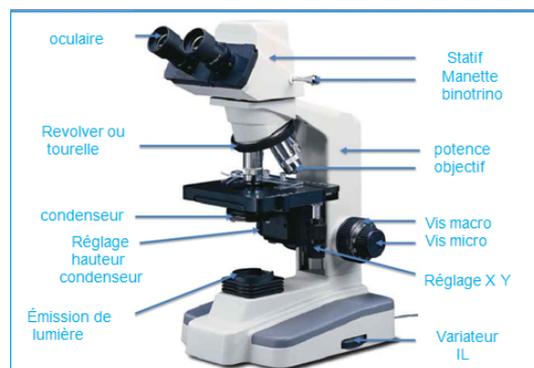


Chapitre I : Microscopie optique

Appareillages et techniques de caractérisation



Dr. Lezzar

Table des matières



I - Type du microscope optique	3
II - La microscopie en lumière direct	4
III - La microscopie à contraste de phase	5
IV - La microscopie à fluorescence	6
V - imagerie	7
VI - Résolution d'un microscope	8

Type du microscope optique

I

La technique de microscopie optique est la plus ancienne utilisée. Elle est également celle dont il existe le plus de variantes. Le principe est le suivant, la préparation est éclairée par une lampe. Les molécules à observer vont interagir avec la lumière de plusieurs façons :

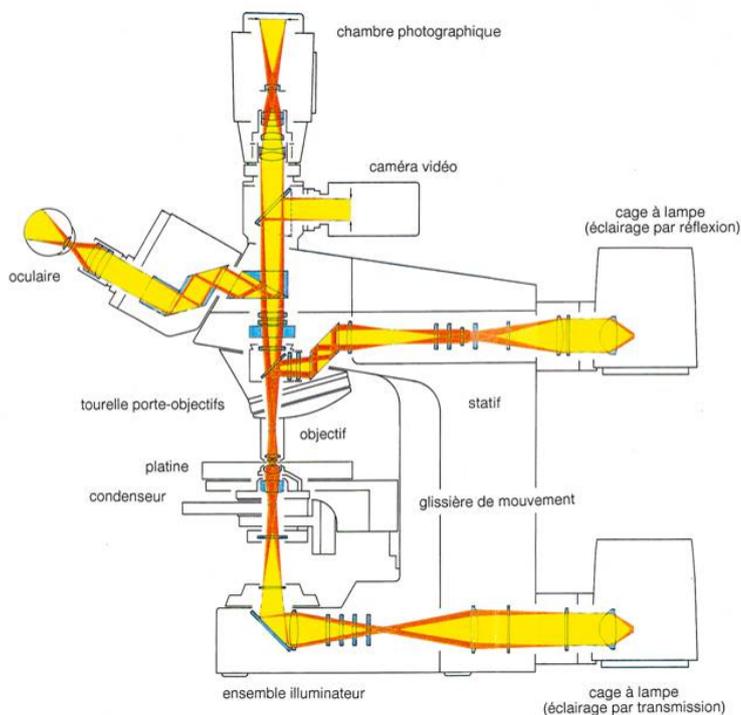
- Soit en absorbant certaines longueurs d'onde de la lumière. C'est la microscopie en lumière directe.
- Soit en provoquant un déphasage des différents rayons lumineux. C'est la microscopie en contraste de phase.
- Soit en émettant de la lumière à une autre longueur d'onde que celle d'origine. C'est la microscopie à fluorescence.

Donc il existe trois types de la microscopie optique :

La microscopie en lumière direct

La microscopie en contraste de phase

La microscopie à fluorescence



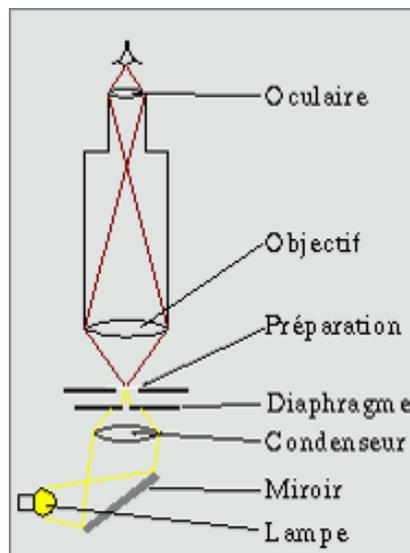
La microscopie en lumière direct

II

C'est le cas le plus simple. Les structures à observer sont colorées, soit naturellement soit par un marquage.

Méthode

La lumière blanche émise par une lampe est concentrée sur la préparation et la traverse.



Remarque

Selon l'intensité de la coloration, la lumière sera plus ou moins absorbée et l'endroit apparaîtra plus ou moins sombre, les zones peu marquées restant relativement claires.

Complément

La coloration est due à un colorant qui se fixe de façon préférentielle à une molécule particulière ou une famille de molécules

La microscopie à contraste de phase

III

Cette technique permet d'observer les cellules sans préparation ni coloration dans leur milieu d'origine

Fondamental

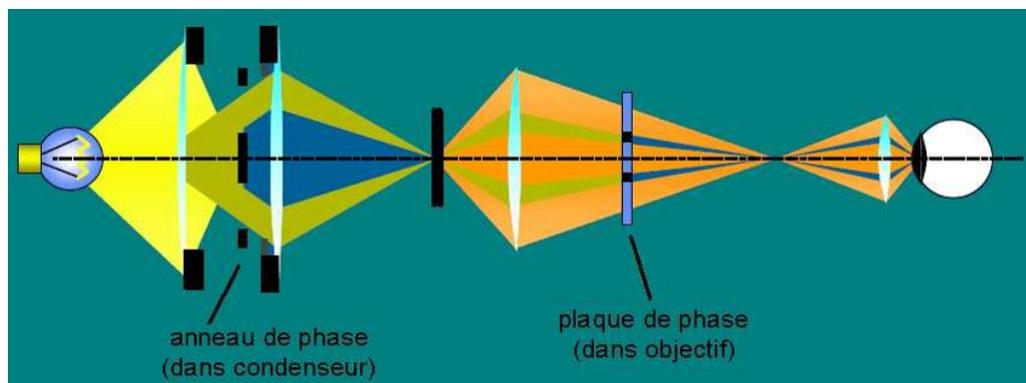
Le principe est basé sur le fait que les structures sont transparentes, mais qu'elles ont un indice de réfraction différent.

Méthode

L'anneau de phase crée une illumination de forme particulière qui traversera une couche fine de la plaque de phase.

Les rayons lumineux diffractés par les structures fines traversent la plaque de phase dans la zone périphérique, ou dans la zone centrale dont le rôle est de retarder légèrement les rayons diffractés qui la traversent.

Ces rayons retardés vont interférer avec ceux transmis sans retard sur la périphérie.



Remarque

Le déphasage différentiel entre ces rayons, crée le contraste et permet de mettre en évidence les structures. La différence entre ces deux ondes va produire l'image.

La microscopie à fluorescence

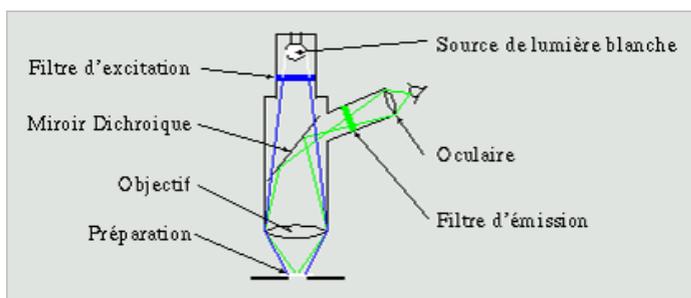
IV

Cette variante exploite la capacité qu'ont certaines molécules d'émettre de la lumière quand on les éclaire avec une lumière de longueur d'onde supérieure.

Méthode

Dans son principe, la lumière émise par une source de lumière blanche est filtrée pour isoler la longueur d'onde qui va exciter la préparation puis focalisée sur la zone d'observation par l'objectif.

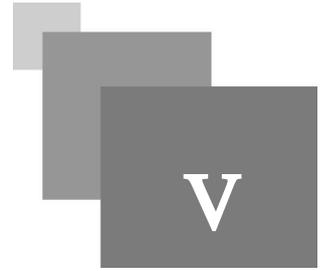
La lumière émise (fluorescence) est captée par l'objectif, filtré pour isoler les longueurs d'ondes parasites qui pourraient brouiller le signal (comme la longueur d'onde d'excitation par exemple) puis observée.



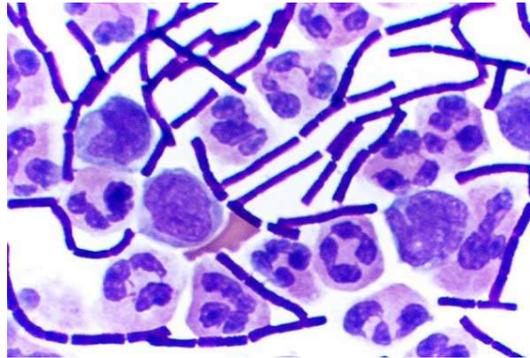
Remarque

L'image obtenue est inverse de celle obtenue en lumière directe, les objets observés se détachent en lumineux sur le fond sombre, le contraste final étant alors beaucoup plus élevé

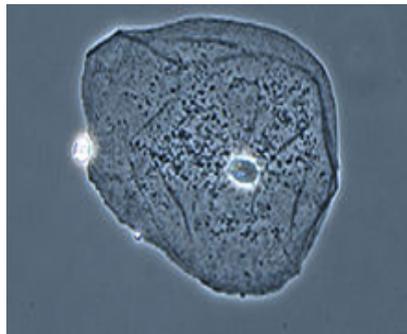
imagerie



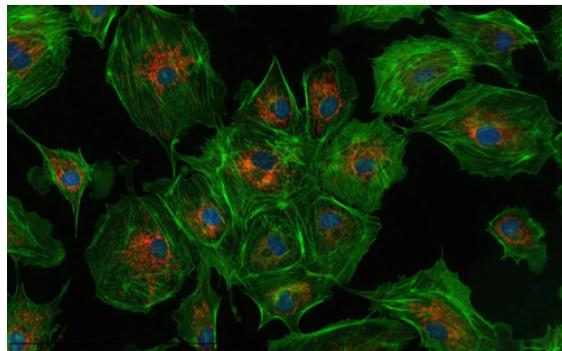
Observation en Lumière directe



Observation en contraste de phase



Observation en fluorescence



Résolution d'un microscope

VI

La résolution d'un microscope correspond au pouvoir de séparation entre deux points adjacents, la résolution de l'œil est d'environ 0.25 mm.

Attention

Le grossissement maximal atteint par un microscope optique est limité par la longueur d'onde du domaine du visible.

Remarque : résolution d'un microscope optique

Le pouvoir de résolution que permet d'observer un microscope optique est limité à 0.2 μm .

Méthode : Augmenté la résolution

Pour avoir une meilleur résolution il faut utilisé des courtes longueurs d'ondes.

Toute particule en mouvement lui associe une longueur d'onde (e-).

La longueur d'onde de l'électron est calculée comme suit :

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{m_0 \cdot v} = \frac{h}{\sqrt{2 \cdot m_0 \cdot eU}}$$

Fondamental

Augmentation de la tension d'accélération des électrons induit une diminution de la longueur d'onde donc pour cela on utilise des électrons en microscopie

Remarque

Le grossissement maximal atteint par un microscope optique est de l'ordre de 10^3 si on utilise des électrons on atteint 10^7 .

Comparés aux particules lourdes les e- peuvent être produits facilement et focalisés plus facilement.

Les microscopes faisant appel à des faisceaux d'électrons accélérés sont appelés microscopes électroniques.

Il existe 3 grandes catégories de microscopes électroniques :

- Microscope électronique à balayage
- Microscope électronique à transmission

- Microscope électronique à balayage en transmission