

Il y a « microscope » et « microscope »

par Marcel LECOMTE

Ce texte informatif est une compilation de divers articles qui sont en consultation libre sur Internet, agrémentés de considérations personnelles.

LE MICROSCOPE CLASSIQUE EN LUMIERE PHOTONIQUE

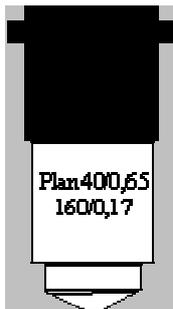
Rappel de notions de base.

Le grossissement total du microscope est le produit du grossissement de l'objectif multiplié par le grossissement de l'oculaire. Ainsi, un objectif 40x et un oculaire 10x fournissent un grossissement total de 400x.

Cela n'est plus valable lorsqu'on fait intervenir un appareil photo numérique ou non, sans lentille de compensation ; on obtient alors des grossissements supérieurs peu faciles à quantifier.

Les oculaires

Il y a plusieurs types d'oculaires qui se distinguent par le degré de correction chromatique, le grossissement et la distance pupillaire. L'oculaire le plus courant est le 10x de type C. Ce type d'oculaire est utilisé avec les objectifs achromatiques. Les oculaires sont aussi disponibles avec d'autres grossissements : 6x, 8x, 12, 5x, 15x et 20x. Certains oculaires sont construits pour permettre l'examen avec des verres correcteurs. La distance pupillaire, c'est-à-dire la distance à tenir entre la lentille de l'oculaire et la pupille, est plus grande. Ces oculaires sont désagréables pour celui qui ne porte pas de verres correcteurs car la position correcte est difficile à repérer. Une solution à ce problème consiste à placer des bonnettes qui permettent de s'ajuster facilement à la bonne distance de la lentille et de couper la lumière latérale.



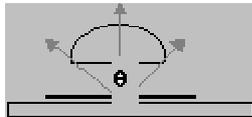
Une autre caractéristique des oculaires est le coefficient de champ. Ce coefficient détermine le diamètre du champ observé. Ainsi, un objectif 10x et un oculaire avec un coefficient de champ de 16 donne un champ de 1,6 mm de diamètre (1.600 μm) ce qui représente une surface d'environ 2 mm². Le diamètre du champ se calcule en divisant le coefficient de champ par le grossissement de l'objectif.

Les objectifs

Sur chaque objectif, on retrouve des inscriptions qui le décrivent. Voir à ce sujet un article complet dans le fascicule de synthèse). Par exemple, le mot « plan » décrit le type d'objectif. Celui-ci est planachromatique, c'est-à-dire achromatique avec planéité de l'image. Le terme « Ph » indique un objectif pour contraste de phase. Les nombres 40/0,65 indiquent le grossissement « 40x » et l'ouverture numérique « 0,65 ». Le nombre « 160 » donne la longueur du tube du microscope et « 0,17 » est l'épaisseur des lames couvre-objet prévues pour cet objectif. Les objectifs à immersion ont un anneau coloré près de la lentille frontale. La couleur de cet anneau indique le type de liquide à immersion à utiliser. Un cercle noir est pour l'huile tandis que l'anneau orange est pour la glycérine.

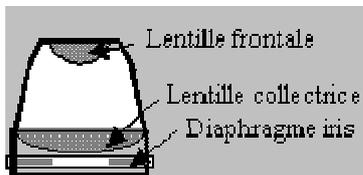
L'ouverture numérique

Pour les férus de mathématiques, l'ouverture numérique d'un objectif est le produit de l'indice de réfraction du milieu entre la lentille frontale et la lamelle par le sinus de la moitié de l'angle d'ouverture. Le grossissement maximum avec une image bien nette peut difficilement dépasser 500 fois l'ouverture numérique. Au-delà de cette limite, on peut voir apparaître des artefacts créés par des images de diffraction. L'air possède un indice de 1,00, tandis que l'huile à immersion affiche un indice de 1,515 ; l'huile permet donc des grossissements 1,5 fois plus grands.



L'entretien des objectifs

La principale manifestation d'un objectif sale ou rayé est une diminution de la netteté de l'image. Dans ces conditions, le champ microscopique est vu avec une impression de brouillard. Il existe dans le commerce des solutions spécialement conçues pour le nettoyage



des objectifs. Il faut cependant essuyer rapidement et complètement le liquide de nettoyage car, ces solutions peuvent à la longue endommager le ciment qui retient la lentille frontale. Certains utilisent un mélange éthanol/éther (50/50) qui a l'avantage de sécher très rapidement. Les rayures de la lentille frontale sont sans solution autre que le remplacement. Une cause fréquente et souvent ignorée de rayure est le frottement de la lentille sur le levier du porte-lame (celui-ci est en général plus épais que la lame). Il faut donc éviter de travailler aux limites du déplacement.

Le condensateur

La fonction du condensateur est de concentrer la lumière sur l'objet. Le champ éclairé par le condensateur doit être uniforme. La position normale du condensateur est presque complètement en haut avec la lentille frontale du condensateur très près de la lame. Nous verrons comment ajuster le condensateur à sa position optimale. Certains condensateurs possèdent une lentille frontale escamotable. Cette particularité est utile pour l'examen à faible grossissement. Basculer la lentille frontale, permet un éclairage plus uniforme aux 2,5x et 10x.

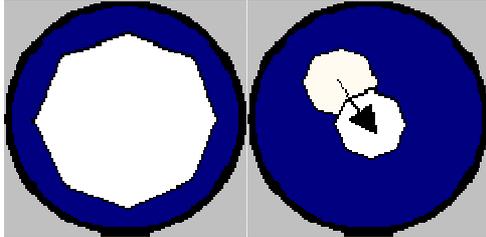
Dans chaque condensateur il y a un diaphragme. Le rôle de ce diaphragme est de sélectionner les rayons lumineux qui vont passer au centre de la lentille collectrice. L'iris du condensateur ne sert pas à ajuster la luminosité ; on se sert du rhéostat de la lampe pour cet ajustement. La fermeture de l'iris augmente la profondeur de champ et le contraste mais diminue la résolution et la luminosité. Un iris trop fermé peut aussi donner des images fantômes.

Les condensateurs classiques ont un n de 1,25 correspondant à celui de l'objectif classique 100x à immersion. Si on veut équiper un microscope avec des objectifs planapochromatiques de très haute qualité, dont le n est de l'ordre de 1,32 à 1,40, il faut idéalement utiliser un condensateur adapté.

Ajustement de l'iris du condensateur

L'iris du condensateur est idéalement positionné lorsqu'il est ouvert de 70 à 80% de l'ouverture numérique de l'objectif. Cet ajustement se fait en retirant l'oculaire et en regardant par le tube le diamètre du champ qui est éclairé.

Le centrage du condensateur



Cette opération se réalise en cinq étapes:

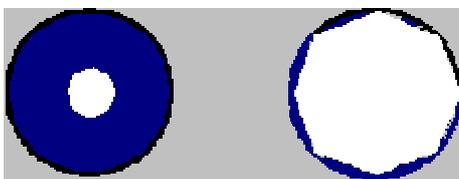
1. Enlever le filtre diffuseur
2. Placer une lame sur le microscope et faire la mise au point.
3. Fermer complètement le diaphragme de champ.
4. Centrer à l'aide des vis de centrage.
5. Replacer le filtre diffuseur.

Ajustement de l'éclairage de Köhler.

La zone éclairée par le diaphragme de champ doit correspondre au champ observé. Une zone éclairée plus grande que le champ observé provoque une diminution du contraste.

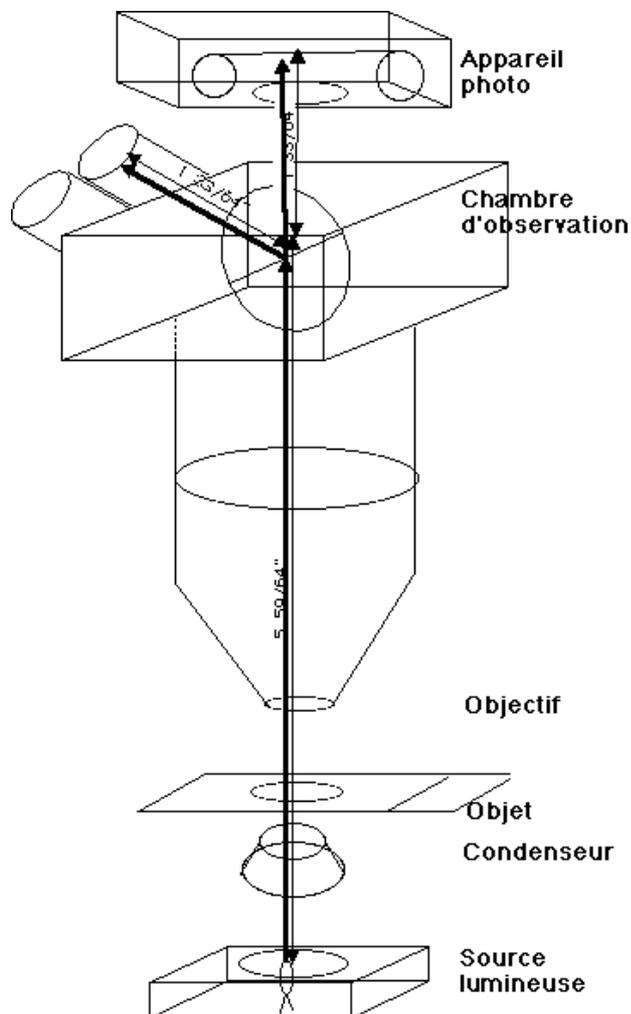
Cette opération se fait en plusieurs étapes:

1. Enlever le filtre diffuseur.
2. Placer une lame sur le microscope et faire la mise au point.
3. Fermer complètement le diaphragme de champ.
4. Descendre ou monter le condensateur pour que l'image de l'hexagone soit nette.
5. Centrer si nécessaire à l'aide des vis de centrage.
6. Ouvrir le diaphragme de champ pour que les sommets du polygone touchent à la limite du champ.



7. Replacer le filtre diffuseur.

ADJONCTION d'un APPAREIL PHOTO (argentique ou numérique) ou d'une caméra numérique, à un MICROSCOPE



L'appareil photo est situé dans le prolongement du tube du microscope de telle façon que la mise au point faite avec les oculaires coïncide avec le plan du film ou du capteur. Un miroir dichroïque permet de voir le champ qui va être photographié. Les conditions idéales sont évidemment réunies si on dispose d'une tête trinoculaire, avec un tube photo dans le prolongement du tube du microscope. Cependant, on peut utiliser des APN (appareils photos numériques) en les adaptant directement sur un des deux oculaires.

Photos papier noir et blanc : un filtre vert est préconisé et la sensibilité de l'émulsion doit être choisie en fonction des besoins.

Photos couleur : Un filtre bleu est préconisé pour les diapositives afin de compenser la dominante orangée. Un filtre rose est utile pour les tirages papier qui n'ont pas la même émulsion.

Photos numériques : c'est l'avenir de la photo microscopique, que ce soit avec des appareils compacts (APN), des reflex ou des caméras : la très grande sensibilité des capteurs permet de travailler dans des

conditions de lumière moins bonnes ; mais surtout, on obtient un résultat instantané et on dispose de la possibilité de réaliser un nombre illimité de prises de vues.

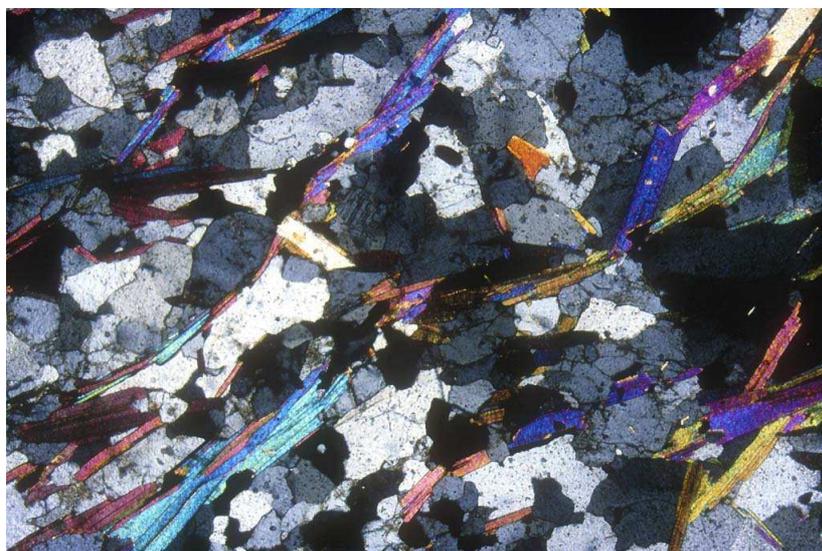
Photos en fluorescence : la faible intensité du rayonnement et sa décroissance (phénomène de fading) exigeaient en photographie classique l'utilisation d'émulsions très sensibles, de jouer sur les temps de pose et sur le développement ; les APN nous facilitent grandement la vie ; pour les signaux encore plus faibles, l'acquisition se fait avec des caméras CCD spéciales, réfrigérées, et l'image obtenue est traitée électroniquement afin d'intensifier les couleurs et les contrastes).

Une remarque importante : c'est une ineptie de faire figurer sur une photo le réticule du micromètre si on n'y joint pas la correction à appliquer. Les indications ne sont exactes en microns qu'avec un oculaire 10x, un objectif 100x et après étalonnage de vérification avec une lame spécialement prévue à cet effet.

LE MICROSCOPE EN LUMIERE POLARISEE

Le microscope polarisant, ou microscope polariseur analyseur est un microscope optique muni de deux filtres polarisants, appelés polariseur et analyseur. Il était utilisé au départ en pétrographie pour l'observation et l'identification des minéraux dans les roches. Le principe de fonctionnement repose sur l'utilisation d'un faisceau de lumière polarisée (par le polariseur). L'échantillon de roche à observer est préparé afin d'obtenir une lame mince, c'est-à-dire que la roche est coupée en un fin bloc collé sur une lame de verre, l'ensemble étant aminci par polissage jusqu'à une épaisseur de 30 μm environ.

Il a été « récupéré » par les mycologues, botanistes, entomologistes et biologistes en général.



*Micaschiste – photo
Frédéric Labaune*

La lumière polarisée : Un rayon lumineux d'une lampe halogène est constitué d'une infinité d'ondes. Chacune de ces ondes est caractérisée par une direction de propagation et une vibration, de longueur d'onde λ , perpendiculaire à la direction. Normalement la vibration des ondes se fait dans toutes les directions

avec égale intensité de sorte que la lumière est dite non polarisée.

Certaines substances, douées de ce que l'on appelle « dichroïsme », sont capables de favoriser un plan de vibration de sorte que les ondes de la lumière émergente vibrent toutes dans le même plan. On dit alors que cette lumière est polarisée. La sélection des ondes dans un polariseur se fait en éliminant celles qui vibrent dans la mauvaise direction, par réflexion, réfraction, transmission, dispersion.

Il y a plusieurs façons d'obtenir une source de lumière polarisée. La façon la plus simple et économique est d'utiliser un filtre polaroïd. Celui-ci est formé de molécules toutes orientées dans la même direction et figées dans une matrice plastique. Ce polaroïd est disponible en feuille que l'on peut découper à la taille et à la forme voulue. Un polariseur laisse passer seulement la lumière qui vibre dans une direction donc, tous les rayons émergents vibrent dans le même plan. Si on place dans le chemin du rayon polarisé un deuxième filtre polarisant qu'on tourne pour que son plan de vibration soit orienté à 90° par rapport au premier, il n'y aura alors pas de lumière émergente du deuxième filtre. On dit alors que les filtres sont en situation croisée. Dans cet arrangement le premier filtre est le filtre polariseur et le deuxième est appelé l'analyseur.

Certaines substances comme les sucres sont capables de faire tourner le plan de la lumière polarisée. Si on place une solution de sucre entre les filtres croisés d'un polarimètre, on

devra tourner l'analyseur d'un certain angle soit à droite (dextrogyre), soit à gauche (lévogyre) pour obtenir de nouveau l'extinction de la lumière.

La microscopie en lumière polarisée

Pour faire de la microscopie en lumière polarisée, il faut donc deux filtres polariseurs. Le premier filtre est placé dans la tête du microscope et le deuxième est placé avant le condensateur soit dans le porte-filtre ou sur l'ouverture de la lampe. Ce dernier filtre est tourné pour obtenir l'extinction complète de la lumière. Cette configuration permet ainsi l'examen d'éléments capables d'influencer le plan de la lumière polarisée les rendant ainsi visibles dans un fond noir.

Biréfringence : Un rayon lumineux qui passe d'une phase à une autre avec un certain angle par rapport à la normale subit une déviation appelée réfraction. Avec un corps transparent, on peut décrire une propriété physique appelée indice de réfraction. L'indice de réfraction est le rapport entre la vitesse de la lumière dans le vide et la vitesse de la lumière dans l'objet. Pour l'air, ce rapport est très proche de 1,00 tandis que l'eau a un indice de 1,333. L'indice de réfraction d'une solution aqueuse varie avec la densité.

Dans un corps isotrope, l'indice de réfraction est unique quel que soit la direction ; mais avec certaines substances dites anisotropes, l'indice de réfraction n'est pas le même dans toutes les directions. Plusieurs cristaux sont anisotropes c'est à dire biréfringents. La manifestation la plus évidente de la double réfraction est le dédoublement d'une image vue au travers un cristal de calcite. Les deux rayons qui sortent d'un corps anisotrope sont appelés le rayon ordinaire et le rayon extraordinaire. Le rayon ordinaire et extraordinaire sont polarisés avec un plan de polarisation qui est normalement à 90° l'un par rapport à l'autre. Entre des polariseurs croisés, le cristal biréfringent est visible.

Utilité

L'examen microscopique en lumière polarisée est une nécessité par exemple pour l'identification des corps ovalaires graisseux. Ceux-ci contiennent des gouttelettes de gras renfermant des cristaux liquides de cholestérol qui prennent une apparence de croix de Malte en lumière polarisée.

La polarisation peut être aussi utile pour identifier certains cristaux. La biréfringence, forte ou faible avec ou sans dispersion chromatique, est une aide supplémentaire à l'identification.

Il est possible de mesurer l'indice de réfraction d'un cristal avec la lumière polarisée. Les mesures se font en utilisant un filtre jaune proche de la raie D du sodium. Lorsqu'un cristal isotrope est placé dans un milieu qui a un indice de réfraction différent, il se forme autour du cristal un halo appelé ligne de Becke. Lorsqu'on descend l'objectif, ce halo converge vers le cristal si l'indice de réfraction de celui-ci est inférieur au milieu. À l'inverse, si le cristal a un indice supérieur au milieu, le halo s'éloigne du cristal. Il existe des kits de milieu qui offrent un éventail d'indices de réfraction qui s'échelonnent de 1,40 à 2,00. Lorsque le milieu a le même indice que le cristal celui-ci perd l'effet de halo et devient peu visible.

Dans la plupart des minéraux, suivant la direction de polarisation, la lumière n'aura pas la même vitesse. Lorsqu'un rayon lumineux pénètre dans un cristal, il se dédouble en deux rayons de polarisation différente qui se propagent avec une vitesse différente, c'est la *biréfringence*. On peut aussi décrire ce phénomène comme une rotation de la polarisation. Le filtre analyseur placé après l'échantillon sélectionne à nouveau les rayons lumineux selon leur polarisation, ainsi, selon la quantité dont a tourné la polarisation (donc selon la nature des cristaux), ceux-ci apparaissent plus ou moins lumineux, voire de couleurs différentes. Certains cristaux sont quasiment isotropes et ne provoquent pas de biréfringence

(notamment les cristaux cubiques), et peuvent être facilement distingués des cristaux anisotropes.

À l'aide d'un compteur de points qui déplace la lame mince selon un pas constant à la surface de la platine du microscope, on peut connaître la proportion de chaque minéral dans la roche, et, par là, sa composition minéralogique quantitative.

Le microscope polarisant permet également d'analyser la disposition des minéraux entre eux, de déterminer leur ordre de cristallisation, d'observer leur arrangement selon des plans ou des alignements, de mettre en évidence la structure de la roche.

La **cristallographie** est la science qui se consacre à l'étude des substances cristallines à l'échelle atomique. L'arrangement spatial des atomes dans la matière est étroitement lié à ses propriétés. L'état cristallin est défini par un caractère périodique et ordonné à l'échelle atomique ou moléculaire. Le cristal est obtenu par translation dans toutes les directions d'une unité de base appelée maille élémentaire. Elle est en rapport avec des disciplines aussi diverses que la physique, la chimie, les mathématiques, la biophysique, la biologie, la médecine, la science des matériaux, la métallurgie ainsi que les sciences de la terre.

Le cristal, d'abord simple objet de curiosité, passionna les collectionneurs avant d'intriguer les savants qui, en étudiant sa structure, ébauchèrent les premières théories sur la constitution intime de la matière. La loi des indices rationnels ou des troncatures simples fut définie par l'Abbé Haüy en 1774. Par observation du phénomène de clivage de la calcite, il a déterminé les « molécules intégrantes », c'est-à-dire les parallélépipèdes identiques constituant les cristaux et suite à cela, il a été déduit que chaque face d'un cristal peut être repérée dans l'espace par des nombres entiers.

La matière solide est composée d'atomes, que l'on peut voir comme des boules élémentaires qui s'assemblent. Elles peuvent s'assembler de plusieurs manières : quelques boules s'assemblent pour former une molécule, c'est le cas des gaz, des liquides, des solides moléculaires, des polymères (caoutchoucs, plastiques, papiers, protéines...), ces matériaux comportent des milliards de molécules semblables. Les boules s'agencent de manière irrégulière ; on a alors de la matière dite « amorphe » ou « vitreuse », comme par exemple le verre, ou encore elles s'entassent de manière ordonnée, c'est alors un cristal.

Le « cristal parfait » est un modèle utilisé pour représenter la structure de la matière cristalline. Ce modèle considère qu'un cristal est un empilement ordonné et infini d'atomes, d'ions ou de molécules.

Le cristal est un solide à structure constituée d'atomes ordonnés dans un réseau périodique et même tripériodique et symétrique. Il a des propriétés de symétrie avec des axes directs et inverses, des miroirs, des plans et des centres de symétrie.

Un cristal peut être isotrope (même indice de réfraction de la lumière dans toutes les directions) ou anisotrope (deux indices différents dans deux directions perpendiculaires).

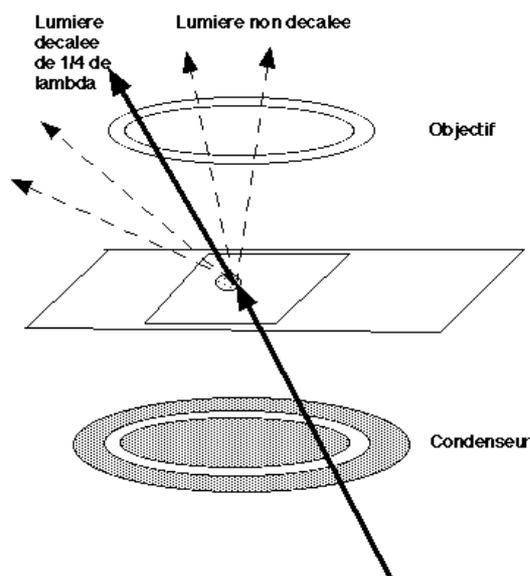
La maille élémentaire est le plus petit volume cristallin conservant toutes les propriétés physiques, chimiques et géométriques du cristal. Elle est définie par trois vecteurs qui génèrent ainsi six paramètres de mailles : les trois longueurs des vecteurs a , b , c et trois angles α , β , γ .

Un réseau est un ensemble de points ou « nœuds » en trois dimensions qui présente la propriété suivante : lorsque l'on se translate dans l'espace selon certains vecteurs, on retrouve exactement le même environnement. Il y a donc une périodicité spatiale. Cela permet de définir sept systèmes réticulaires de base : cubique, hexagonal, rhomboédrique, quadratique (ou tétragonal), orthorhombique, monoclinique et triclinique.

Leur analyse donne des informations sur des substances cristallines organiques et inorganiques (distance entre atomes, agencement spatial des atomes, identification de phases cristallines, taille des cristallites).

LE MICROSCOPE à CONTRASTE DE PHASE

La microscopie en lumière ordinaire nous montre les différences de teintes de gris ou de couleur entre un objet et son milieu. Un objet incolore et transparent d'indice de réfraction n , observé dans un milieu incolore et transparent d'indice de réfraction n , est à peu près invisible sauf si le bord de l'objet produit une diffraction importante. Dans ces conditions, un rayon lumineux qui traverse l'objet suit un chemin différent de celui qui traverse uniquement le milieu on dit alors que l'objet a une différence de phase.



Un microscope à contraste de phase (ou en contraste de phase) est un microscope optique qui transforme en niveaux de gris les différences d'indices de réfraction entre deux structures. Il visualise ainsi des structures transparentes quand leur indice de réfraction diffère de celui de leur voisinage, permettant ainsi de voir des objets autrement invisibles.

Imaginé en 1930 par le Hollandais Frits Zernike (1888-1966), il permet d'étudier des cellules vivantes, sans devoir leur infliger une coloration (et donc de les conserver vivantes), et a valu à son concepteur le prix Nobel 1953. Le système optique est composé de deux anneaux dits de phase. Un de ces anneaux est placé dans

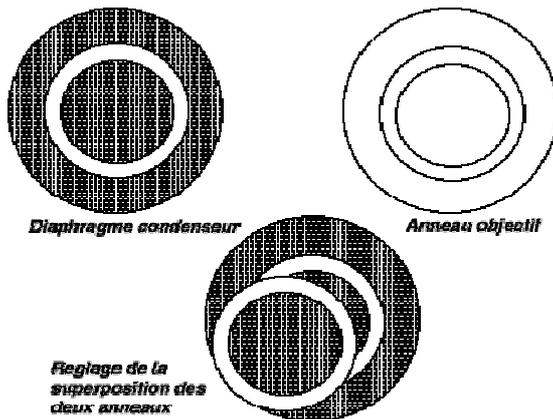
l'objectif tandis que l'autre est dans le condensateur. Le diamètre des anneaux varie avec le grossissement de sorte que le condensateur à contraste de phase a plusieurs anneaux qui correspondent aux différents objectifs Ph. Quand le bord d'une structure produit une diffraction suffisante, la lumière qui le traverse subit un déphasage par rapport aux autres rayons lumineux. Les anneaux filtrent ces rayons déphasés et il en résulte sur l'image un contraste accentué de la structure.



Héliozoaire, avec objectif Ph 20x – photo Dominique Prades

Le microscope à contraste interférentiel (mis au point par Nomarski et d'autres auteurs) repose sur un principe différent mais produit le même type d'image et a le même domaine d'utilisation. Un premier système optique dédouble le faisceau lumineux avant qu'il ne traverse l'objet et un second fait interférer les deux, produisant un contraste artificiel très marqué là où les rayons sont déphasés.

- **Principe** : la microscopie d'absorption usuelle repose sur les colorants (variation d'amplitude), mais il existe également des contrastes de densité entre les différents milieux traversés par la lumière (variation de phase).
- **Mécanisme**: la récupération des rayonnements diffractés va donner une image qui reflète les différents indices des milieux traversés. Pour ce faire, l'objet est éclairé par un anneau de lumière (diaphragme spécial du condenseur) ; la lumière transmise est également sélectionnée par un anneau situé dans l'objectif utilisé (les deux anneaux doivent être de même taille et se superposer dans le système optique, leur coïncidence fait l'objet d'un réglage pour un objectif donné). L'image observée est donc due uniquement à la différence d'amplitude du rayonnement diffracté.



La lumière qui traverse les deux anneaux est décalée de $1/4$ de longueur d'onde par rapport à la lumière diffractée par l'objet reprise par l'objectif.

Ajustement des anneaux de phase

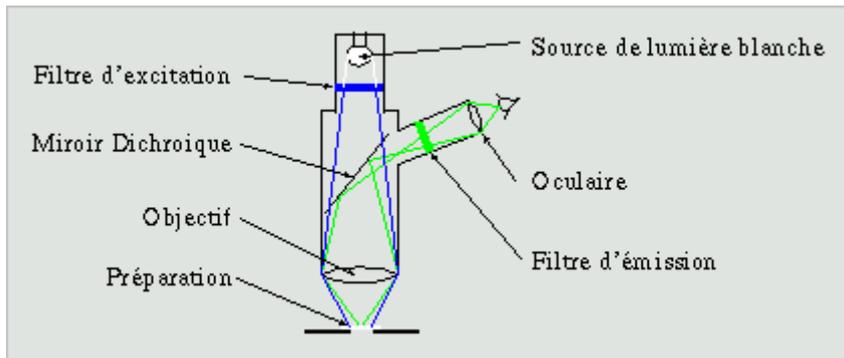
Pour que l'image obtenue soit optimum il faut ajuster la convergence des anneaux. L'opération est relativement simple.

1. Régler l'éclairage de Köhler avec le diaphragme de champ.
2. Sélectionner un objectif Ph de faible grossissement.
3. Sélectionner l'anneau de condenseur spécifique.
4. Retirer un des oculaires et le remplacer par le télescope (viseur) d'ajustement.
5. Ajuster le télescope pour avoir une image nette de l'anneau de l'objectif.
6. Avec les vis d'ajustement du condenseur superposer les anneaux.
7. Remettre l'oculaire en place.

Il n'est normalement pas nécessaire d'ajuster tous les objectifs.

LE MICROSCOPE À FLUORESCENCE

La **microscopie en fluorescence (ou à fluorescence)** est une technique de microscopie optique qui tire profit du phénomène de fluorescence pour observer divers composés. Elle fait désormais partie des méthodes de recherche classiques en biologie.

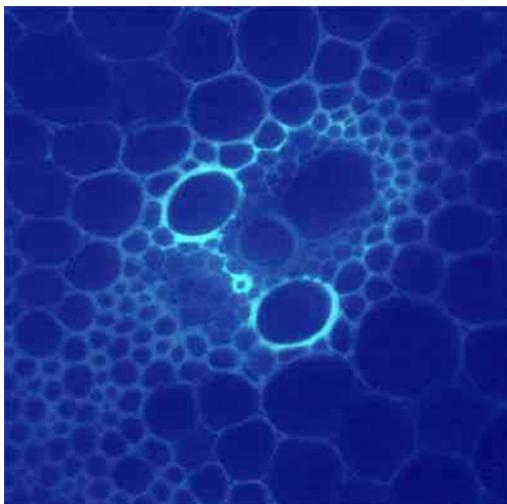


Un microscope à fluorescence est un microscope photonique équipé de deux lampes, une lampe ordinaire pour une observation classique par transmission et une lampe à arc pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres

d'émission (ou d'arrêt) permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité.

La fluorescence observée peut avoir plusieurs origines :

- Fluorescence naturelle d'une substance située dans la cellule, exemple : la chlorophylle fluoresce naturellement en rouge.
- Utilisation d'une substance fluorescente se fixant spécifiquement sur une structure. Il s'agit là d'un test de type cytochimique, exemple : le DAPI (Di Aminido Phenyl Indo) se fixe spécifiquement sur l'ADN et fluoresce en bleu.
- Utilisation d'une substance non spécifique fluorescente naturellement, comme la rhodamine et la fluorescéine. Cette substance est fixée sur un anticorps spécifique d'un antigène. La spécificité est due à l'anticorps. La fluorescence observée permet de localiser l'antigène.
- Traceurs de lignage cellulaire en biologie du développement : la rhodamine, la fluorescéine, le Texas red ou autre est fixé sur une molécule de dextran. Le tout est microinjecté dans une cellule et les cellules filles seront marquées au cours du développement embryonnaire.
- Intégration d'une séquence codant pour une protéine naturellement fluorescente dans le "gène" codant pour une protéine. La protéine recherchée devient naturellement fluorescente et les observations peuvent se réaliser "in vivo".



Fluorescence naturelle de la lignine (faisceau cribrovasculaire de feuille de blé) – photo Danielle REIS

La fluorescence est la propriété que possèdent certains corps d'émettre de la lumière après avoir absorbé des photons de plus haute énergie. La microscopie en fluorescence repose sur la formation d'une image par détection de cette lumière émise.

En fluorescence on distingue deux types d'objets : les premiers émettent de la lumière fluorescente par eux-mêmes, on parle de fluorescence primaire ou autofluorescence (chlorophylle, huile, collagène, vitamine A qui a une fluorescence verte...), les autres doivent être combinés à une substance fluorescente pour émettre de la fluorescence ; on parle donc de fluorescence secondaire.

En microscopie de fluorescence, on peut donc visualiser directement des substances fluorescentes.

Pour des substances, des cellules, des molécules non fluorescentes, il est nécessaire de les marquer par des substances appelées fluorochromes, comme par exemple le DAPI qui marque l'ADN et fluoresce en bleu. On utilisera également l'orange d'acridine (qui réagit avec l'ADN et met en évidence les noyaux), et l'auramine phéniquée pour la coloration des mycobactéries (tuberculose, lèpre - (coloration de Degommier).

Certains marqueurs génétiques comme la protéine fluorescente verte, (en anglais *Green Fluorescent Protein* ou GFP) sont aussi très utilisés en biologie. Dans ce cas, le fluorochrome est une protéine produite directement par la cellule elle-même et ne nécessite pas l'ajout de substrat. La fluorescence peut alors être visualisée directement dans les cellules vivantes.

De nombreuses techniques de marquages peuvent être utilisées ; nous retiendrons le marquage simple, qui se fait par affinité entre un fluorochrome et la molécule à marquer.

On peut exciter les substances fluorescentes par une excitation monophotonique. On utilise pour cela une lumière d'excitation dont la longueur d'onde excite directement le fluorophore. Donc, la fluorescence émise peut provenir de toute l'épaisseur de l'échantillon traversée par le faisceau d'excitation. L'élément clé de ce microscope confocal est alors représenté par une "fenêtre" (un iris confocal) placée devant le détecteur qui élimine la fluorescence provenant des régions non focales. L'observation de signaux de fluorescence repose sur cinq éléments :

- une source de lumière pour l'excitation,
- un fluorophore,
- des filtres pour séparer les photons d'émission des photons d'excitation,
- un sténopé (iris confocal),
- un détecteur pour transformer le signal lumineux des photons en signal électrique.

Les techniques de fluorescence peuvent être utilisées avec différents types de microscope :

un microscope optique (probl. présentation : manque la flèche) classique. Il est également courant de faire passer la lumière excitatrice par l'objectif et non pas par dessous le spécimen. On parle alors de **microscopie à épifluorescence**. Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission. Les fluorochromes les plus classiques sont la rhodamine et ses dérivés, la fluorescéine et ses dérivés et le DAPI. Ils émettent respectivement dans le rouge, le vert et le bleu.

- un microscope confocal à balayage laser. Cette association est la plus courante. Le microscope confocal atteint une résolution bien meilleure que le microscope optique classique, et permet de réaliser des images en trois dimensions de l'objet.

Comme toute technique de microscopie optique classique, la microscopie en fluorescence est limitée par la diffraction de la lumière. Le pouvoir de résolution est donc de 200 nm (*) environ (voir microscope optique).

(*) le nanomètre vaut 1 milliardième de mm, soit 1 millième de micron