est la lampe à vapeur de mercure (voir figure ci-dessous).



*Lampe à vapeur de mercure. La lumière est émise après excitation du gaz par un arc électrique entre les deux électrodes.*

Elle permet un éclairage puissant et stable, et le spectre de la lumière émise possède plusieurs pics utilisables pour exciter les fluorophores usuels (en utilisant des filtres pour sélectionner le pic choisi).



*Spectre de la lumière émise par une lampe à vapeur de mercure (HBO) et une lampe métal halide (HXP120).*

Il est de positionner les lampes à distance du microscope à l'aide de fibres optique, minimisant ainsi l'échauffement de l'échantillon. L'utilisation de lampes de type « metal halide » augmente la gamme spectrale utilisable pour l'excitation de nos échantillons ainsi qu'une durée de vie beaucoup plus longue (plus de 2000 H)

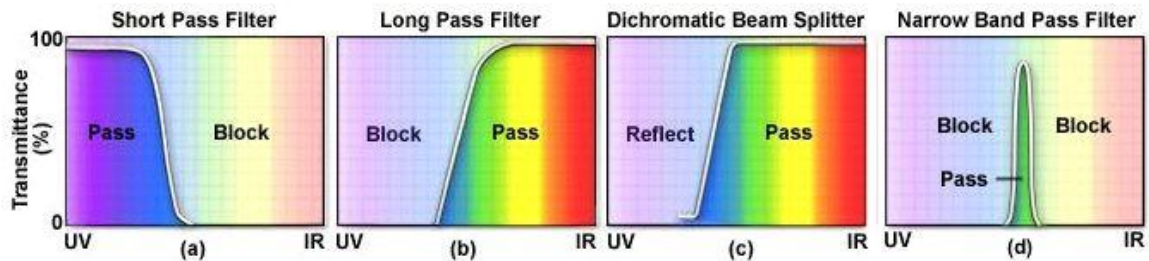
## Filtres

Les filtres servent à sélectionner la gamme de longueur d'onde que l'on veut utiliser pour exciter les fluorophores ou que l'on veut récupérer pour faire une image.

Il existe principalement trois types de filtres (voir figure ci-dessous) :

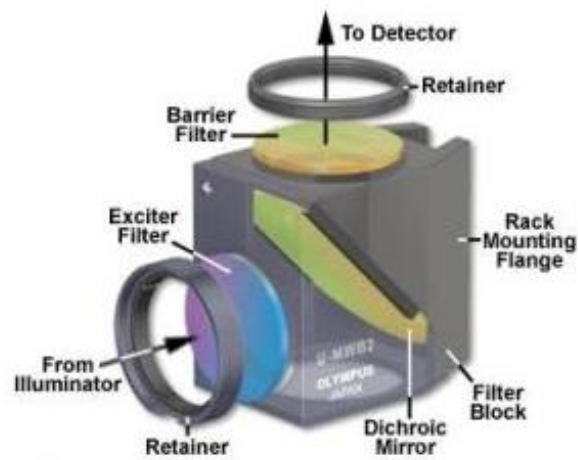
- passe-haut ou passe-bas (long-pass, short pass) : laisse passer la lumière ayant une longueur d'onde supérieure (passe-haut) ou inférieure (passe-bas) à une longueur d'onde de coupure.

- dichroïque (« beam-splitter ») : permet de séparer la lumière en deux plages de longueurs d'onde.
- passe-bande (band-pass) : ne laisse passer qu'une bande spectrale ± large



*Les différents types de filtres*

Dans le microscope, les filtres sont le plus souvent regroupés sur un cube qui comporte un filtre d'excitation, un filtre dichroïque et un filtre d'émission (voir schéma). On peut ainsi avoir plusieurs cubes avec pour chaque un jeu de filtres adaptés à un fluorophore particulier. Il suffit de changer le cube dans le chemin optique du microscope (souvent en tournant une roue) suivant le type de marquage effectué dans l'échantillon.



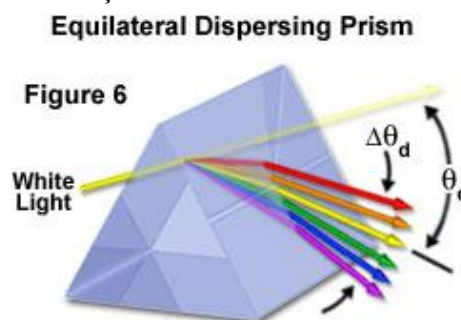
*Cube à filtres pour la fluorescence*

## La dispersion spectrale

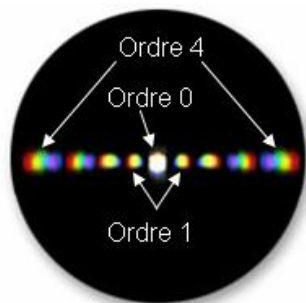
Au delà de la sélection de la gamme de longueur d'onde à observer réalisable avec un filtre, il est parfois indispensable de tirer plus d'information de la fluorescence émise par l'échantillon observé. Pour cela, la lumière émise pourra être dispersé en fonction de ces propriétés spectrales de différentes façons. Deux exemples sont présentés ici avec les prismes et les réseaux :

### Les prismes :

En général, un prisme présente deux faces qui sont orientées de façon favorable à la réfraction plutôt qu'à la réflexion de la lumière. Quand un rayon de lumière frappe une de ces faces, elle est réfractée en suivant la loi de Snell. Elle traverse alors l'épaisseur de verre pour atteindre la deuxième face où elle est à nouveau réfractée. La déviation de la lumière dépend alors de l'angle incident, de l'angle supérieur du prisme et de l'indice de réfraction de ce dernier. Comme l'indice de réfraction dépend souvent de la longueur d'onde de la lumière, la lumière bleue sera beaucoup plus dévié que la lumière rouge ce qui permet la séparation spectrale.



### Optique diffractive : les réseaux

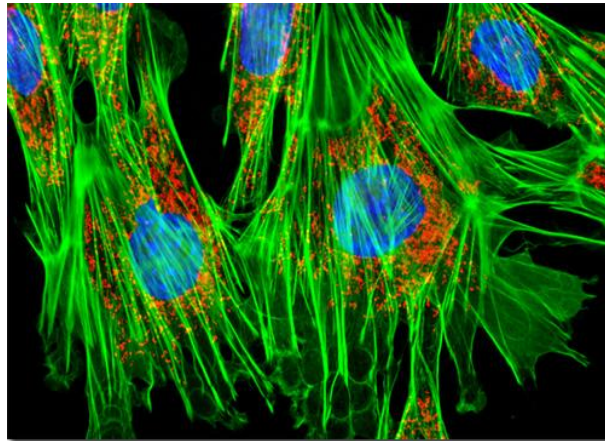


Les réseaux diffractifs possèdent à leur surface des structures périodiques de très petites tailles (de l'ordre de la longueur d'onde utilisée). La lumière qui atteint un réseau est alors diffractée de façon discrète (les ordres de diffractions) et dispersée en fonction de leur longueur d'onde.

Partant du centre, les différents ordres présentent une intensité lumineuse de plus en plus faible et une dispersion de la lumière de plus en plus grande

### Exemples en biologie

La microscopie de fluorescence est beaucoup utilisée en biologie, notamment en biologie cellulaire. L'une des utilisations les plus courantes est le marquage d'une protéine par immuno-fluorescence, c'est-à-dire en utilisant un premier anticorps contre la protéine d'intérêt, puis un second anticorps dirigé contre le premier, couplé à un fluorophore. On peut ainsi étudier la localisation des protéines endogènes dans la cellule et des translocations éventuelles suite à un traitement des cellules, par exemple.



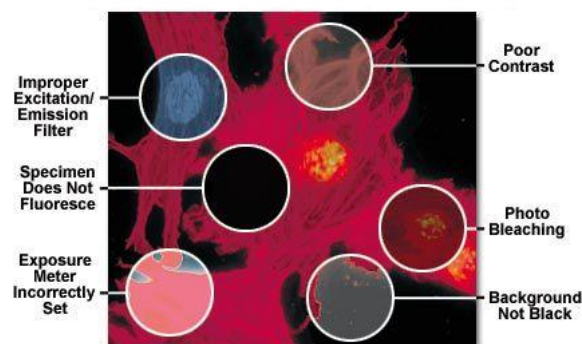
*Cellules 3T3 marquées avec du MitoTracker (mitochondries, rouge), phalloïdine-Alexa488 (actine, vert) et du DAPI (noyaux, bleu)*

L'apparition des GFPs (Green Fluorescent Proteins) a permis le suivi de protéines dans les cellules vivantes et de très nombreuses utilisations en sont faites actuellement.

En plus des applications directes de la fluorescence, il existe de nombreuses techniques dérivées, comme la FRAP, le FRET, la FCS,... Ces techniques permettent d'avoir des informations supplémentaires au-delà de la simple localisation des molécules, comme leur mobilité (diffusion, vitesse) ou leurs interactions avec d'autres molécules.

### Artefacts et problèmes possible en microscopie de fluorescence

L'utilisation de la fluorescence, en particulier pour des études quantitatives ou même semi-quantitatives, nécessite d'être prudent et conscient des artefacts possibles. Les deux problèmes les plus fréquemment rencontrés (ormis le fait que l'échantillon ne fluoresce pas !) sont le photoblanchiment (perte de signal au cours de l'illumination due à la photodestruction des fluorophores) et la saturation de l'image (qui masque les variations de fluorescence et donc entraîne une perte d'information importante).



*Les principaux problèmes pouvant survenir en microscopie de fluorescence.*

**Ressources utiles:**

Une intéressante histoire de la lumière:

[http://fr.encyclopedia.yahoo.com/articles/kh/kh\\_796\\_p0.html#kh\\_796.9](http://fr.encyclopedia.yahoo.com/articles/kh/kh_796_p0.html#kh_796.9)

Deux sites très bien faits et dont ce cours est très inspiré (notamment pour les figures !):

<http://www.olympusmicro.com/primer/> et <http://www.microscopyu.com/index.html>

La partie caméra est tirée du cours très complet de Philippe Rochon.