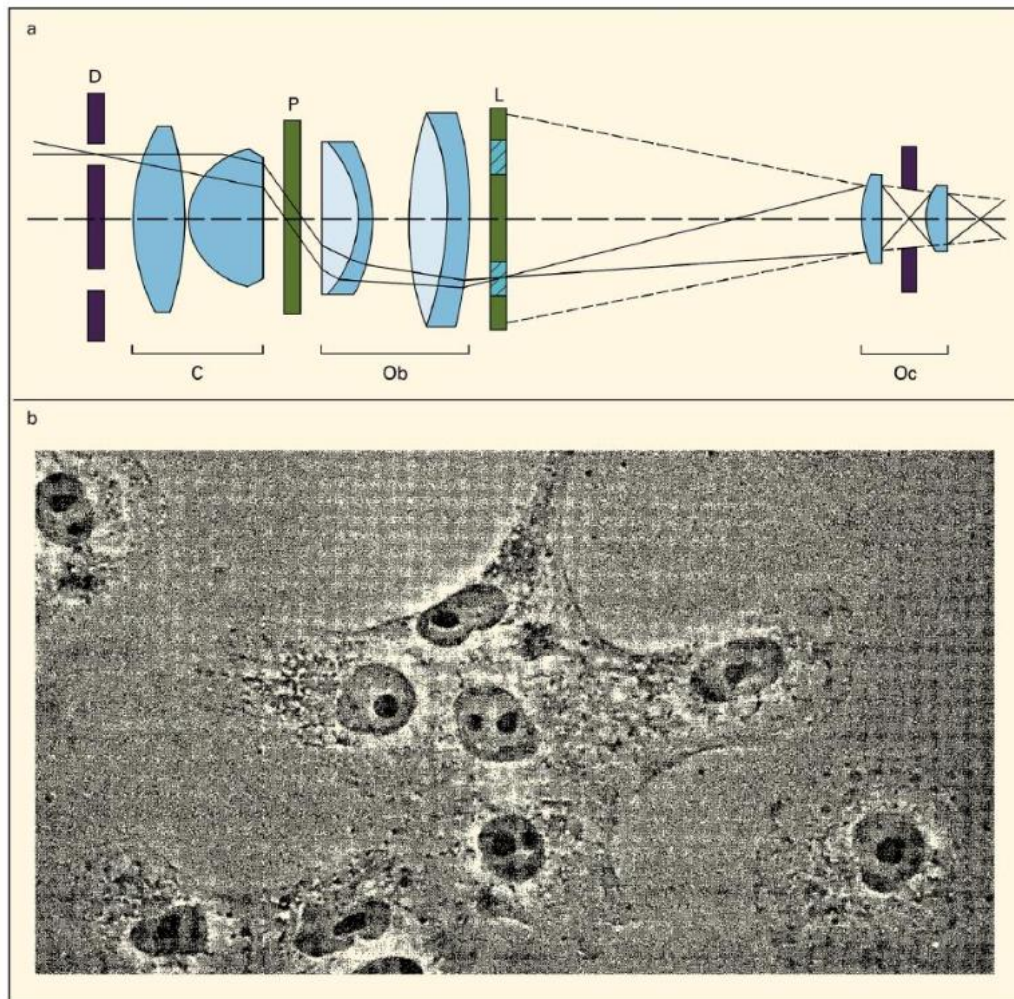


• Éclairages spéciaux pour l'observation d'objets transparents

La *microscopie à contraste de phase*, à *contraste interférentiel* et l'utilisation de la *lumière polarisée* permettent de renforcer les contrastes observés ou même d'en faire apparaître de nouveaux, en noir ou en couleurs, dans le cas de certains objets transparents ou opaques-réfléchissants. Il en est résulté, depuis 1950, une véritable révolution en microscopie.

Microscopie à contraste de phase

Parmi les divers perfectionnements du microscope photonique classique, le dispositif qui utilise le contraste de phase est certainement celui qui a fait le plus progresser les connaissances sur la physiologie cellulaire. La matière vivante observée au microscope optique à fond clair ne présente que très peu de contraste, puisque seuls apparaissent les contours des objets et quelques organites plus denses qui absorbent une partie de la lumière. La plupart des structures cellulaires qui n'absorbent pas la lumière sont invisibles bien qu'elles modifient l'onde lumineuse qui les traverse en créant un retard de phase par rapport aux rayons lumineux qui ne traversent pas ces structures. Le microscope à contraste de phase transforme ce retard de phase invisible à l'œil, en différence d'intensité lumineuse que l'œil perçoit très bien.



Contraste de phase. *Contraste de phase. En a, schéma de principe du contraste de phase où l'ouverture annulaire D du condenseur est conjuguée avec l'anneau de phase L de l'objectif. En b, micrographie de cellules fibroblastiques de singe en culture sur une lamelle de verre observées en contraste de phase. Grossissement de l'objectif 40. Champ total $250\ \mu\text{m} \times 190\ \mu\text{m}$ (J. Davoust, Centre d'immunologie, C.N.R.S. - I.N.S.E.R.M., Marseille).*

Représentons un microscope à contraste de phase. La lumière traverse d'abord l'ouverture annulaire D d'un diaphragme situé dans le plan focal du condenseur, le faisceau en cône creux traverse la préparation et est intercepté par la lame de phase annulaire L, qui doit coïncider avec l'image du plan D formée par l'ensemble condenseur-objectif, mais il existe aussi

de la lumière à l'intérieur du cône creux : c'est de la lumière diffractée par les détails de l'objet et qui passe par toute l'ouverture de l'objectif (en majorité en dehors de l'anneau de phase). Suivant la théorie de Frederik Zernike (1932), on obtient ainsi des images très contrastées des objets dits « de phase » complètement invisibles en éclairage à fond clair.

L'une des applications du microscope à contraste de phase est l'observation des cellules vivantes. Il est nécessaire que les préparations ne soient pas très épaisses afin que les structures ne se superposent pas, ce qui rendrait l'image difficile à interpréter. De très bonnes conditions d'observation sont réalisées avec des cellules en suspension, mises entre deux lames de verre distantes de quelques micromètres. De nombreuses cellules peuvent survivre ainsi pendant une heure environ, et il est possible de suivre leur évolution. Ce type de préparation convient pour les cellules libres, telles que les cellules sanguines ou les cellules d'organes à structure lâche (ganglions lymphatiques, rate, moelle osseuse hématopoïétique). Pour les observations de plus longue durée, il faut avoir recours aux techniques de culture de tissus ; les cellules s'étalent sur le support de la culture et peuvent ainsi être observées dans de bonnes conditions en microscopie en contraste de phase.

Microscopie à contraste interférentiel

Dans ces microscopes, le contraste de l'image est obtenu par interférence entre deux faisceaux lumineux issus d'une même source. Ces deux faisceaux interagissent différemment avec l'objet avant d'être superposés et d'interférer au niveau de l'image agrandie.

Ce type d'appareil présente un double avantage : d'une part, il augmente le contraste des objets qui, en fond clair, sont très peu contrastés ;

d'autre part, il permet de réaliser des mesures précises de l'épaisseur des objets et de leur indice de réfraction.

Les principes généraux de la microscopie interférentielle sont exposés dans l'article INTERFÉRENCES LUMINEUSES. Il faut distinguer trois types principaux de microscopes interférentiels :

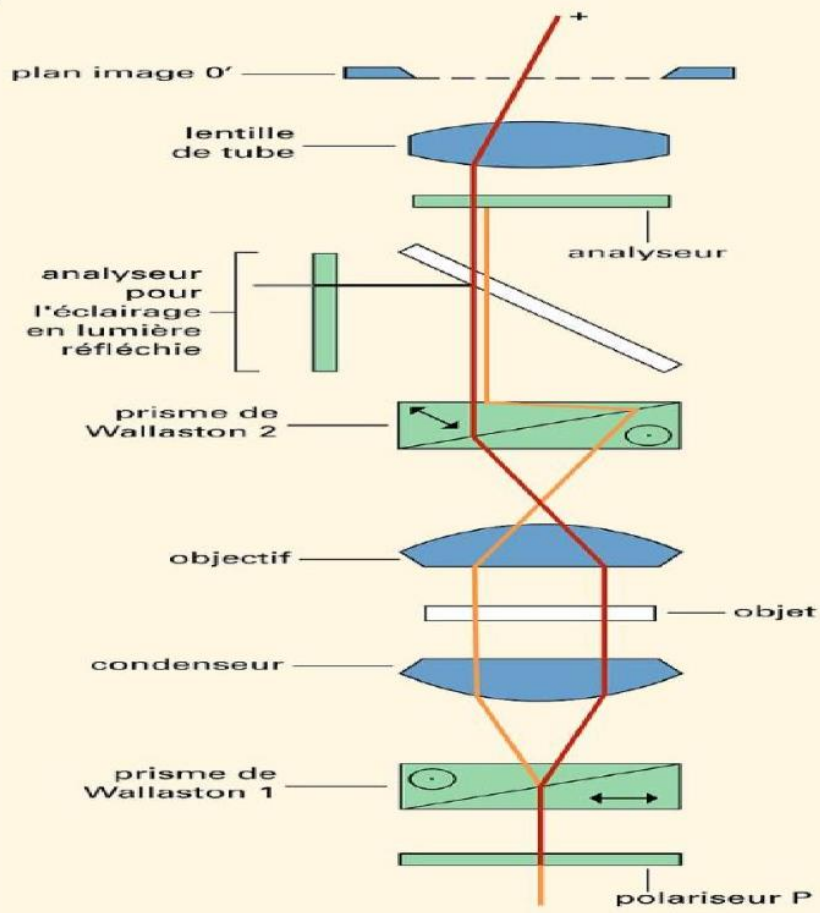
- ceux qui utilisent le schéma classique des interféromètres à deux ondes complètement séparées véhiculées par deux microscopes couplés ;

- ceux qui mettent en œuvre l'interférence entre deux ondes qui traversent l'objet (ou se réfléchissent sur lui), décalées latéralement d'une distance de l'ordre de $1/20$ à $1/3$ du diamètre du champ objet. Ces micro-interféromètres sont plus faciles à construire et à régler que les précédents, mais leurs images sont parfois plus difficiles à interpréter à cause de leur chevauchement (cf. INTERFÉRENCES LUMINEUSES) ;

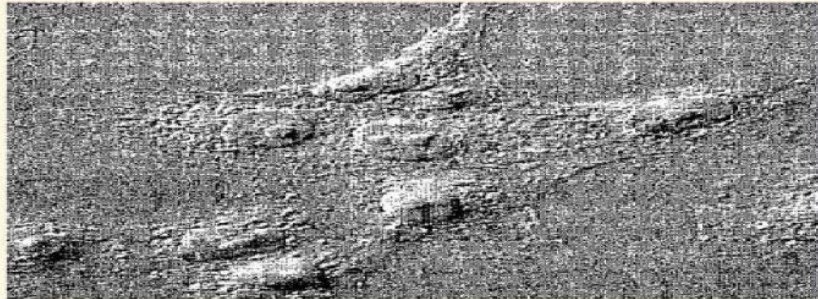
- ceux qui donnent le profil optique différentiel de l'objet (proportionnel à la première dérivée du profil normal). Ces microscopes utilisent deux éléments biréfringents (prismes) associés au condenseur et à l'objectif. Dans le cas d'objets réfléchissants, il n'y a qu'un prisme derrière l'objectif. Ce type de microscope à contraste « interférentiel différentiel » permet un examen qualitatif, de grande sensibilité, dans presque tous les cas d'objets de phase. Même des objets colorés (objets d'amplitude) sont observables en contraste interférentiel de ce type avec comme avantage une nette amélioration de la résolution. La microscopie à contraste interférentiel différentiel fournit ainsi des images d'excellente qualité, comparables à celles des microscopes à contraste de phase. Les mêmes structures d'objets biologiques sont retrouvées, mais avec des aspects différents. Le contraste interférentiel donne en général des images plus précises de différents plans de coupes à travers les échantillons cellulaires que le microscope à contraste

de phase. En outre, il permet une observation convenable de structures très réfringentes et d'objets relativement épais, ce qui n'est pas possible avec le contraste de phase en raison des halos clairs qui entourent toutes les structures et dont la superposition dans les préparations assez épaisses masque de nombreux détails. Les deux techniques – contraste de phase et contraste interférentiel différentiel – se complètent fort utilement.

a



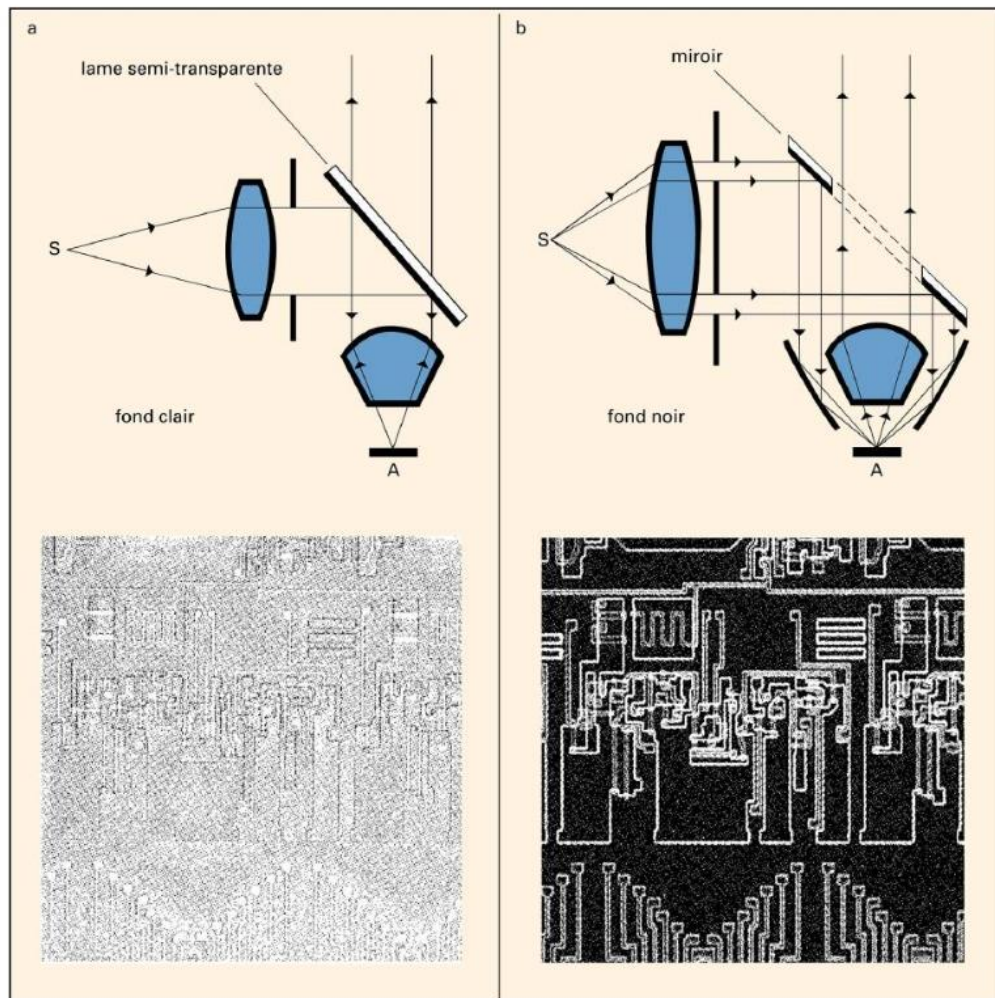
b



Contraste interférentiel différentiel. *Contraste interférentiel différentiel. En a, schéma de principe du contraste interférentiel différentiel où deux faisceaux lumineux très proches provenant de la même source traversent l'échantillon et interfèrent dans le plan image. En b, micrographie de cellules fibroblastiques de singe en culture sur une lamelle de verre observées en contraste interférentiel différentiel. Grossissement de l'objectif 40. Champ total 200 μm x 180 μm (J. Davoust, Centre d'immunologie, C.N.R.S. - I.N.S.E.R.M., Marseille).*

Éclairages par réflexion de type métallographique

L'éclairage des objets opaques étudiés en science des matériaux est généralement réalisé en faisant traverser l'objectif par la lumière incidente. L'objectif sert donc en même temps de condenseur. On utilise à cet effet une lame semi-transparente ou un prisme à réflexion totale. Les modes d'éclairage par réflexion en fond clair et fond noir sont aussi disponibles. De très nombreuses applications se développent dans le domaine de l'inspection et le contrôle de qualité des semiconducteurs assemblés sur les puces électroniques. Ces circuits électroniques intégrés sont généralement observés par ces modes d'éclairage par réflexion en fond clair et en fond noir à l'aide d'objectif spéciaux à immersion à eau (d'indice $n = 1,33$) afin d'améliorer la résolution sans endommager irréversiblement l'objet.



Éclairage par réflexion de type métallographique. Éclairage par réflexion de type métallographique. Schémas de principe du fond clair, en a, et du fond noir, en b, et vues correspondantes d'un circuit intégré (verlag moderne industrie AG, Landsberg am Lech).

La surface de l'échantillon métallique, par exemple, peut être polie comme un miroir, puis légèrement attaquée par un réactif convenable, tel l'acide picrique, qui, agissant plus ou moins sur les différents éléments, produit des effets de corrosion visibles au microscope métallographique.

Microscopes polarisants

L'emploi de lumière polarisée apporte souvent en microscopie des compléments d'information très précieux. L'examen en microscopie d'échantillons entre polariseur et analyseur peut, grâce aux phénomènes d'interférences dits « relatifs », permettre d'identifier des microcristaux biréfringents uniaxes ou biaxes.

Très utilisé en cristallographie et aussi en pétrographie, le microscope polarisant peut aussi rendre de grands services en biologie, car il fournit des renseignements importants sur l'état physique de la matière vivante.

Un microscope polarisant comporte, avant le condenseur, soit un prisme de calcite, soit une lame polarisante. L'analyseur constitué d'une façon analogue, est placé entre l'objectif et l'oculaire. Les orientations du polariseur, de l'analyseur et de la préparation sont en général réglables et repérables. Ces composants optiques à faces parallèles supplémentaires doivent être placés sur des trajets de lumière non focalisée, ce qui nécessite l'adjonction de lentilles supplémentaires et, en particulier, d'une lentille de tube qui reforme une image intermédiaire dans le microscope.

L'observation au microscope polarisant peut se faire aussi bien sur des préparations fixées que sur des préparations fraîches ou des cellules vivantes. Dans ce dernier cas, on peut étudier les variations de la biréfringence au cours de l'évolution de la cellule, par exemple dans la mitose (apparition du fuseau achromatique biréfringent).

Emploi des radiations invisibles

L'emploi de radiations invisibles (« lumières invisibles ») peut être avantageux pour l'étude de préparations présentant, en fonction de la longueur d'onde, une absorption très différente de celle qui a lieu en lumière visible. On utilise alors des systèmes optiques comportant des lentilles en silice, fluorine et/ou des miroirs. Les images sont

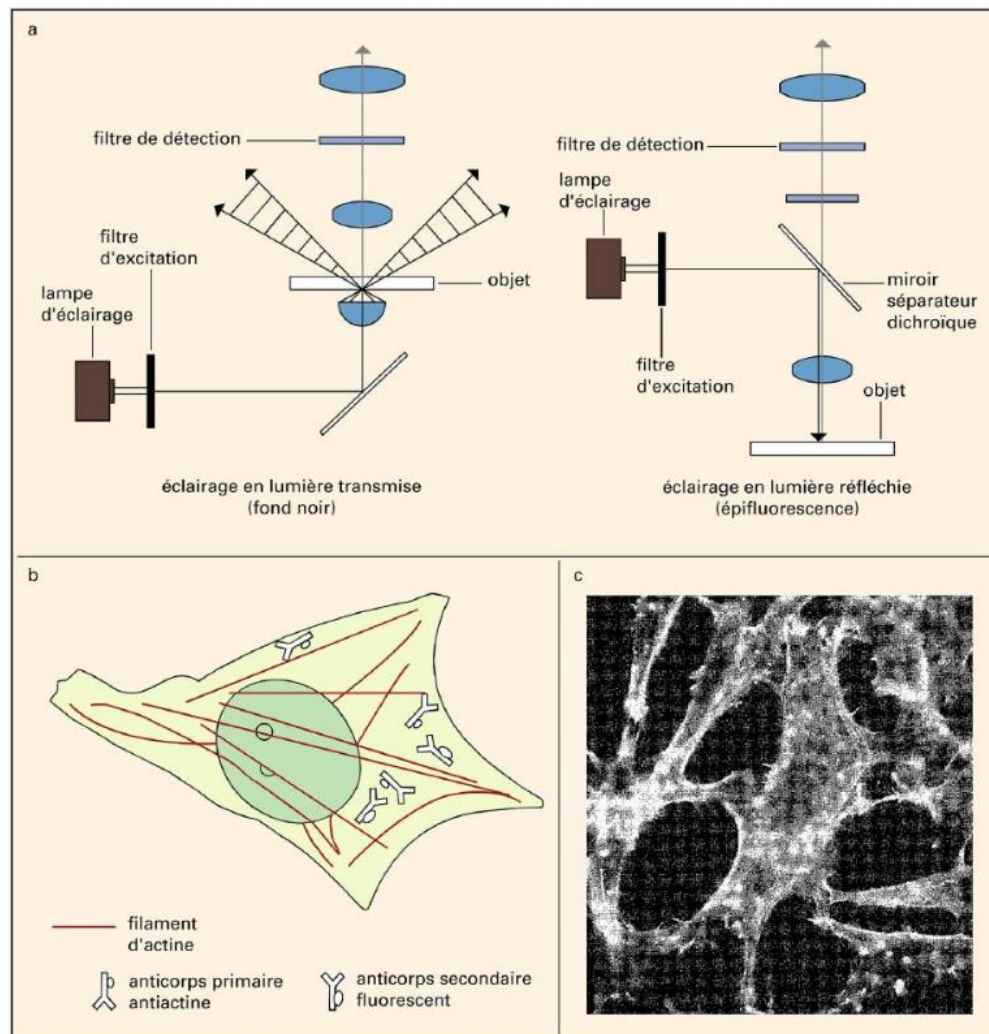
photographiées dans le cas de l'ultraviolet ; elles sont transformées en images visibles par un convertisseur électronique dans le cas de l'infrarouge. Par ailleurs, en plus de l'amélioration du contraste dans certaines préparations biologiques, le pouvoir séparateur du microscope est nettement amélioré grâce à l'emploi de lumières de courte longueur d'onde.

Microscopie par fluorescence

L'observation en fluorescence, originellement effectuée en lumière transmise grâce à un mode de fond noir, se pratique maintenant à l'aide d'un microscope de type classique dont la source lumineuse utilisée en mode de réflexion (épifluorescence) émet une quantité importante de radiations dans le vert, le bleu et le proche ultraviolet. Dans ce mode d'observation, l'échantillon fluorescent émet une lumière qui possède des propriétés spectrales différentes de la source d'excitation. La séparation optique de la lumière excitatrice de forte intensité et de la fluorescence émise de très faible intensité est assurée par des miroirs séparateurs (miroirs dichroïques) et des filtres qui séparent la lumière suivant sa longueur d'onde.

Dans la configuration dite d'épifluorescence, l'objectif est donc utilisé à la fois comme condenseur vis-à-vis de la source de lumière excitatrice et comme collecteur de lumière de fluorescence. Ce mode d'épifluorescence nécessite donc un puissant éclairage par réflexion associé à plusieurs combinaisons interchangeables de filtres de fluorescence permettant de renvoyer sélectivement la lumière d'excitation vers la préparation et de capter sélectivement la lumière de fluorescence émise par chaque type de composé fluorescent. On utilise généralement des lampes à vapeur de mercure sous pression ; des filtres spéciaux placés à la sortie de la source lumineuse ne laissent pénétrer dans le microscope que les radiations dont la longueur d'onde varie entre 300 et 600 nm. Les substances fluorescentes

généralement employées, telle que la rhodamine, la fluorescéine et les coumarines éclairées par cette lumière, émettent un rayonnement dont la longueur d'onde est supérieure à celle des rayons incidents (excitation de la fluorescence). Il suffit alors d'arrêter la lumière incidente avec un filtre, placé entre le miroir séparateur dichroïque et les oculaires, pour percevoir la lumière émise par l'échantillon fluorescent, qui devient source lumineuse.



Microscopie de fluorescence. Microscopie de fluorescence. En a, schéma de principe de l'éclairage de fluorescence en lumière transmise (fond noir) ou en lumière réfléchie (épifluorescence). En b, principe de l'immunocytochimie. Les cellules sont fixées puis perméabilisées avant d'être mises en contact avec des anticorps qui reconnaissent une structure ultracellulaire spécifique, ici les filaments d'actine. Dans le mode d'immunofluorescence indirecte, l'anticorps primaire est reconnu par un anticorps secondaire couplé avec une molécule fluorescente. En c, micrographie de fluorescence de fibroblastes de hamster en culture où l'actine sous-membranaire et filamentaire est marquée par la méthode d'immunofluorescence indirecte. Grandissement de l'objectif 100. Champ 100 μm x 100 μm (Centre d'immunologie de Marseille-Luminy).

Ce type d'observation, d'une grande sensibilité, est assimilable aux observations de fond noir et procure des images d'excellent contraste. La fluorescence de plusieurs marqueurs d'une même préparation peut être successivement et parfois simultanément observée en épifluorescence grâce à un changement de filtres ou grâce à des filtres à double excitation.

Il existe dans les préparations biologiques quelques substances, telles les porphyrines, la chlorophylle, qui sont spontanément fluorescentes (fluorescence primaire). D'autres substances deviennent fluorescentes après certains traitements (cyclisation par les vapeurs d'aldéhyde formique). Mais le microscope à fluorescence est surtout utilisé pour mettre en évidence des colorants fluorescents (fluorochromes), qui se fixent sélectivement sur certaines structures tissulaires ou cellulaires (fluorescence secondaire).

Le principal intérêt de cette technique est le marquage de protéines avec des corps fluorescents. Ainsi, on peut marquer un anticorps avec un fluorochrome et traiter avec cet anticorps une préparation qui contient l'antigène protéique correspondant ; dans ce cas, il se forme un complexe antigène-anticorps marqué. L'examen de la préparation au microscope à fluorescence permet de localiser l'anticorps marqué avec un fluorochrome, donc l'antigène correspondant qui a capté cet anticorps. Cette technique d'épifluorescence est très utilisée pour décrire l'architecture intracellulaire et tissulaire sur de très nombreuses préparations à des fins de recherches ou

afin d'établir le diagnostic de nombreuses maladies bactériennes et surtout virales. Les résultats sont rapides et très sûrs. La microscopie de fluorescence est d'un grand intérêt pour la localisation d'un ou de plusieurs gènes sur des chromosomes par hybridation in situ de sondes d'acides nucléiques fluorescentes. La grande sensibilité, la possibilité d'utiliser des caméras ou des systèmes d'acquisition ultrasensibles (caméra C.C.D. refroidies) et la facilité d'opérer des mesures quantitatives rendent cette technique très attractive.

Microscopie confocale

La localisation fine de molécules dans les cellules et les tissus fait exclusivement appel aux méthodes d'immunocytochimie, ou, pour les acides nucléiques, à l'hybridation in situ. En microscopie de fluorescence classique, décrite ci-après, les techniques de marquage avec des fluorochromes sont parmi les plus intéressantes car elles combinent un haut rendement et une grande simplicité d'utilisation. De plus, la mise à disposition de fluorochromes spécifiquement sensibles à différents éléments du milieu intra-cellulaire (pH, concentration en Ca^{++} , Na^+ , etc.) a étendu l'utilisation de la microscopie en fluorescence à l'étude de la physiologie cellulaire. L'inconvénient majeur des sondes fluorescentes est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. Lorsqu'une haute résolution est nécessaire, la seule solution était alors de tenter de reproduire le marquage en microscopie électronique sur des cellules fixées ou coupées par cryo-ultramicrotomie.

La microscopie de fluorescence en mode confocale a permis de pallier ces inconvénients puisque son principe est de pratiquer des « coupes optiques virtuelles » dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans un plan. De plus, le traitement informatique associé permet d'afficher des images provenant du signal enregistré par un

détecteur ultrasensible, et de reconstituer la distribution tridimensionnelle de la fluorescence dans le visible. On obtient couramment dans ces conditions une résolution latérale de $0,3\ \mu\text{m}$ et résolution verticale de $0,5\ \mu\text{m}$, y compris sur des objets de grande épaisseur (de $50\ \mu\text{m}$ et plus). Il est donc possible d'individualiser de très petites structures marquées – par exemple, des vésicules d'endocytose – et cela dans des cellules entières, des cultures organotypiques ou des couches épaisses de tissu.

Principe optique

Alors que le microscope photonique classique capte simultanément tous les points de l'objet, le microscope à balayage utilise une configuration optique dans laquelle la source est fortement focalisée sur un point qui peut être balayé. Dans le mode de détection confocale, mis au point par Marvin Minsky en 1957, le détecteur est simultanément focalisé sur ce même point. Le principe de cette nouvelle application repose sur la confocalisation extrême sur l'échantillon d'un faisceau laser d'excitation et du champ de l'objet perçu par le détecteur généralement constitué d'un photomultiplicateur de haute sensibilité, l'échantillon étant éclairé et interrogé point par point, et cela de façon successive grâce au mécanisme de balayage. Ce point joue le rôle de foyer excité et renvoie une lumière, réfléchie ou de fluorescence, selon le mode d'observation choisie, laquelle est d'abord captée, puis filtrée afin de s'assurer de sa nature (lumière de réflexion ou de fluorescence) avant d'être de nouveau focalisée sur un autre foyer situé devant le détecteur. On obtient ainsi une amélioration du contraste et une meilleure résolution avec une très faible profondeur de champ. L'association de la microscopie confocale au mode d'épi fluorescence permet de mesurer point à point la quantité de fluorescence émise par une préparation et ainsi de réaliser une véritable imagerie microscopique à trois dimensions.

La résolution des images avoisine la taille minimale d'une tache de diffraction à trois dimensions, c'est-à-dire de l'ordre de 0,2 à 0,5 micromètre dans les plans perpendiculaires et axial du microscope dans le visible grâce à des objectifs à immersion de forte ouverture numérique.

Applications

Le microscope confocal permet de réaliser des coupes optiques verticales ou obliques, ce qui bouleverse les traditions et permet d'observer des échantillons beaucoup plus épais qu'auparavant. Les applications biomédicales sont nombreuses : étude de la morphogenèse de tissus ou d'embryons ou de la localisation de gènes multiples sur des fragments de chromosomes par hybridation in situ et étude immunocytochimique de multifuorescence sur des tissus ou sur des cellules isolées.

La microscopie confocale représente le développement le plus important de la microscopie optique à balayage laser au cours des dix dernières années. L'image de coupes optiques y est réalisée point par point, ce qui permet des projections tridimensionnelles d'objets biologiques marqués en fluorescence tels que des organismes en développement. Il s'agit d'une véritable technique de microtomographie tissulaire et cellulaire qui permet d'atteindre une résolution submicrométrique à trois dimensions. Les applications en science des matériaux sont, elles aussi, en pleine expansion. Citons l'inspection des surfaces non planes avec mesure de rugosité, de fracture des matériaux, l'examen de circuits intégrés, le contrôle de qualité de l'état de surface de tous types de matériaux.

Les avantages de la microscopie confocale sont donc :

- d'améliorer considérablement le pouvoir de résolution des marquages par fluorochromes, sur cellules ou tissu fixé et coupé. La résolution obtenue permet d'aborder certaines questions qui nécessitaient l'utilisation de la

microscopie électronique. Cette dernière méthode, plus longue et de réalisation plus difficile, reste irremplaçable dès que l'on veut effectuer des observations ultrastructurales ;

- d'abaisser le seuil de détection, puisqu'il devient possible de voir quelques molécules de fluorochrome ;

- d'offrir de nouvelles possibilités d'investigation, en science des matériaux et en biologie. On peut en effet travailler sur des cellules vivantes, des tranches de tissu frais et suivre facilement l'évolution de marqueurs ou de flux ioniques avec une résolution subcellulaire.

Pierre FLEURY

Georges NOMARSKI

Jean-Paul THIÉRY

Jean DAVOUST

2. Microscopie électronique

Parmi les microscopes à radiations corpusculaires, seuls les microscopes électroniques sont très largement employés. Ils utilisent les propriétés ondulatoires des électrons accélérés auxquels peut être associée une longueur d'onde selon la relation de Louis de Broglie entre la longueur d'onde λ et la quantité de mouvement mv :

$$\lambda = \frac{h}{mv},$$

où h est la constante universelle de Planck égale à $6,62 \times 10^{-34}$ Js.