



HAL
open science

IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE 3D
Introduction aux techniques de microscopie optique.
Contraste des images
Haeberlé Olivier

► **To cite this version:**

Haeberlé Olivier. IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE 3D Introduction aux techniques de microscopie optique. Contraste des images. Master. 2013. sfo-00844762

HAL Id: sfo-00844762

<https://hal-sfo.ccsd.cnrs.fr/sfo-00844762>

Submitted on 15 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

IMAGERIE OPTIQUE MICROSCOPIQUE 3D

Introduction aux techniques de microscopie optique.

Contraste des images

Olivier Haeberlé
Laboratoire MIPS – EA2332, Université de Haute-Alsace
IUT de Mulhouse, 61 rue Albert Camus, F-68093 MULHOUSE Cedex, FRANCE

olivier.haeberle@uha.fr

Résumé :

Le microscope optique est devenu un instrument-clé pour la compréhension des mécanismes biologiques, grâce à ces possibilités uniques d'imagerie en 3D, sur des spécimens vivants. Son champ d'utilisation s'étend aussi à d'autres domaines comme la physique des surfaces et interfaces, la métallurgie, la cristallographie ou la pétrographie, le contrôle non destructif et l'inspection qualité. Ce cours a pour but de présenter les techniques les plus courantes en microscopie optique, et d'introduire certaines limites de cette technique.

Mots clés :

Microscopie Optique, Mécanisme de Formation d'Images, Contraste

1. INTRODUCTION

1.1. Bref historique

L'utilisation d'une lentille pour améliorer la vision est très ancienne. Ainsi Pline l'Ancien écrivait : "Les émeraudes sont habituellement concaves de telle sorte qu'elles peuvent concentrer les rayons lumineux. L'Empereur Néron regardait les combats de gladiateurs à travers une émeraude".

Curieusement, il faudra attendre le XIII^{ème} siècle pour voir apparaître les lunettes. Apparues vers 1280 à Florence en Italie, elles seront adoptées très rapidement à travers toute l'Europe.

On a alors pensé à associer deux lentilles pour augmenter le pouvoir grossissant. Le microscope composé aurait été inventé vers 1590 par Hans et Zacharias Jansen, qui vivaient en Hollande.

L'invention des Jansen se propagea très vite. De nombreux artisans se lancèrent dans la fabrication de microscopes. Pourtant, mis à part certains érudits, tel Galilée, le microscope était plutôt perçu comme un divertissement. Le mot microscope est d'ailleurs cité pour la première fois par les membres de l'*Academia dei Lincei*, une société savante dont Galilée faisait partie.

En 1665, l'ouvrage *Micrographia*, par Robert Hooke, attira l'attention sur cet instrument en tant qu'outil pour les sciences. C'est dans cet ouvrage qu'apparaît le mot cellule pour désigner ce qui semble alors le constituant élémentaire des spécimens biologiques. Les progrès s'accélérent alors de manière spectaculaire.

Au XVIII^{ème} siècle, de nombreuses améliorations sont apportées au microscope. On voit ainsi apparaître les microscopes binoculaires. Toutefois, la médiocre qualité des lentilles limitait sévèrement la capacité à voir de très fins détails. La résolution de ces instruments était limitée à environ 2 μm .

Les progrès de l'optique permirent d'améliorer considérablement les microscopes. Vers 1730, Chester More Hall observa que la combinaison de verre à dispersion chromatique différente permettait une compensation, et inventa la première lentille achromatique. En 1827, Giovanni Battista Amici introduisit le premier microscope achromatique. Il réalisa aussi que l'épaisseur de la lamelle avait une influence, et proposa le concept d'immersion à eau. En 1830, Joseph Jackson Lister comprit et résolut le problème de l'aberration sphérique.

En Allemagne, Ernst Abbe et Karl Zeiss développent les objectifs à immersion à huile, d'une ouverture numérique de 1,4 (ce qui est toujours le maximum utilisable en biologie) et Otto Schott invente des verres à correction chromatique et le premier objectif apochromatique en 1886.

A la fin du XIX^{ème} siècle, des détails aussi petits que 0,2 μm sont déjà accessibles. Sauf cas particulier, les microscopes optiques modernes ne font guère mieux.

Nous allons maintenant voir quels sont les principaux types de microscopies optiques utilisés en biologie, mais aussi en cristallographie, contrôle non-destructif, microélectronique etc...

La deuxième partie de ce cours détaillera les mécanismes de formation des images entrant en jeu, et les principes physiques qui limitent la résolution. On se focalisera plus particulièrement sur le microscope classique et le microscope confocal en fluorescence, mais les résultats obtenus s'étendent aux autres types de microscopie.

Dans la troisième partie seront abordées les approches nouvelles permettant d'améliorer la résolution. En effet, ces dernières années sont apparues plusieurs techniques permettant de nettement surpasser les limitations des microscopes plus classiques.

1.2. Prérequis

Ce cours vise à présenter les techniques les plus couramment utilisées en microscopie optique et à décrire les phénomènes physiques à la base des principes de formation des images.

Les prérequis se limitent donc aux connaissances de base en optique et électromagnétisme que peut avoir tout étudiant ayant effectué un cursus typique de licence de sciences.

Des références sont données pour permettre au lecteur intéressé d'approfondir ses connaissances dans le domaine.

2. QUELQUES TYPES DE MICROSCOPIE OPTIQUE

Le schéma de base du microscope optique a donné naissance à de nombreuses variantes dans le but d'améliorer la résolution (microscopie confocale), la profondeur d'observation (microscopie bi-photon), de sélectionner des zones spécifiques, marquées par des colorants adaptés (microscopie en transmission) ou des fluorophores spécifiques (microscopie de fluorescence), ou encore d'observer des spécimens normalement transparent (microscope à contraste de phase) etc... Nous allons maintenant décrire certaines de ces techniques.

2.1. Microscopie en transmission

Le microscope en transmission est le plus courant. C'est le microscope d'initiation dans lequel tout le monde a regardé au moins une fois dans sa vie au collègue

Le principe en est très simple. Le spécimen est éclairé par transparence, à l'aide d'une source blanche. L'objectif capte la lumière transmise, et reforme une image, observée à l'œil à travers un oculaire, ou à l'aide d'une caméra vidéo. Ce microscope est toujours utilisé pour les analyses de routine (laboratoire d'analyses médicales par exemple).

La Figure 1 en donne le principe. Un microscope est très schématiquement constitué par :

- un objectif de très faible distance focale (quelques millimètres en général). Celui-ci donne de l'objet une image réelle, très agrandie et renversée. L'objectif est un système épais, convergent. Attention, il ne peut être assimilé à une lentille mince dans l'approximation paraaxiale. En effet, certains rayons issus du spécimen pénètrent l'objectif sous un très fort angle d'incidence.
- un oculaire, qui donne de l'image fournie par l'objectif une image secondaire, généralement virtuelle, observable à l'œil. On peut aussi former une image réelle, ou capturer directement l'image fournie par l'objectif avec une caméra.

Ce schéma apparemment simple a donné lieu à de nombreuses variantes, suivant les applications visées.

On distingue deux grandes familles de microscopes : les microscopes droits et les microscopes inversés. Le microscope droit est le plus classique. L'éclairage du spécimen se fait par en dessous. La lumière transmise à travers le spécimen est captée par l'objectif. L'image est envoyée dans une tête généralement trinoculaire (une sortie binoculaire en visuel, et une sortie caméra).

Le microscope inversé a une configuration différente, où l'éclairage du spécimen se fait par le dessus, le système optique d'observation étant situé dans la partie basse du bâti du microscope. Cette configuration offre l'avantage d'une plus grande stabilité (centre de gravité plus bas) et d'un espace dégagé beaucoup plus vaste autour du spécimen. On l'utilise par exemple pour l'étude des cultures cellulaires en boîte de Pétri.

Dans les deux cas, le microscope peut être utilisé en transmission, ou avec une épillumination, lorsque le spécimen est éclairé à travers l'objectif qui sert à l'imager. Ce dispositif est surtout utilisé en microscopie de fluorescence et en microscopie en réflexion.

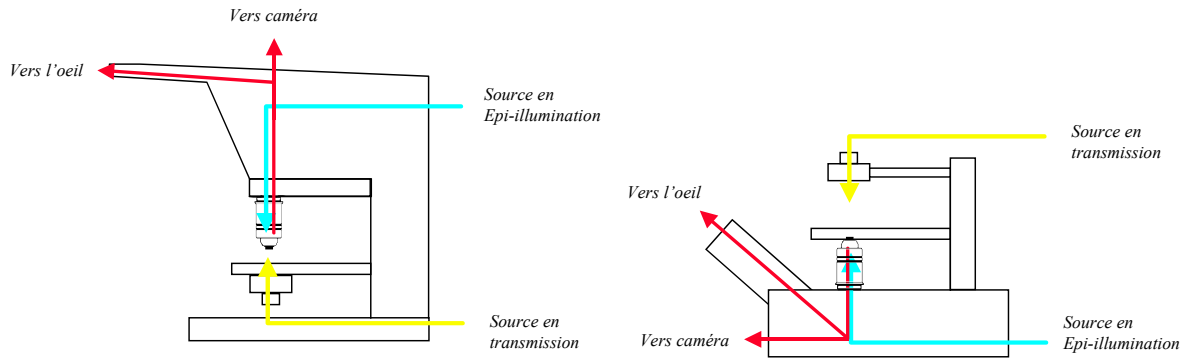


FIG. 1. Schéma de principe d'un microscope droit et d'un microscope inversé.

2.2. Microscopie en réflexion

Le microscope en transmission est par définition adapté à l'observation de spécimens transparents. Pour l'observation d'un spécimen opaque, on l'éclaire à travers l'objectif (épi-illumination). La lumière réfléchie par le spécimen est captée par l'objectif. Les microscopes droits et inversés peuvent être équipés de source en épi-illumination (voir Figure 1). Le microscope en réflexion est essentiellement utilisé en métallographie, en géologie, en physique des surfaces et interfaces.

2.3. Microscope conventionnel et Microscope à l'infini

Au début du XX^{ème} siècle de nombreux fabricants de microscopes existaient à travers le monde. Il a donc été proposé de normaliser le système opto-mécanique de cet instrument. Les microscopes dits conventionnels obéissent à ce standard défini par ces trois dimensions :

- la longueur mécanique du tube est de 160 mm,
- l'objectif à une longueur par focale de 45 mm,
- la distance entre le spécimen observé et son image est de 195 mm.

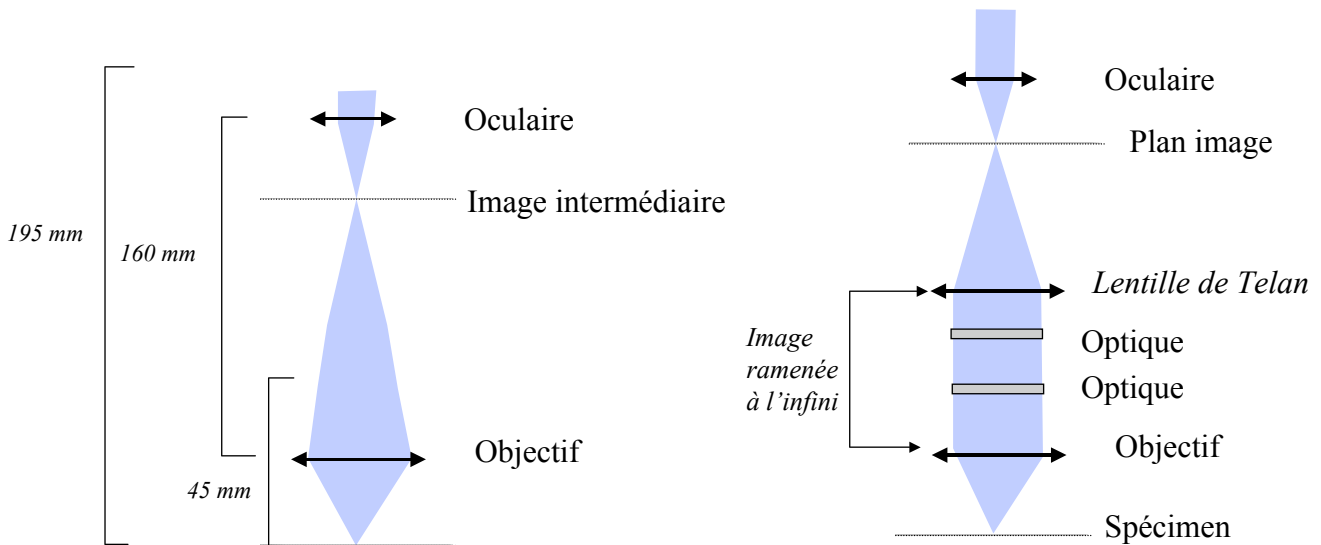


FIG. 2. Schéma de principe d'un microscope conventionnel et d'un microscope à l'infini

La Figure 2 en montre le principe. Ce type de montage optique présente un inconvénient majeur : l'introduction de toute optique intermédiaire entre l'objectif et la caméra ou l'oculaire (filtre coloré, filtre polarisant etc..) se traduit par l'introduction d'aberrations optiques supplémentaires, ce qui entraîne une dégradation de la qualité des images. On retrouve ce problème de l'aberration sphérique lorsque l'on étudie la focalisation d'une onde à travers un milieu stratifié.

Pour résoudre ce problème, les microscopes dits « à l'infini » ont été développés. Dans cette configuration, l'objectif forme une image à l'infini du spécimen (voir Figure 2). Ceci signifie simplement que le spécimen est placé au point focal de l'objectif. Tout rayon émergeant du spécimen est donc focalisé parallèlement à l'axe optique. Une seconde lentille, dite lentille de Telan, reforme une image qui sera captée directement par une caméra, ou observée à travers un objectif. L'intérêt de cette configuration est double. Tout d'abord, la zone de l'image à l'infini peut (en théorie) avoir une longueur arbitraire, ce qui libère l'espace nécessaire pour rajouter des optiques intermédiaires (filtres, polariseurs, cubes séparateurs). De plus, dans cette zone, les rayons sont parallèles. L'ajout d'optiques intermédiaires planes ne perturbe alors pas le faisceau (pas d'aberration sphérique rajoutée). Pour cette raison, les microscopes de recherche utilisent maintenant tous des objectifs à l'infini.

2.4. Illumination de Köhler.

Un problème spécifique du microscope en transmission est que la lumière n'est pas produite par le spécimen que l'on observe, mais par une source lumineuse, qui d'un point de vue optique, se situe sur le même axe que le spécimen.

Une difficulté vient du fait que cette source est « proche » optiquement du spécimen. L'expérience peut alors conduire à l'observation simultanée de l'image du spécimen et d'une image, floue mais très brillante, de la source. La qualité des images obtenues est alors mauvaise, et l'information utile noyée dans un bruit de fond important.

Une élégante solution à ce problème a été proposée par August Köhler à la fin du XIX^{ème} siècle. L'idée est d'utiliser, au long de l'axe optique du microscope, des plans conjugués différents pour le spécimen et pour la lampe. On s'assure ainsi que les images de ces deux objets, transportées par le système optique, ne se confondent pas.

On utilise une lentille, qui collecte la lumière de la lampe (filament) et la focalise à l'entrée du condenseur. Ainsi, les rayons provenant de différents points de la source sont refocalisés sur le même point de l'objet à observer. Le microscope étant focalisé sur l'objet, on fait en sorte que différents points de la source correspondent à un même point de l'objet. Ceci est illustré par la Figure 3 haut (rayons en rouge).

Simultanément, on s'arrange pour que les rayons issus d'un même point de la source soient focalisés parallèlement à travers le spécimen. On forme alors une image de la source dans le plan focal arrière de l'objectif, à un autre endroit que l'image de l'objet. Sur le capteur (rétine, pellicule, capteur CCD), la source n'est pas focalisée, et n'apparaît donc pas. Ceci est illustré par la Figure 3 bas (rayons en bleus).

(Note : la Figure 3 constitue un schéma de principe, et non un tracé de rayon optique rigoureux ! On retiendra cependant que pour chaque rayon issu de l'objet, on peut trouver un rayon qui viendrait de la source d'illumination, et qui suit le même trajet optique.)

Ce principe de familles de plans conjugués séparés pour la source et le spécimen est essentiel pour obtenir de bonnes images. Ainsi, on peut obtenir une illumination uniforme du spécimen, même avec une source non-homogène, tel le filament d'une lampe. D'autre part,

tout objet qui est focalisé dans un plan précis d'une famille de plans conjugués apparaîtra focalisé dans tous les autres plans de cette famille. Simultanément, on est sûr qu'il n'apparaîtra pas focalisé dans tous les plans de l'autre famille de plans conjugués.

Les plans où sont formées les images de l'objet, et qui doivent être conjugués, sont donc localisés successivement (voir Figure 3) au niveau du diaphragme de champ, du spécimen lui-même, du diaphragme de l'objectif, et du capteur.

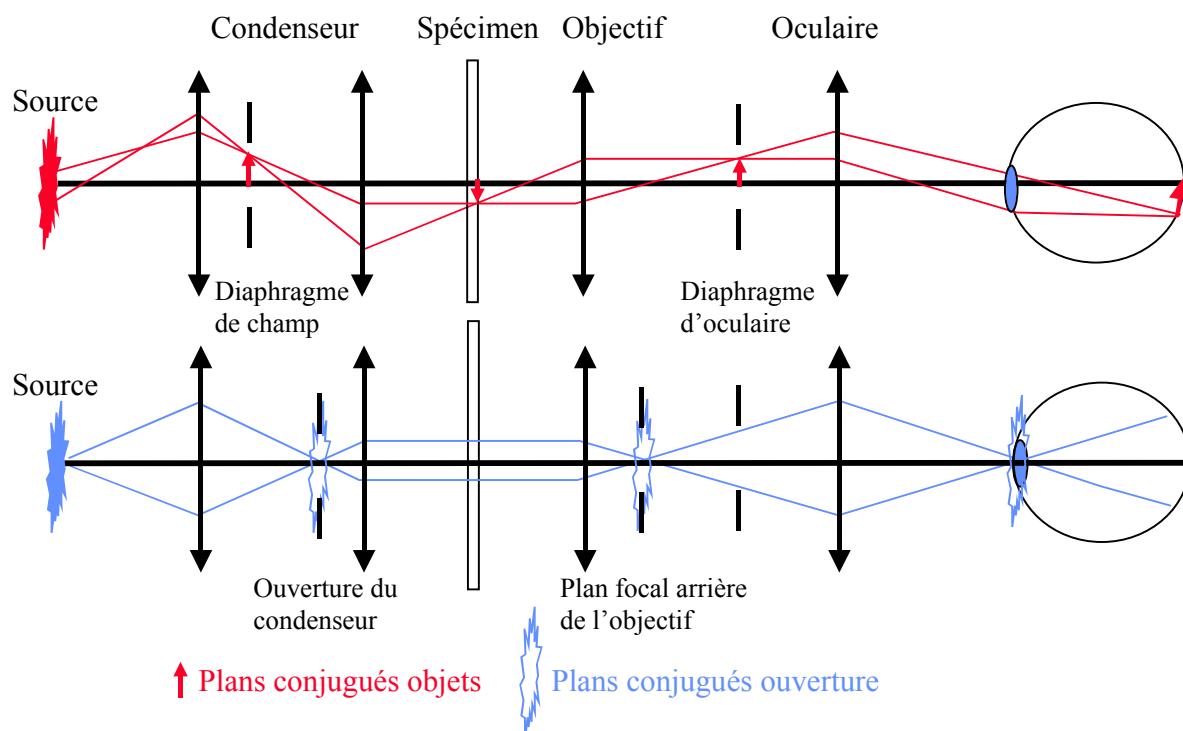


FIG. 3. Principe de l'illumination de Köhler

Si l'on place un diaphragme à une quelconque de ces positions, on étend ou l'on restreint simplement le champ d'observation.

Les plans correspondant à l'ouverture sont localisés au niveau de la source d'éclairage, du diaphragme d'ouverture du condenseur, du plan focal arrière de l'objectif, et de l'entrée du capteur (iris pour l'œil, objectif de caméra).

Si l'on place un diaphragme à une quelconque de ces positions, on ouvre plus ou moins le cône de lumière d'illumination et/ou de détection du spécimen, ce qui permet de régler la luminosité et le contraste des images, mais aussi la résolution.

Le réglage adéquat de l'illumination de Köhler est une étape très importante pour l'obtention de bonnes images. La compréhension de ce mécanisme permet aussi d'envisager des modifications au principe de base du microscope optique.

En particulier, le placement des filtres dans un microscope tire parti des plans conjugués. Tous les éléments susceptibles d'être contaminés par des poussières ou des taches (empreintes digitales) doivent être placés loin de tout plan conjugué du spécimen. Sinon, on formera sur l'image finale une image des défauts. Les filtres colorés, neutres, de polarisation sont soumis à cette règle impérieuse.

Inversement, si on désire superposer un réticule gradué à l'image finale pour pouvoir mesurer le spécimen, on le placera à l'emplacement d'un plan conjugué objet, souvent au niveau du diaphragme d'oculaire.

Nous verrons dans les exemples de microscopie décrits plus tard comment l'utilisation judicieuse des plans conjugués permet d'observer des caractéristiques physique très précises des échantillons.

Note : le schéma de la Figure 3 est valable pour un microscope en transmission uniquement. Dans le cas d'une épi-illumination, le schéma est légèrement différent, en particulier le positionnement des différents diaphragmes. Ceci est dû au fait qu'en épi-illumination, l'objectif sert à la fois de condenseur pour éclairer le spécimen, et d'objectif pour l'acquisition des images.

2.5. Microscopie en champ clair (Brightfield microscopy)

Dans le montage précédent, qui décrit la microscopie en fond clair, l'image est formée par les rayons de la source d'éclairage qui interagissent avec le spécimen. On observe donc en fait essentiellement des variations d'absorption et/ou d'indice du spécimen, qui se traduisent par des variations de contraste ou des variations de couleur au niveau de l'image formée.

Lorsque le spécimen présente peu de contrastes, on peut effectuer une préparation, qui consiste à marquer certaines zones à l'aide de colorants spécifiques. On observe alors la forme ou la distribution de constituants précis du spécimen.

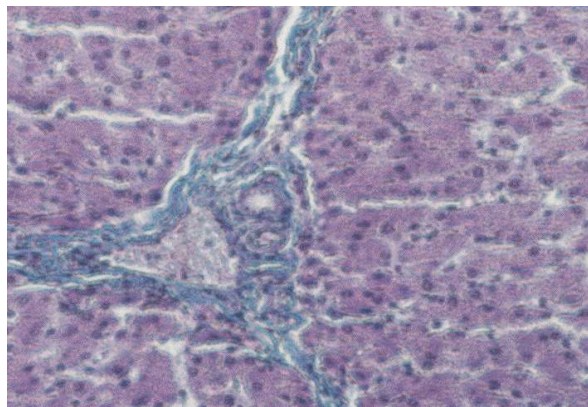


FIG. 4. Exemple de photographie prise en microscopie en fond clair. Coupe de foie de porc, le contraste est assuré par des agents colorants pour distinguer les différents types de tissus (Auteur : Bertrand Simon)

2.6. Microscopie en champ noir (Darkfield microscopy)

Lorsque le spécimen présente peu de contraste, et qu'on ne veut pas le colorer, il arrive alors que son image soit difficile à interpréter, car elle présente peu de variations. De plus, l'image est alors souvent noyée dans un fond clair uniforme (qui correspond à l'image non focalisée de la lampe source).

La compréhension du système d'illumination de Köhler permet alors de proposer une variante d'éclairage palliant ce problème, décrite par la Figure 5. L'idée consiste à éclairer le spécimen à l'aide uniquement de rayons ne pouvant être captés par l'objectif. On utilise donc un condenseur avec une ouverture numérique plus grande que l'objectif et l'on masque les rayons centraux. L'ouverture numérique (numerical aperture N.A.) est un nombre sans dimension caractérisant l'objectif. Il vaut $N.A. = n \sin \alpha$ où n est l'indice optique du milieu et α l'angle de capture maximal des rayons par la lentille d'entrée de l'objectif. Plus un objectif est ouvert, plus il est lumineux, et meilleure est sa résolution.

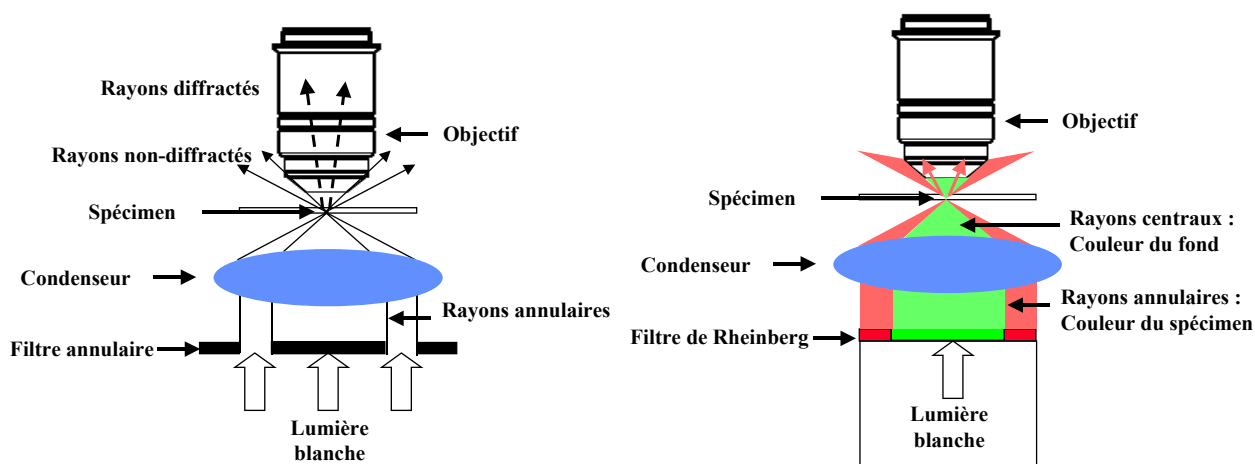


FIG. 5. Principe du microscope en champ sombre et principe de l'illumination de Rheinberg

Les rayons ne peuvent donc pas pénétrer l'objectif. Sans spécimen, on observe donc un champ uniformément noir (d'où le nom). Lorsqu'un spécimen est placé dans le champ, il va diffracter (au sens large du terme) une partie des rayons incidents. La lumière renvoyée par le spécimen peut alors être captée par l'objectif. On observe donc une image d'un spécimen lumineux sur un fond sombre.

2.7. Illumination de Rheinberg

La technique d'illumination de Rheinberg constitue une variante de la microscopie en champ sombre. L'idée est d'associer une ou plusieurs couleurs pour l'illumination du fond et l'illumination du spécimen.

Typiquement on associe une couleur de fond et une couleur de spécimen. Le filtre annulaire utilisé en microscopie darkfield est remplacé par un filtre bicolore, la partie centrale définissant la couleur de fond, la partie externe définissant la couleur de spécimen.

Les rayons annulaires ne sont normalement pas captés par l'objectif. En présence d'un spécimen, certains sont diffractés et interceptés par la lentille frontale de l'objectif. On observe alors une image formée d'un spécimen coloré sur un fond d'une autre couleur.

Cette technique est intéressante lorsqu'on utilise des couleurs complémentaires, ou encore avec des couleurs d'illumination correspondant aux couleurs naturelles du spécimen.

La Figure 5 décrit le principe de l'illumination de Rheinberg. La Figure 6 montre des exemples de filtres de Rheinberg. On peut utiliser une illumination annulaire, mais aussi radiale, selon les spécimens. On peut aussi jouer sur le rapport entre le trou central et l'anneau de couleur différente pour faire varier la luminosité du spécimen.

De manière générale, l'illumination de Rheinberg n'apporte rien en termes de résolution, mais permet souvent d'améliorer la perception du spécimen en jouant sur le contraste et les couleurs.

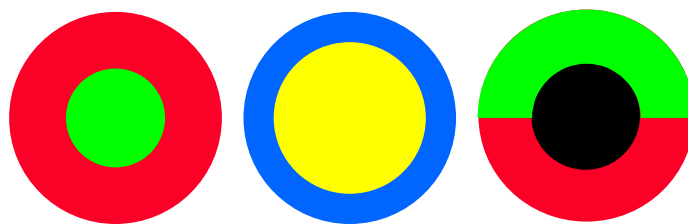


FIG. 6. Quelques exemples de filtres de Rheinberg

2.8. Microscopie polarisée

Une propriété essentielle de la lumière est sa nature vectorielle. On a donc très tôt pensé à utiliser cette propriété pour étudier la matière. De manière générale, on peut classer les matériaux en deux grandes catégories.

Les matériaux isotropes, comme les gaz, les liquides, les matériaux amorphes (non-stressés), ou des matériaux cristallisés sous forme cubique, ont des propriétés optiques identiques quelle que soit la direction initiale d'illumination de ces matériaux. Ces matériaux sont donc caractérisés par un indice optique unique.

Au contraire, les matériaux anisotropes ont des propriétés optiques différentes selon l'orientation de l'illumination. Pour les cristaux, on a donc différents indices optiques correspondant aux différents axes cristallins. Des matériaux amorphes, mais soumis à un stress mécanique, montrent une anisotropie induite. La forme du spécimen influence aussi ses propriétés optiques. Ainsi, les matériaux fibreux ont souvent des propriétés optiques différentes suivant que la lumière les éclaire avec une polarisation orientée selon l'axe des fibres ou perpendiculairement à celui-ci.

La microscopie de fluorescence tire parti de ces effets pour traduire sous forme de variations d'intensité ou de variation de couleur les propriétés optiques du spécimen, car l'œil humain (au contraire de certains animaux) est insensible à la polarisation du rayonnement. On peut ainsi, par exemple, directement distinguer des matériaux isotropes et anisotropes au sein d'un échantillon.

Un microscope polarisé est donc simplement un microscope en champ clair modifié.

On trouve tout d'abord un polariseur au niveau du condenseur pour illuminer le spécimen avec une lumière polarisée linéairement. Ce polariseur est souvent rotatif (de même que l'échantillon), pour pouvoir choisir l'angle de polarisation de la lumière incidente par rapport un spécimen. Ce polariseur ne doit pas influencer l'image finale, mais uniquement l'éclairage du spécimen. On le situerait donc au niveau d'un plan conjugué ouverture, par exemple l'ouverture du condenseur (Cependant, les propriétés des matériaux polarisants (tel que le film Polaroid) dépendent de l'angle d'incidence des rayons. On peut donc aussi placer le polariseur en sortie de condenseur, là où les rayons issus d'un point de la source sont parallèles).

Enfin, au niveau de l'objectif, on trouve un deuxième filtre polarisant, l'analyseur. Le polariseur et l'analyseur sont positionnés de façon à ce que leurs axes optiques soient à 90° l'un de l'autre. Dans cette configuration de polariseurs croisés, la lumière ne peut pas passer dans le microscope, on observe donc un champ sombre en l'absence de spécimen.

Notons qu'on trouve des microscopes polarisés en transmission ou en réflexion. De même, on peut travailler en lumière monochromatique ou en lumière blanche. De plus on peut étudier les spécimens en lumière polarisée avec ou sans analyseur, selon l'étude envisagée. Passer en revue les différentes techniques de microscopie en lumière polarisée va bien au-delà des objectifs de ce cours. Nous nous concentrerons donc sur le microscope polarisé en transmission en lumière blanche, avec polariseur et analyseur croisés, pour l'étude des matériaux anisotropes.

La Figure 7 décrit la configuration considérée.

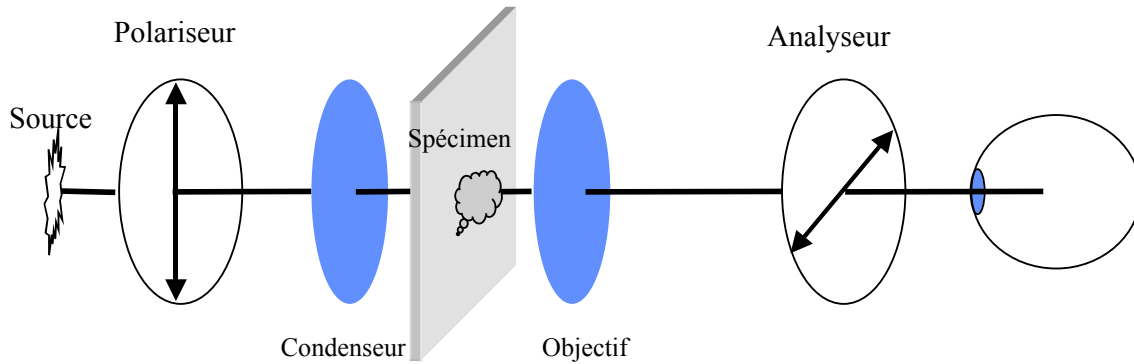


FIG. 7. Principe du microscope polarisé

Pour comprendre le mécanisme de formation des images dans un microscope polarisé, et en particulier pour comprendre les couleurs très particulières observées en lumière polarisée, observons l'effet d'un petit échantillon biréfringent sur la lumière incidente.

Un rayon incident polarisé frappe le spécimen. Si ce rayon arrive parallèle à un des deux axes optiques (ordinaire ou extraordinaire), il ressort inaffecté. Il sera donc arrêté par l'analyseur, et l'échantillon apparaît sombre.

Si le rayon incident frappe le spécimen sous incidence quelconque, il va être décomposé en deux rayons se propageant à des vitesses différentes, car le spécimen possède deux indices optiques différents n_1 et n_2 correspondant à ses deux axes optiques.

De ce fait, lorsque les rayons émergent, ils auront été déphasés l'un par rapport à l'autre par le spécimen.

Après passage dans l'analyseur, les rayons sont recombinaés. Mais comme ils sont maintenant déphasés, on observe un phénomène d'interférence. Ces interférences ne sont pas identiques pour toutes les fréquences. En fait, les couleurs très particulières observées en microscopie polarisée peuvent s'interpréter comme étant de la lumière blanche (la source d'éclairage est une source blanche), moins les couleurs pour lesquelles les interférences sont destructives.

Si l'on connaît l'épaisseur de l'échantillon, on peut mesurer directement la biréfringence du spécimen ($n_1 - n_2$) par identification de la couleur observée. Ceci nécessite cependant l'utilisation de composants complémentaires pour introduire une différence de marche connue.

En effet, les phénomènes d'interférences sont cycliques en fonction de la différence de marche, et la biréfringence est donc déterminée à une constante près. On utilise pour cela différents types de compensateurs optiques, dont le rôle est :

- l'identification des deux axes optiques du spécimen
- la levée de l'incertitude sur la valeur de la biréfringence.

On utilise couramment des lames de phase, qui introduisent un retard constant, comme les lames quart d'onde ou pleine onde, ou des compensateurs, qui introduisent une différence de chemin optique ajustable.

Le microscope polarisé est surtout connu pour ses applications en géologie, pétrographie, et physique des matériaux ou l'étude des polymères. Son utilisation en biologie est amenée à se développer, car de nombreux spécimens biologiques possèdent des propriétés biréfringentes (fibres de collagène, cellules nerveuses ou musculaires).

2.9. Microscopie à contraste de phase

Certains spécimens n'absorbent pas ou que très peu la lumière (spécimens de phase), et ils sont donc très difficilement observables en microscopie en transmission. Frits Zernike, physicien hollandais, a proposé dans les années 30 le microscope à contraste de phase pour résoudre ce problème.

La compréhension du microscope à contraste de phase fait appel à une interprétation légèrement différente du mécanisme de formation des images. Un spécimen de phase altère le faisceau d'illumination en le diffractant. L'œil humain n'est pas sensible à des variations de phase. Il faut donc trouver un mécanisme permettant de transformer les variations de phases en variation d'intensité. Pour cela, la microscopie à contraste de phase s'inspire du mécanisme qui crée les couleurs en microscopie polarisée : les interférences. On interprète l'image formée en terme d'effet de diffraction

L'ordre de diffraction zéro est la partie du faisceau d'illumination qui traverse le spécimen tout en étant inaltéré par celui-ci.

Pour les spécimens biologiques, Zernike a déterminé que le faisceau diffracté était retardé par le spécimen d'environ $1/4$ de longueur d'onde. L'idée est alors d'avancer l'ordre zéro de l'image d'un autre $1/4$ de longueur d'onde. Ainsi, l'ordre zéro (faisceau incident) et le premier ordre de diffraction (partie de faisceau altéré par le spécimen) sont maintenant en opposition de phase, décalé d'une $1/2$ longueur d'onde, et donc capable de produire des interférences destructives.

Cette méthode permet donc de transformer des différences de chemin optique en contrastes visibles à l'œil, d'où son nom. Une image observée apparaît comme sombre sur un fond plus clair, qui correspond à l'illumination de la source (sans spécimen, on observe un fond uniforme). Cette technique porte le nom de contraste de phase sombre ou positive.

Similairement, on peut aussi retarder l'ordre zéro de $1/4$ de longueur d'onde, de façon à créer des interférences constructives au niveau du détecteur. L'image apparaît alors comme plus brillante que le fond, d'où le nom de contraste de phase clair, ou positif. Cette technique est cependant moins couramment utilisée que la précédente.

La microscopie à contraste de phase qui permet de transformer un objet de phase en un objet d'amplitude est très intéressante en biologie car elle permet d'étudier des spécimens sans avoir à les colorer, comme en microscopie en transmission, où à les marquer par des fluorophores spécifiques. Les progrès qu'elle a permis ont été tels que l'invention de la microscopie à contraste de phase a valu à Frits Zernike le prix Nobel de physique en 1953.

La Figure 8 décrit le principe d'un tel microscope. On le comprend en partant du principe de l'illumination de Köhler. Tout d'abord il faut identifier un plan dans lequel on va pouvoir insérer la lame de phase permettant de décaler le faisceau incident par rapport au faisceau diffracté. L'endroit le plus approprié est le plan focal arrière de l'objectif, où l'on sait qu'on forme une image de la source (rayons bleus). Par contre l'ensemble des rayons diffractés (en rouge) traverse aussi ce plan. Pour affecter sélectivement les rayons de l'ordre zéro, on utilise donc un diaphragme annulaire pour la source, placé au niveau de l'ouverture du condenseur, qui est plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif. Il suffit alors de placer une lame de phase annulaire dans ce plan pour quelle soit automatiquement superposée à l'image du diaphragme du condenseur (à condition d'ajuster correctement les tailles respectives de ces deux composants en fonction de l'objectif utilisé) et ainsi déphaser les rayons sources sans déphaser les rayons diffractés.

La composante diffractée est souvent d'amplitude bien plus faible que la composante directe. De ce fait, la modulation observable sur l'image finale serait petite. Pour améliorer le

contraste, la lame de phase dans sa partie déphasante (+1/4 de longueur d'onde en contraste sombre) est aussi absorbante. Ainsi l'amplitude des ondes directes et diffractées est similaire et le contraste optimal.

Enfin, à cause de la dispersion chromatique, la lame de phase ne produit une avance de $\lambda/4$ que pour une longueur d'onde précise. On travaille donc souvent en lumière quasi-monochromatique en microscopie à contraste de phase en insérant un filtre devant le condenseur.

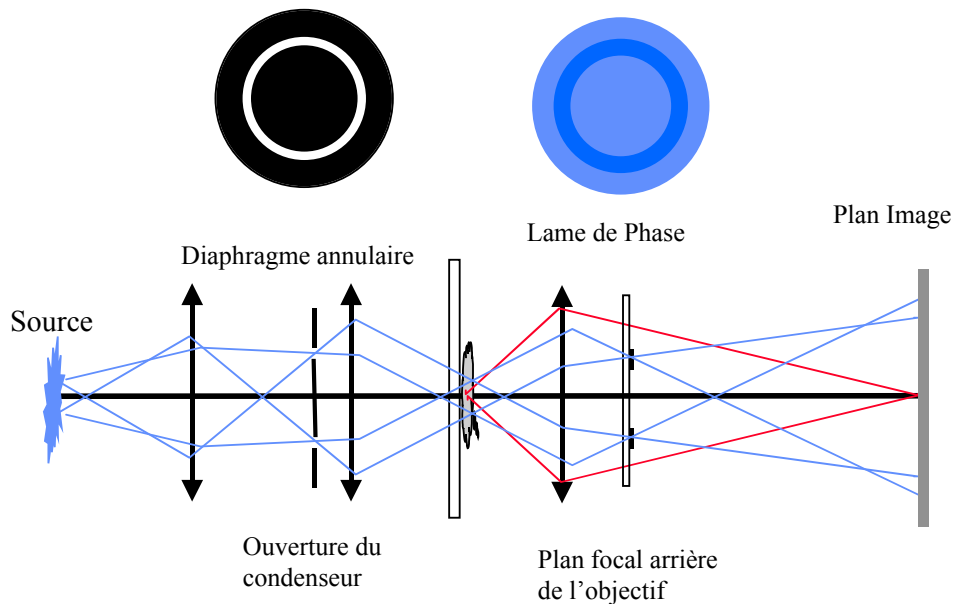


FIG. 8. Principe du microscope à contraste de phase

2.10. Microscopie de fluorescence

Dans un microscope optique, l'image est formée par les photons en provenance de l'objet. Ces photons peuvent être de deux types. Les photons émis par une source de lumière d'éclairage peuvent être simplement transmis (microscopie en transmission) ou réfléchis (microscopie en réflexion pour la métallographie par exemple) par l'objet.

En microscopie de fluorescence, le phénomène d'émission de lumière par l'objet est fondamentalement différent. Le passage d'une molécule d'un niveau d'énergie bas à un état excité (niveau d'énergie supérieur) se fait par absorption d'énergie.

Dans le cas de la microscopie de fluorescence, cet apport d'énergie est accompli par les photons émis par une source d'excitation, lampe à mercure ou krypton, ou laser. Pour revenir à son état bas, la molécule doit perdre cette même quantité d'énergie. Dans certains cas, cette perte d'énergie se fait partiellement par une émission photonique. Si la longueur d'onde de cette dernière se trouve dans la partie visible du spectre, il y a luminescence. Ce phénomène est de deux types, selon la durée séparant l'absorption de la réémission. Si cette durée est faible, on parle de fluorescence, si cette durée est plus importante, on parle de phosphorescence.

L'électron une fois excité perd cependant toujours une partie de son énergie sous forme de vibrations moléculaires ou de collisions avec d'autres électrons. En conséquence, l'énergie réémise sous forme lumineuse est inférieure à l'énergie d'excitation et la longueur d'onde d'émission est donc plus élevée : on observe à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde d'« éclairage ». La Figure 9 décrit les niveaux d'énergie concernés dans un processus d'émission et d'excitation d'un fluorophore (Diagramme de Jablonski).

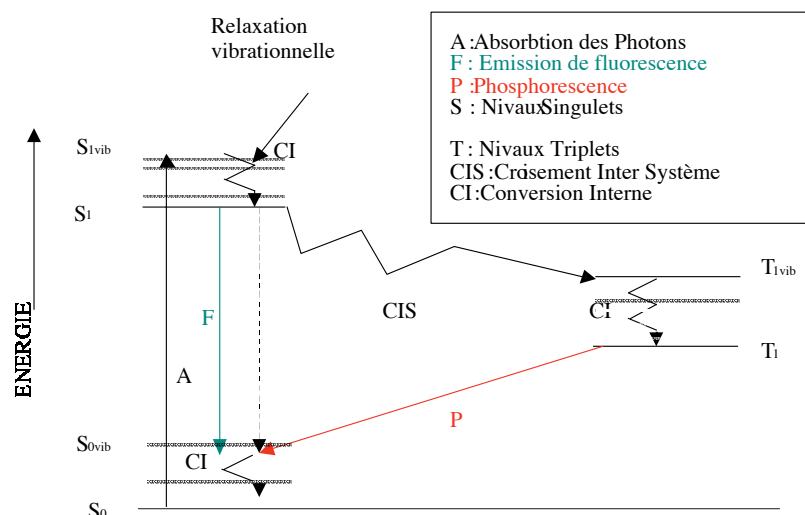


FIG. 9. Diagramme de Jablonski

Le microscope de fluorescence est un cas à part dans la mesure où on ne fait pas la détection à la longueur d'onde d'éclairage. Ceci est imposé par le phénomène de fluorescence, et présente ainsi l'avantage de permettre la détection de zones spécifiques qui sont celles qui présenteront une fluorescence. Celle-ci peut être naturelle (fluorescence endogène) ou provoquée par un marqueur. On a ainsi développé une immense variété de sondes spécifiques à telle ou telle zone ou fonction cellulaire.

Un point très important est qu'il faut pouvoir séparer le rayonnement d'excitation du rayonnement de fluorescence. On équipe donc le microscope d'un filtre dichroïque, qui réfléchit (et rejette donc) le rayonnement à longueur d'onde d'excitation éventuellement renvoyée vers le capteur tout en laissant passer le rayonnement de fluorescence.

L'image du spécimen est formée de manière globale à travers l'objectif pour être observée directement à l'œil ou enregistrée par une caméra. La Figure 10 indique les chemins optiques pour la détection d'un point dans le plan focal et d'un point hors plan focal.

A cause des limitations du système optique, l'image d'un point n'est pas un point, mais une tache d'Airy (a), qui définira la résolution du microscope. Notons aussi que dans un microscope conventionnel, l'image d'un point en dehors du plan de focalisation est aussi présente dans le plan de détection (plan image), bien que floue (b). De ce fait, l'image d'un plan, si elle contient bien l'image du plan observé, est aussi dégradée par les informations des autres plans. Les observations en trois dimensions sont donc difficiles, et il est impératif de restaurer les images avant toute analyse.

D'autres types de microscopes utilisent des changements de longueurs d'ondes entre l'excitation et la détection pour obtenir une information du spécimen. Citons par exemple, la génération de seconde ou troisième harmonique, où la réponse non-linéaire des parties non centro-symétriques du spécimen est exploitée, ou la microscopie Raman.

D'autre part, le microscope moderne peut être couplé à des techniques d'imagerie rapide (étude de la décroissance temporelle de la fluorescence), multispectrale (étude de co-localisation) ou spectroscopique. Les développements se poursuivent à l'heure actuelle pour combiner ces diverses techniques, et la microscopie donnant traditionnellement des images en 2 dimensions, après avoir évolué vers la 3D tends maintenant vers la 4D (espace + temps, espace + spectroscopie, espace + durée de vie de fluorescence) voire la 5D. Il ne fait aucun doute que les besoins de la recherche feront encore évoluer cet instrument.

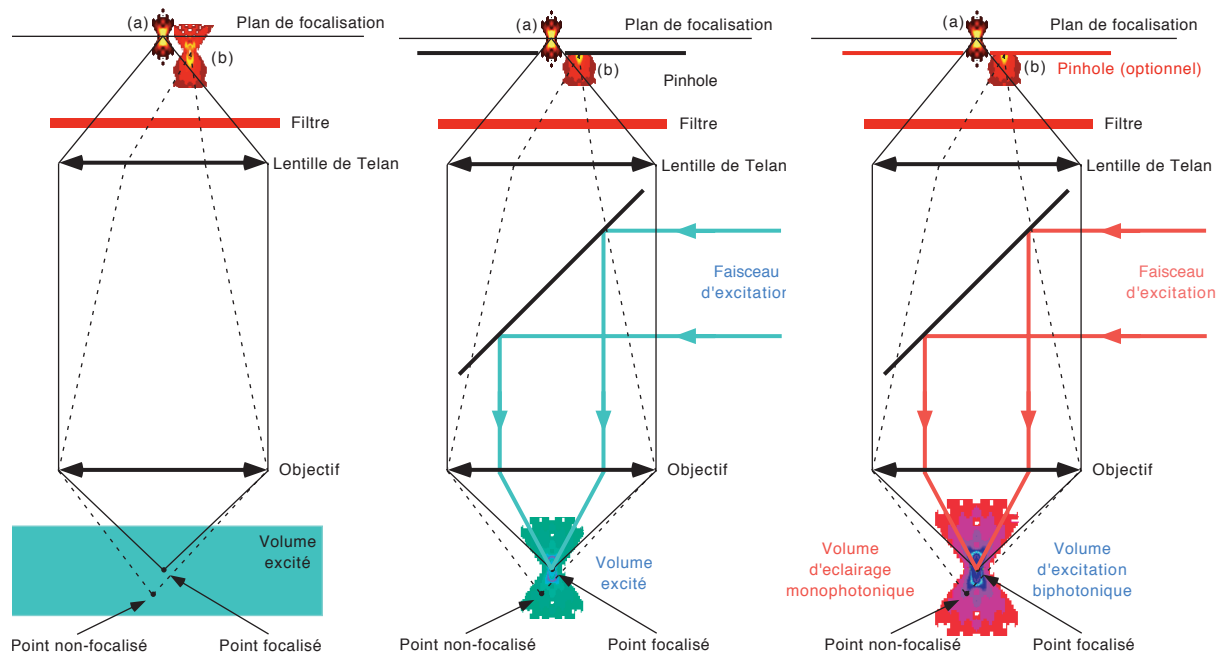


FIG. 10. Focalisation dans un microscope classique, confocal, et biphoton

2.11. Microscopie confocale

Pour palier les défauts du microscope conventionnel, on peut utiliser un montage confocal (Figure 10). L'illumination est alors faite par un faisceau laser focalisé dans le plan d'observation et qui balaye celui-ci. L'excitation n'est plus globale, mais quasi-ponctuelle.

D'autre part, la détection se fait au travers d'un « pinhole » en position confocale par rapport au spot d'excitation, c'est à dire que le système de détection ne voit que la zone de focalisation du faisceau d'excitation.

Ce montage permet de rejeter une très grande partie de la lumière (b) qui provient des plans autres que le plan de focalisation : la résolution verticale du microscope confocal est donc meilleure que celle du microscope conventionnel. Le signal est détecté à l'aide d'un photomultiplicateur, et l'image est donc formée point par point par balayage de l'objet.

Si l'image est bien meilleure en termes de résolution, on peut cependant noter trois défauts inhérents à ce système :

- L'acquisition est souvent plus lente, à cause de la nécessité de balayer le spécimen pour former une image.
- Le rapport signal sur bruit est généralement plus faible que pour un microscope classique.
- L'illumination par un faisceau laser focalisé engendre des intensités locales très grandes qui peuvent endommager le spécimen.

Ce système avait été proposé par Marvin Minsky dès les années 50. Il a cependant fallu attendre les progrès des sources (laser) et des détecteurs (sensibilité, rapidité), et des moyens de reconstruction (ordinateur) pour que la microscopie confocale prenne vraiment son essor dans les années 90.

Le microscope confocal est principalement utilisé en fluorescence, mais on trouve aussi des microscopes confocaux en réflexion. C'est d'ailleurs l'industrie de la

microélectronique qui a dès les années 80 ressentit le besoin d'une meilleure résolution pour les systèmes de diagnostics et de test des semiconducteurs (progrès de la miniaturisation).

Le microscope confocal est en principe aussi utilisable en transmission. Cette configuration est cependant très délicate (difficultés d'alignement) et donc peu utilisée.

2.12. Microscopie multiphoton

Le microscope confocal a constitué un très grand progrès, mais certains problèmes persistent avec les spécimens biologiques vivants. Lorsque les molécules d'un fluorochrome sont excitées, il arrive souvent qu'elles génèrent des radicaux libres toxiques pour le spécimen observé. Ainsi si l'on veut conserver ce spécimen vivant, il faut limiter le temps d'observation et l'intensité lumineuse. D'autre part, la fluorescence diminue avec l'exposition (phénomène de photobleaching). Le microscope bi-photon permet de réduire ces 2 phénomènes.

Pour cela, on utilise le phénomène d'absorption simultanée de deux photons. Ce phénomène a été prévu théoriquement dès 1931, mais il a fallu attendre 1990 pour le voir appliquer à la microscopie. C'est maintenant un outil «courant». L'énergie nécessaire à la transition est fournie par deux photons délivrant chacun la moitié de l'énergie nécessaire (on peut aussi considérer une excitation triphotonique). Comme la probabilité d'absorption décroît comme le carré de l'excitation, la transition d'excitation n'a lieu que dans un tout petit volume autour du point de focalisation (Figure 10). Loin de celui-ci, comme il n'y a pas d'excitation, il n'y a ni photobleaching, ni phototoxicité. La détection peut alors se faire de manière classique (sans pinhole) tout en conservant les capacités de coupes optiques. De plus, l'infra rouge est beaucoup moins sujet à la diffusion, ce qui permet l'étude en profondeur de spécimens diffusants comme la peau.

Un inconvénient est que seul des lasers femtosecondes (type TiS) délivrent des impulsions suffisamment puissantes permettant d'induire l'effet biphoton. On retrouve aussi les inconvénients du microscope confocal : relative lenteur d'acquisition, rapport signal sur bruit souvent faible..

Notons qu'il est aussi possible d'utiliser d'autres phénomènes non-linéaires, comme la génération de seconde harmonique ou l'effet Raman pour provoquer une émission lumineuse par le spécimen. Ces deux effets par exemple ont l'avantage qu'ils ne nécessitent pas forcément de marqueur spécifique, contrairement à la fluorescence.

3. OBSERVATIONS EN 3D

3.1. Microholographie

Une technique « naturelle » d'observation en 3D est l'holographie. Cette technique a donc été aussi adaptée à la microscopie. Elle a été utilisée entre autres avec succès pour l'étude d'écoulement de particules, la détonique, la vaporisation de fines gouttelettes (injecteurs de carburant). Ces phénomènes impliquent une observation dans un volume relativement grand (quelques mm^3 ou cm^3), sont rapides, et peuvent nécessiter des protections spécifiques (détonique). La microholographie fournit une solution adaptée car elle peut être très rapide (utilisation de lasers pulsés), et l'étude de l'hologramme en tant qu'objet revient (presque) à étudier l'objet lui-même. Cependant, son usage est resté encore limité. La principale raison en est la relativement mauvaise résolution obtenue qui est adaptée aux cas décrits précédemment, mais limitant pour les études actuelles de pointe en biologie par exemple. Ceci est en train de changer avec le développement de microscopes dédiés à ces applications, vendus par des sociétés commerciales.

3.2. Tomographie

On peut aussi imager un spécimen en 3D à partir de différentes vues 2D de ce spécimen. On réalise ainsi une tomographie, qui reconstitue l'échantillon en 3D à partir d'un ensemble de projection 2D. C'est par exemple la technique utilisée dans les scanners à rayons X, basée sur une transformation de Radon.

Cette technique a aussi été proposée en microscopie optique. La difficulté vient du fait qu'il faut faire tourner l'échantillon très précisément sous la lamelle du microscope. On se heurte alors à des problèmes de stabilité, mais surtout de manipulation de l'échantillon, qui ne peut plus être préparé entre lame et lamelle, comme c'est l'habitude en biologie par exemple. De ce fait cette technique est encore très peu usitée en microscopie optique. Notons cependant qu'il existe depuis peu des dispositifs commerciaux basés sur ce principe, mais dans le domaine X (microtomographie X).

3.3. Coupes sériées optiques

Par construction, le microscope (conventionnel, confocal ou (confocal) bi-photon) est un instrument fait pour prendre des images en deux dimensions. Par déplacement du plan focal à travers le spécimen, il est cependant possible d'acquérir une pile d'images 2D permettant de former une image en 3D. C'est la technique des coupes sériées (optical sectioning). On peut effectuer ce balayage axial soit en déplaçant l'objet via une platine motorisée, soit en déplaçant l'objectif par rapport au spécimen, généralement à l'aide d'un élément piézo-électrique.

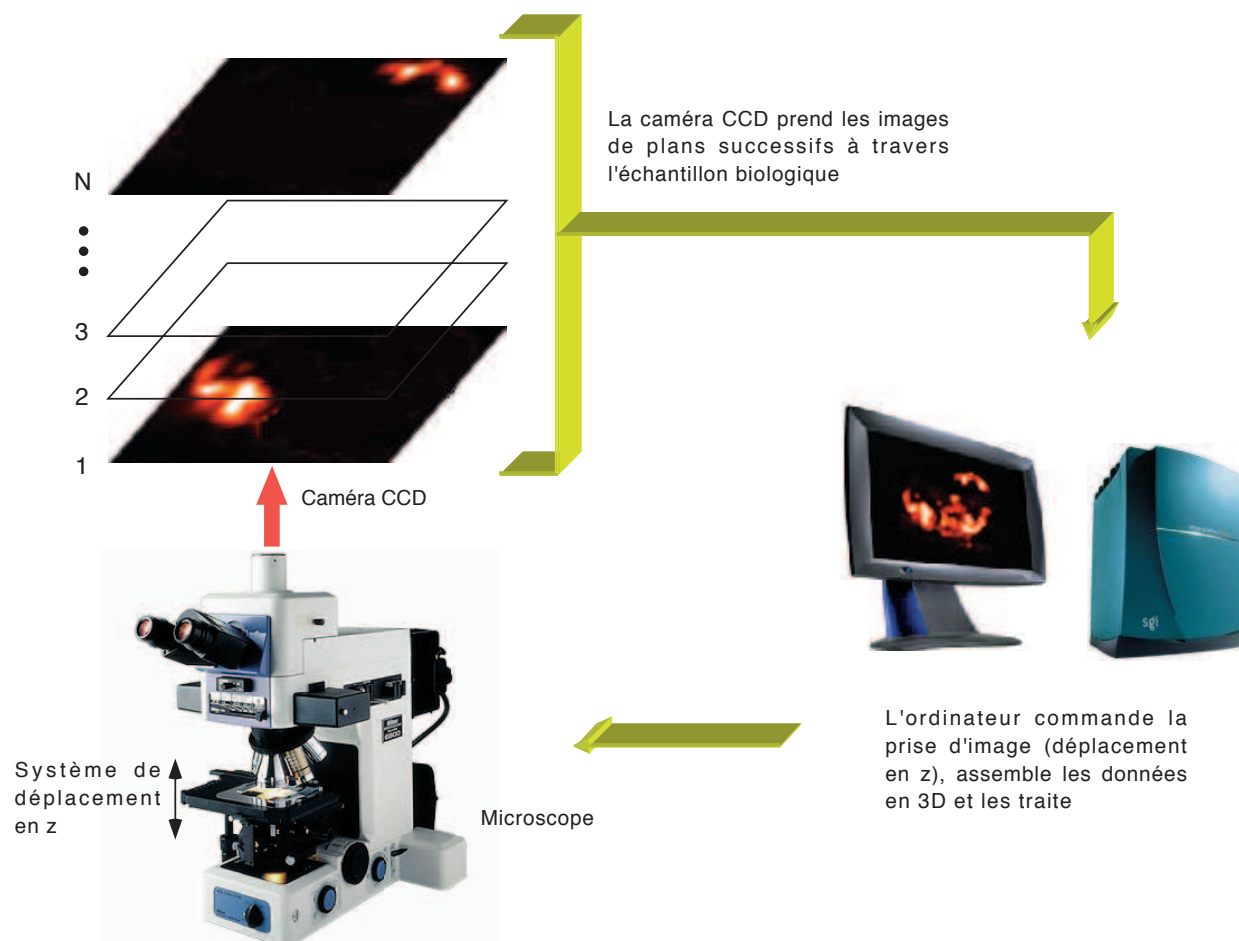


FIG. 11. Principe des coupes sériées optiques

La Figure 11 décrit un dispositif complet de mesure par coupes sériées. Il est constitué d'un microscope de fluorescence équipé d'un mécanisme de déplacement sur l'axe optique et d'un capteur permettant de former une image. L'ensemble du pilotage et de l'acquisition se fait à partir de la station informatique qui accompagne cet équipement. Elle peut également servir à traiter et à visualiser ces images, à partir de connaissances sur le système et d'outil de reconstruction.

Pour décrire correctement l'image en 3D ainsi obtenue, il est nécessaire de connaître les caractéristiques du système d'acquisition, et donc de l'objectif qui en est l'élément essentiel. Pour étudier les propriétés de l'objectif, il faut faire appel à la théorie de la diffraction. Cette théorie s'applique à tous les types de microscopes considérés ici. Nous verrons ensuite diverses techniques qui permettent de s'affranchir des limites imposées par le phénomène de diffraction, et d'obtenir une meilleure résolution.

3.4. Conclusion

Nous avons vu quelques types les plus courants de microscopie optique. Le microscope est optimisé pour fournir des images en 2 dimensions. Cependant, par couplage avec un dispositif de réglage de la mise au point et avec un ordinateur, on peut obtenir des images en 3D. Pour comprendre précisément le mécanisme de formation des images, et les limites physiques de cet instrument, il faut faire appel à la théorie de la diffraction de la lumière.

4. REFERENCES

Il existe de très nombreux ouvrages et articles traitant de l'optique et de la microscopie. La liste donnée ici correspond surtout à ceux ayant servi à la préparation de ce cours ou pouvant en constituer un complément direct. Les articles cités en particulier contiennent eux-mêmes de nombreuses références très intéressantes !

4.1. Ouvrages généraux d'optiques

M. Born and E. Wolf, *Principles of Optics*, Pergamon, London, 1991

E. Hecht, *Optics*, Addison Wesley, 2003

J.W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics*, McGraw-Hill, 1968

M. Bertin, J.P. Faroux, J. Renault, *Cours de physique : Optique et physique ondulatoire*, Dunod Université, 1986

4.2. Ouvrages généraux de microscopie

T. Wilson and C.J.R. Sheppard, *Theory and practice of Scanning Optical Microscopy* Academic Press, London, 1984

D.A. Agard, Y. Hiraoka, P. Shaw and J.W. Sedat, *Methods in Cell Biology, Fluorescence Microscopy in Three-Dimensions Vol. 30*", D.L. Taylor and Y. Wang eds., Academic, San Diego, Calif., 1989

J.B. Pawley, *Handbook of biological confocal microscopy*, Plenum Press, 1995

P. Török and F.J. Kao, *Optical imaging and microscopy. Techniques and advanced systems*, Springer Verlag, 2003

M. Abramowitz, *Microscope : Basics and Beyond Vol. 1*, Olympus, 2003

(téléchargeable à l'adresse : <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/index.html>)

J. James and H.J. Tanke, *Biomedical Light Microscopy*, Kluwer Academic, 1991

B. Herman and H. J. Tanke, *Fluorescence Microscopy (Microscopy Handbooks, 40)*, Bios Scientific; 1998

P. Robinson and S. Bradbury, *Qualitative Polarized Light Microscopy*, Oxford University Press, 1992

Enfin, un ouvrage très intéressant qui décrit aussi les nouvelles techniques de microscopie :

J. Mertz, *Introduction to Optical Microscopy*, Roberts and Company, 2009

5. SITES WEB (Note : la liste est loin d'être exhaustive !)

5.1. Quelques fabricants

Zeiss : <http://www.zeiss.com/>

Leica : <http://www.leica.com/>

Olympus : <http://www.olympus-global.com/en/global/>

Nikon : <http://www.nikon.com/>

Lyncée Tec : <http://www.lynceetec.com>

5.2. Sociétés savantes

Société Française des Microscopies : <http://www.sfm.fr>

Société Française d'Optique : <http://www.sfoptique.org>

European Microscopy Society : <http://www.eurmicsoc.org/>

Royal Microscopical Society : <http://www.rms.org.uk>

Microscopy Society of America : <http://www.microscopy.org>

5.3. Divers

Deux excellents sites, très complet (introduction, tutoriels, animation Java, nombreuses photos etc...) qui constituent un bon départ pour en savoir plus :

<http://micro.magnet.fsu.edu/> et <http://www.microscopyu.com/>

(le site microscopyu reprend en grande partie le précédent, mais le complète aussi)

Il existe une foule d'autres sites et il est impossible de les citer tous. Une demande dans un moteur de recherche donne aussi nombre de liens utiles.

Le site de la communauté française de la microscopie optique pour la biologie :

GdR Microscopie Fonctionnelle du Vivant : <http://www.gdr2588.cnrs.fr/>