



Le microscope optique

PLONGEON DANS LE MONDE DE L'INFINIMENT PETIT



Pour l'observation de petits objets, on emploie une loupe ou un microscope. Ce dernier instrument est toujours constitué dans sa forme la plus simple de deux lentilles, et de manière plus générale de deux systèmes de lentilles : l'objectif et l'oculaire montés aux deux extrémités d'un tube. Alors que l'invention de la loupe remonte, semble-t-il, au ^{xv} siècle, celle du microscope date du tout début du ^{xvi}. Cependant, ce n'est qu'environ cent ans plus tard que son usage se répand sous l'impulsion des biologistes, notamment du

Hollandais **Antonie Van Leeuwenhoek** (1632-1723) et de l'Italien



Marcello Malpighi (1628-1694). Aujourd'hui, quatre cents ans après l'invention du microscope dit « optique », il existe un grand nombre de variantes de cet instrument : microscope à contraste de phase, microscope polarisant, microscope à fluorescence... Il existe aussi des instruments que l'on désigne par « microscope », mais dont le fonctionnement est fondamentalement très différent des microscopes optiques, et qui n'ont plus rien de commun avec ces derniers : ce sont les microscopes électroniques, le microscope à effet tunnel, le microscope à force atomique... Ici, nous nous intéresserons uniquement aux microscopes optiques encore appelés microscopes photoniques.

dit « optique », il existe un grand nombre de variantes de cet instrument : microscope à contraste de phase, microscope polarisant, microscope à fluorescence... Il existe aussi des instruments que l'on désigne par « microscope », mais dont le fonctionnement est fondamentalement très différent des microscopes optiques, et qui n'ont plus rien de commun avec ces derniers : ce sont les microscopes électroniques, le microscope à effet tunnel, le microscope à force atomique... Ici, nous nous intéresserons uniquement aux microscopes optiques encore appelés microscopes photoniques.

QUELQUES NOTIONS D'OPTIQUE

Le microscope étant un instrument d'optique, quelques notions de base relatives aux lentilles sont indispensables pour comprendre son fonctionnement et surtout comprendre la différence entre une loupe et un microscope.

LENTILLE

En optique, on appelle **lentille** un corps transparent limité par deux surfaces courbes, souvent



sphériques, ou une surface courbe et une surface plane. Les propriétés des lentilles sont dues à leur forme et à leur indice de réfraction n . Cet indice correspond au rapport de la vitesse de la lumière dans le vide (300 000 km/s) sur la vitesse de la lumière dans un matériau donné. Il est donc caractéristique de ce dernier. Par exemple, dans un verre d'indice de réfraction 1,5, la lumière se propage 1,5 fois moins vite que dans le vide, soit à 200 000 km/s. Or, en passant d'un milieu transparent à un autre milieu d'indice différent, la lumière subit une réfraction : elle dévie de son trajet initial.

FOYER, DISTANCE FOCALE ET PUISSANCE

Dans une lentille convergente, les bords sont plus minces que le centre. En tombant sur une telle lentille, des rayons parallèles à l'axe optique dévient et convergent vers un point F que l'on appelle foyer de la lentille. La distance f qui sépare le foyer du centre de courbure ou centre optique O de la lentille est appelée distance focale. Toute lentille possède deux foyers symétriques par rapport à O . On appelle puissance P , ou convergence, ou encore vergence d'une lentille, l'inverse de sa distance focale f : $P = 1/f$. L'unité dans le système international de la puissance est la dioptrie, f étant

donnée en mètre. Une dioptrie de 100 signifie que la focale de la lentille est de 1 cm.

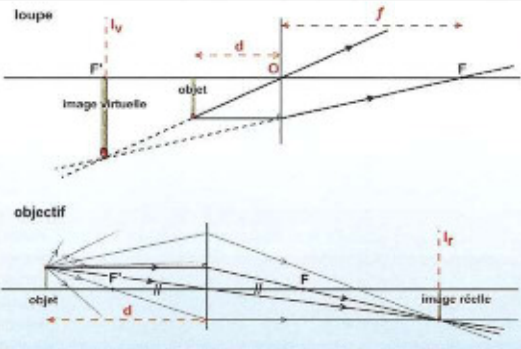
DES IMAGES PLUS GRANDES : DEUX MÉTHODES

Une lentille convergente permet d'obtenir d'un objet une image de taille plus importante que l'objet lui-même de deux manières différentes. Dans un cas, l'image obtenue est à l'envers, dans l'autre elle est à l'envers. Cela correspond à deux usages différents de la lentille convergente, respectivement comme loupe ou comme objectif.

La loupe : $d < f$



Comme chacun a pu l'expérimenter, afin qu'une loupe remplisse son rôle, il est nécessaire de la maintenir à une distance convenable de l'objet. En effet, il est nécessaire que la distance objet-lentille (d) soit inférieure à la distance focale. Or, comme indiqué plus haut, plus cette distance focale est courte et plus la loupe est puissante. C'est pourquoi, si la loupe est très puissante, il est nécessaire qu'elle soit quasiment collée à l'objet que l'on veut examiner. Le rapport $0,25/f = 0,25P$ est appelé grossissement de la loupe ; le chiffre 0,25 correspond à la distance minimale, 0,25 m ou 25 cm, appelée *punctum proximum*, permettant à un œil normal d'observer un objet



de manière nette et sans fatigue. Avec une dioptrie de 100, on obtient un grossissement de 25. Si la focale est donnée en centimètres, il suffit de diviser 25 par la focale pour avoir le grossissement. Il faut savoir que contrairement à ce que le mot grossissement laisse entendre, il n'indique pas de combien de fois l'image a été agrandie par rapport à l'objet. Néanmoins, plus le grossissement est fort et plus l'image sera grande.

L'objectif : $f < d < 2f$

Si l'objet se trouve à une distance d supérieure à f mais inférieure à $2f$, alors, l'image produite par la lentille est également plus grande que l'objet réel, mais elle est à l'envers. Là encore, pour avoir une très grande image, une très courte focale est indispensable. Et cela oblige, comme dans le cas de la loupe, à placer la lentille très près de l'objet à examiner. On appelle objectif une lentille ainsi employée et on parle alors de grandissement. Cela correspond au rapport des dimensions linéaires de l'image à celles de l'objet. Il est important de noter la différence entre le grandissement d'un objectif et le grossissement d'une loupe.

Image réelle

L'image obtenue par une lentille convergente employée comme objectif est dite réelle, car les rayons issus de l'objet, après avoir traversé la lentille, se croisent réellement en un point. Ce dernier se comporte alors lui-même comme un point source de lumière. Le croisement se fait dans le plan I_1 et tout se passe comme si un vrai objet (plus grand) se trouvait en I_1 . Plutôt que d'appeler cela une image réelle, on pourrait l'appeler un objet virtuel car tout se passe comme si un objet était présent en I_1 ; en effet, des rayons quittent ce lieu, pourtant aucun objet n'y est vraiment présent.

Image virtuelle

Au contraire, dans le cas de la loupe, les rayons ne se croisent pas dans le plan I_1 ; ils semblent seulement

provenir de I_1 , mais n'en proviennent pas réellement. Aussi, l'image obtenue par la loupe est dite virtuelle.

PRINCIPE DU MICROSCOPE

Fondamentalement, le microscope est constitué de trois parties : une platine sur laquelle repose l'échantillon ; une source de lumière qui éclaire l'échantillon le plus souvent par en-dessous ; un système optique qui permet d'observer l'objet. Ce système optique est essentiellement un système constitué d'un **objectif** et d'une



loupe : on observe à la loupe l'image réelle et agrandie (de l'objet) donnée par un objectif.

POUVOIR GROSSISSANT

Supposons que l'on forme à l'aide d'une lentille convergente employée comme objectif une image réelle (ou objet virtuel) agrandie d'un objet, avec un grandissement de 40. Supposons, qu'on examine cette image agrandie à l'aide d'une loupe de grossissement 10. Une telle combinaison de deux lentilles convergentes, la première employée comme objectif, la seconde comme loupe, appelée dans ce cas oculaire, est un microscope dont le grossissement est de 400. On emploie un microscope lorsque l'on souhaite avoir un grossissement supérieure à 25 ou 30, limite pratique de grossissement d'une loupe. Les objectifs actuellement commercialisés ont des grossissements normalisés : 2,5 ; 4 ; 5 ; 6,3 ; 8 ; 10 ; 12,5 ; 16 ; 20 ; 25 ; 40 ; 63 ; 100... Quant aux oculaires, leur grossissement est également normalisé : 6,3 ; 10 ; 16 ; 25. Rien n'interdit d'employer un objectif de grandissement 100 avec un oculaire de grossissement 25 pour obtenir un

Chiffres microscopiques

1604



Z. Jansen invente le premier microscope.

Les premiers microscopes permettent d'observer les fibres unicellulaires.

1400

C'est le grossissement utile le plus important. Un grossissement supérieur ne sert à rien.

1903

L'Autrichien Zsigmondy et l'Allemand Siedentopf inventent le microscope à fond noir.

Ultramicroscope

C'est l'autre nom du microscope à fond noir.

1934

Le Néerlandais Zernike invente le microscope à contraste de phase.

1953



Zernike reçoit le prix Nobel de physique.

Le microscope à champ proche optique

permet d'observer des détails de 5 nanomètres

Le microscope optique le plus puissant

microscope optique

oculaire

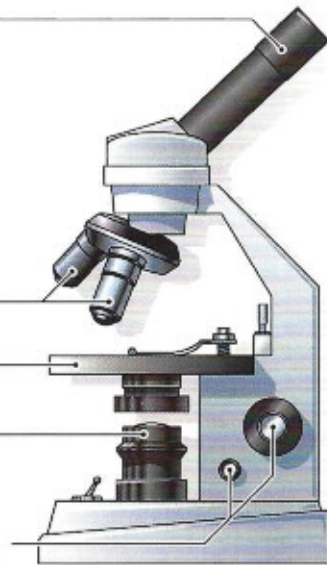
objectifs

platine

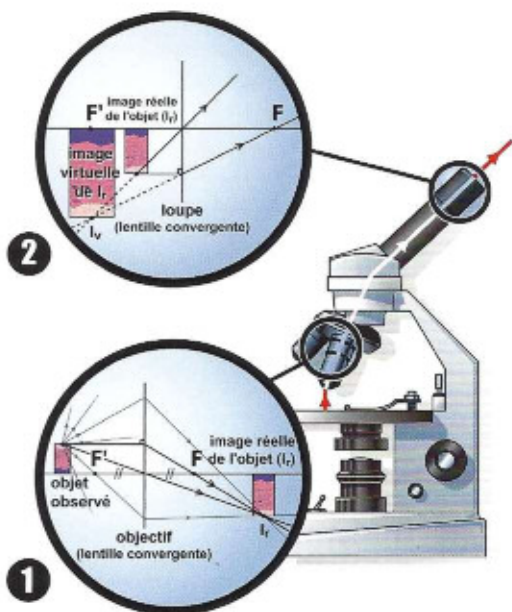
éclairage

vis de

mise au point



fonctionnement du microscope



grossissement de 2500. Cependant une telle combinaison est totalement inefficace, car l'image sera grande mais floue.

POUVOIR SÉPARATEUR

Ce qui compte davantage dans un microscope est sa limite de séparation que l'on appelle aussi minimum séparable. C'est la distance minimale séparant deux points (de l'objet) dont on obtient deux images bien nettes sans qu'elles ne se chevauchent. En effet, en raison de la nature ondulatoire de la lumière, on n'obtient pas un point image de chaque point de l'objet mais une petite tache dont le diamètre est de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière employée : c'est la diffraction. Aussi, lorsque la distance entre deux points est inférieure à cette longueur d'onde, les deux taches obtenues se recouvrent. De ce fait, dans la pratique, un grossissement supérieur à 1 400 est sans intérêt dans un microscope optique, car au-delà, les détails dans l'image deviennent flous, bien que l'image elle-même soit plus grande. L'inverse du minimum séparable est appelée pouvoir séparateur. Dans le meilleur des cas, on est limité par la longueur d'onde de la lumière (visible), de l'ordre de 0,5 micromètre, si bien qu'on ne peut pas révéler des détails inférieurs à cette dimension à l'aide d'un microscope photonique. Cela correspond à un pouvoir séparateur environ 200 fois meilleur que celui de l'œil. À signaler aussi qu'on emploie parfois le terme résolution ou pouvoir de résolution ; cependant, certains l'emploient comme synonyme de limite de séparation, d'autres comme synonyme de pouvoir séparateur. Il faut donc y faire attention.

AMÉLIORATIONS DU MICROSCOPE

Le microscope décrit plus haut présente cet instrument dans sa forme la plus simple et la moins performante. Mais, quelques techniques et dispositifs permettent d'en améliorer les

performances. Il s'agit principalement de la technique de l'immersion et l'emploi du condenseur, mais aussi des systèmes complexes de lentilles.

IMMERSION

Comme indiqué plus haut, la limite de séparation d'un microscope dépend de la longueur d'onde de la lumière employée. Plus précisément, elle lui est proportionnelle. Or, il existe un moyen simple de réduire « artificiellement » cette longueur d'onde. Il suffit de faire en sorte qu'au moment où la lumière pénètre dans l'objectif, après avoir traversé l'échantillon, elle ne soit pas dans l'air mais dans un milieu transparent d'indice n élevé. En effet, la vitesse de propagation dans un tel milieu étant n fois plus faible, la longueur d'onde y devient n fois plus courte. En pratique, la technique de l'immersion consiste à déposer une goutte d'huile sur la lamelle qui couvre l'échantillon et d'abaisser l'objectif jusqu'à son immersion dans l'huile. Si l'indice de cette dernière vaut 2, le minimum séparable sera deux fois plus faible que sans immersion. On obtient ainsi dans les meilleurs microscopes à immersion une limite de séparation de 0,2 micromètre, soit un pouvoir séparateur 500 fois supérieur à celui de l'œil.

CONDENSEUR ET DIAPHRAGME

Généralement, la source de lumière qui éclaire l'objet est située sous ce dernier. Or, la qualité de l'image dépend fortement de la manière dont l'échantillon est éclairé. Afin d'avoir un bon éclairage, on emploie ce que l'on appelle un condenseur. Il s'agit d'un système complexe de lentilles muni d'un ou deux diaphragmes situés entre la source de lumière et l'échantillon. Le plus souvent le condenseur est monté sur une glissière, ce qui permet d'ajuster sa hauteur pour régler sa position entre la source et l'échantillon. Son rôle consiste à faire en sorte que l'objet soit éclairé de manière uniforme, bien que la source de lumière elle-même ne soit pas uniforme puisqu'il s'agit du filament

d'une lampe. Dans l'éclairage que l'on emploie le plus souvent, et que l'on appelle éclairage Köhler, le condenseur est positionné de sorte que chaque point du filament éclaire la totalité de l'objet de manière uniforme. Chaque point de l'objet est ainsi éclairé par tous les points du filament. Deux diaphragmes, le premier avant le condenseur, le second après le condenseur, permettent d'optimiser cela. Par ailleurs, il existe des condenseurs à immersion : sur le condenseur on dépose une goutte d'huile que la lame de la préparation vient écraser.

SYSTÈMES COMPLEXES DE LENTILLES

L'image que fournit une lentille présente toujours des défauts que l'on désigne par aberrations. Ces défauts se manifestent par des déformations de l'image (aberrations géométriques) et des irisations colorées (aberrations chromatiques). On les élimine ou les réduit en employant un grand nombre de lentilles parfois accolées, ce qui améliore nettement la qualité de l'image, mais augmente le prix du microscope.

LES DIFFÉRENTS TYPES DE MICROSCOPES OPTIQUES

Il existe une très grande variété de microscopes optiques. Nous allons en mentionner les principaux types.

MICROSCOPE À FOND NOIR

Dans un microscope classique, lorsqu'on regarde dans l'oculaire, on voit l'objet sur un fond clair. Au contraire, dans le microscope à fond noir, comme son nom l'indique, le fond est noir. Dans ce genre de microscope, après avoir traversé l'objet, la lumière en provenance du condenseur ne pénètre pas directement dans l'objectif. De ce fait, si le fond de la préparation ne diffuse pas la lumière, il apparaîtra noir. En revanche toute zone de l'objet capable de diffuser la lumière apparaît claire (sur un fond sombre). C'est le cas de tous les contours notamment. De même, tout changement d'indice de réfraction de l'objet provoque la diffusion de la lumière, si bien que toutes les frontières séparant deux régions d'indices différents apparaissent en clair. Il faut savoir que dans un microscope à fond clair, ces frontières sont à peine visibles... Il est facile de transformer un microscope à fond clair en un microscope à fond noir : il suffit de changer de condenseur, ce qui est une opération simple.

LE STÉRÉOMICROSCOPE

Dans un stéréomicroscope, il existe deux tubes optiques. L'échantillon est éclairé par le bas ou par le haut selon que l'on effectue une observation par transmission ou réflexion, cela dépendant de la nature de l'échantillon, transparent ou non. Le stéréomicroscope le plus simple est en fait la loupe binoculaire, où la vision de l'échantillon sous deux angles légèrement différents donne une sensation de relief.

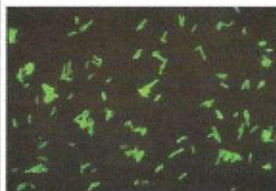
MICROSCOPE POLARISANT

Un microscope polarisant est tout simplement un microscope photonique ordinaire dans lequel l'objet est placé entre deux polariseurs croisés. En absence de l'objet, les deux polariseurs étant croisés, aucune lumière ne peut être observée à travers l'oculaire, car elle ne peut franchir le second polariseur. Or, certains corps transparents sont capables de faire tourner la direction de polarisation de la lumière, c'est-à-dire l'axe dans lequel vibrent les ondes lumineuses. Aussi, en plaçant l'objet à examiner entre les deux polariseurs, on révèle certaines structures de l'objet, invisibles sans polariseur. Or, dans certaines cellules, de telles structures existent justement. Souvent leurs dimensions sont inférieures à la limite de séparation. Cependant, le microscope polarisant permet parfois de les révéler.



MICROSCOPE À FLUORESCENCE

En microscopie à fluorescence, on observe des objets fluorescents. Ces derniers sont naturellement fluorescents ou rendus artificiellement fluorescents. Dans tous les cas, il est nécessaire de provoquer la fluorescence de l'objet ce qui implique d'équiper le microscope d'un dispositif qui éclaire l'objet en ultraviolet, et de filtres pour observer la lumière de fluorescence émise. Les principales applications de la microscopie par fluorescence se font en biologie, notamment en immunologie : c'est



l'immunofluorescence. Cette technique permet de localiser une protéine grâce à un anticorps fluorescent qui se lie à elle.

MICROSCOPE À CONTRASTE DE PHASE

Dans un microscope ordinaire, les différentes structures de l'objet examiné — par exemple une cellule — sont révélées parce qu'elles absorbent la lumière de manière inégale, si bien que certaines parties apparaissent plus sombres que d'autres. Si toutefois l'échantillon est trop transparent, on emploie des pigments qui colorent différemment les différentes parties de la cellule. Mais cette opération entraîne la mort de celle-ci. Si on ne souhaite pas tuer la cellule, on est obligé d'employer une autre technique, celle de la microscopie à contraste de phase. Son principe de fonctionnement s'appuie sur la nature ondulatoire de la lumière. En effet, les différentes parties transparentes de l'échantillon ne possèdent pas le même indice de réfraction, la lumière ne s'y propage pas à la même vitesse. De ce fait, un déphasage apparaît entre les ondes. À la sortie de l'échantillon, les ondes n'étant plus en phase, les interférences

entre ces ondes provoquent l'apparition de zones plus ou moins claires, des contrastes, d'où le nom de ce genre de microscope.

MICROSCOPE INTERFÉRENTIEL

Le microscope interférentiel est sans doute le microscope le plus complexe. Aussi, sans détailler, nous ne donnerons que le principe de base sur lequel repose le fonctionnement de ce microscope. On fait en sorte que deux faisceaux parallèles, en phase et très proches l'un de l'autre (à une distance légèrement inférieure à la limite de séparation du microscope) traversent chaque partie de l'objet. Si les deux faisceaux traversant une zone rencontrent exactement les mêmes obstacles et propriétés optiques, ils seront toujours en phase à la sortie de l'objet et produiront des interférences constructives. Mais la moindre différence entre les deux trajets, qu'il s'agisse d'une différence d'épaisseur ou d'indice, provoquera un déphasage entre les deux faisceaux et conduira à une image plus ou moins contrastée, ce qui révélera la présence d'irrégularités.

MICROSCOPE

À BALAYAGE LASER CONFOCAL

Ici, la lumière employée pour éclairer l'échantillon est une lumière laser qui descend le long du tube du microscope et traverse l'objectif avant de tomber sur la préparation. On observe la lumière renvoyée par celle-ci. En fait, le faisceau laser balaye l'échantillon point par point, ce qui explique la dénomination « microscope à balayage laser ». Les points balayés



par le faisceau sont tous situés dans le même plan de coupe dans l'épaisseur de l'échantillon. On obtient cela en focalisant le faisceau toujours dans le même plan, d'où le terme « confocal ». Ainsi, toute la lumière renvoyée provient d'un même plan, celui qui a été balayé. L'absence de lumière parasite provenant d'autres plans donne une netteté tout à fait exceptionnelle à l'image. Par ailleurs, en balayant divers plans de coupe, les uns après les autres, on réalise une tomographie optique de la préparation. Les techniques de traitement d'image permettent ensuite de révéler la structure tridimensionnelle de l'échantillon.

MICROSCOPE À CHAMP PROCHE OPTIQUE

Comme dans un microscope optique ordinaire, on éclaire l'échantillon, mais on observe une composante de la lumière renvoyée par celui-ci qui se trouve à une distance inférieure à la longueur d'onde de la lumière : c'est ce que l'on appelle la composante évanescente de l'onde. Dans ces conditions, il n'y a plus diffraction et la limite de séparation est de l'ordre de 100 fois inférieure à la longueur d'onde employée. Ainsi, une lumière jaune de 0,5 micromètre permet de révéler des détails de 5 nanomètres.