

TP 1  
Optique - Imagerie - Microscopie photonique  
Présentation générale des outils...  
Documentation sur les colorants...

**Objectif de la séance : connaître les principes de la microscopie et des champs proches.**

A connaître

Le microscope photonique.  
Le fond noir  
Le contraste de phase et sa variante à contraste interdifférentiel  
Le microscope inversé et ses applications  
Le microscope à fluorescence.(lumière à UV)  
Le microscope confocal  
Les colorants  
Une application pratique et manipulation.

## I La microscopie photonique :

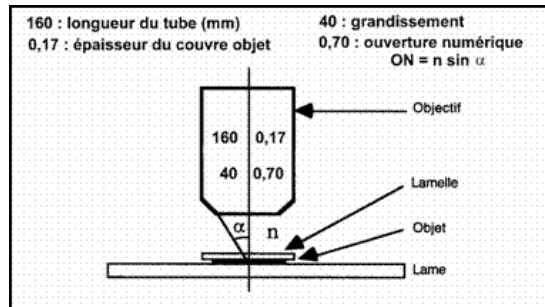
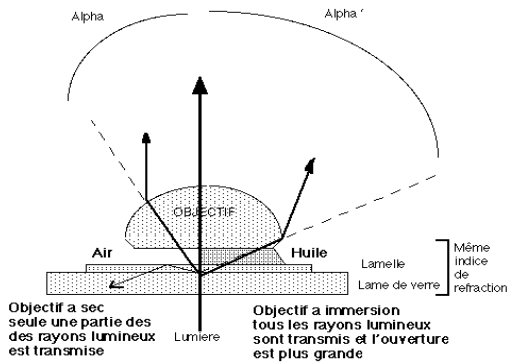
- Définition : Microscope utilisant comme source lumineuse la lumière blanche
- Principe : Source lumineuse: ampoule autrefois à filament dont l'émission dépend de la température de chauffage (lumière jaune aux faibles intensités), actuellement elles comportent un gaz qui donne une lumière blanche quelle que soit la température. Il existe un diaphragme associé.

Condenseur: système optique concentrant le faisceau lumineux sur l'objet

Objet: doit être transparent pour pouvoir être analysé en lumière transmise

Objectif: Système optique d'analyse de l'objet ayant un grandissement, une ouverture numérique et un chromatisme. L'ouverture numérique d'un objectif traduit sa capacité à enregistrer les rayons les plus extrêmes issus d'un point de l'objet. Sa valeur est fonction de l'indice de réfraction du milieu traversé et de l'angle:

$$\text{Ouverture numérique : } ON = n ( \sin.\alpha )$$



**A savoir :**

- Dans l'**air**  $n=1$  et le demi angle maximum est  $72^\circ$ : **ON=0,95**
- Dans l'**huile à immersion**  $n=1,515$  et le demi angle est  $67,5$  (courte focale et diamètre réduit de la lentille): **ON=1,4**

Tableau des distances de travail des objectifs:

(Valeurs approchées pour un tube de 160 mm)

OBJECTIF	FOCALE	Distance de Travail *
4 X	40 mm	27 mm 30 mm
10 X	16 mm	6 mm
40 X	4 mm	0.5 mm
60 X	2.6 mm	0.15 mm **
100 X	1.6 mm	0.35 mm 0.12 mm

\* Sources Olympus et Nacet

\*\* Une lamelle couvre objet mesure déjà 0.16 à 0.17 mm d'épaisseur !

**Applications** Anatomie pathologique. Bactériologie. Cytogénétique. Hématologie. Parasitologie  
Virologie.

Sur la monture des objectifs on peut rencontrer les symboles suivants

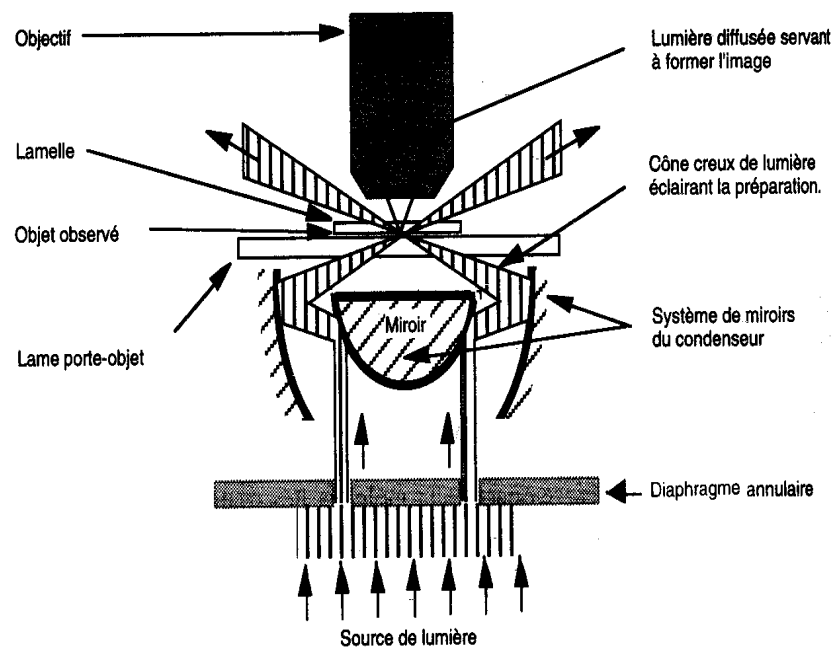
La marque du fabricant. **Nachet Zeiss Leitz** etc

- Le **Grossissement** en nombre de fois Ex : **100 x \***
- L'**ON** (Ouverture Numérique) ou **ouv** (ouverture)
  - **NA** (Numerical Aperture)
  - **A** ou **Ap** (Aperture)
- La **longueur de tube** en mmm **160 170 210** ou bien le symbole **infini**.
- **Type d'immersion**
  - **I, H H oel oil** dans l'huile
  - **Gly** dans la glycérine
  - **W eau** dans l'eau
- **Épaisseur de lamelle**
  - **0** ou **0,17** ou **2**
- **Correction géométrique**
  - **Plan Pl** Objectifs plans
- **Correction chromatique**
  - **Achromatique**
  - **Semi apochromatique**
    - **Semi-apo**
    - **Fluor**
    - **Néofluar Fluotar**
    - **Fluo-plan Pl-Fl**
    - **Ultrafluor**
  - **Apochromatique**
    - **Apo et Apochromat**
    - **Planapo Apoplan**
- **Objectifs spéciaux**
  - **GF** objectif à grand champ
  - **Iris** objectif à diaphragme
  - **Cor Korr**
  - **Pol P** objectif pour polarisation
  - **Ph Phaco** objectif de phase
  - **Epi M** objectif pour épiscopie

**Epiplan** objectif plan pour épiscopie

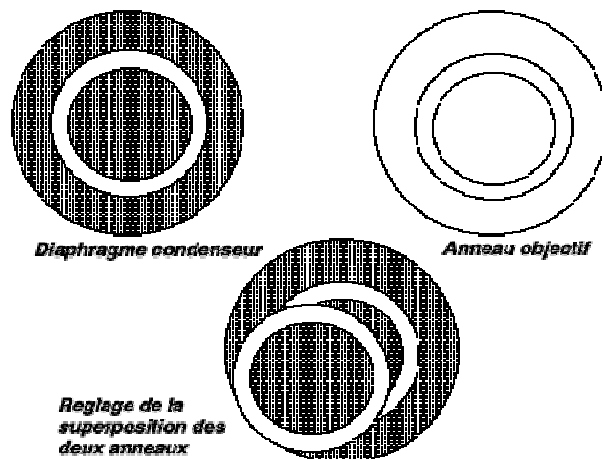
## II Le fond noir

A compléter pendant la séance.

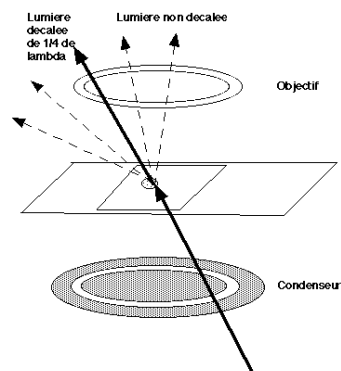


### III Le contraste de phase.

- 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 (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 puis reprise par l'objectif.



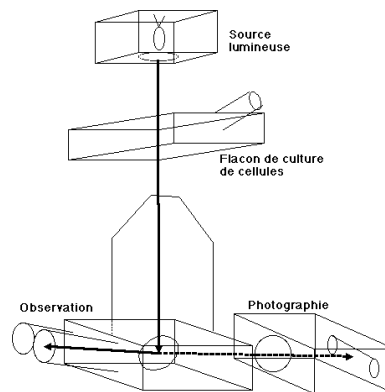
## IV Le microscope inversé.

- **Définition**

Microscope optique adapté à la culture de cellule.

- **Principe**

Les composants sont les mêmes que pour le microscope ordinaire mais ceux-ci sont disposés de haut en bas à partir de la source lumineuse à l'inverse de l'habitude d'où le nom du microscope.



- **Application : Culture de cellule in vitro**

Quels sont les objectifs du microscope du laboratoire ?

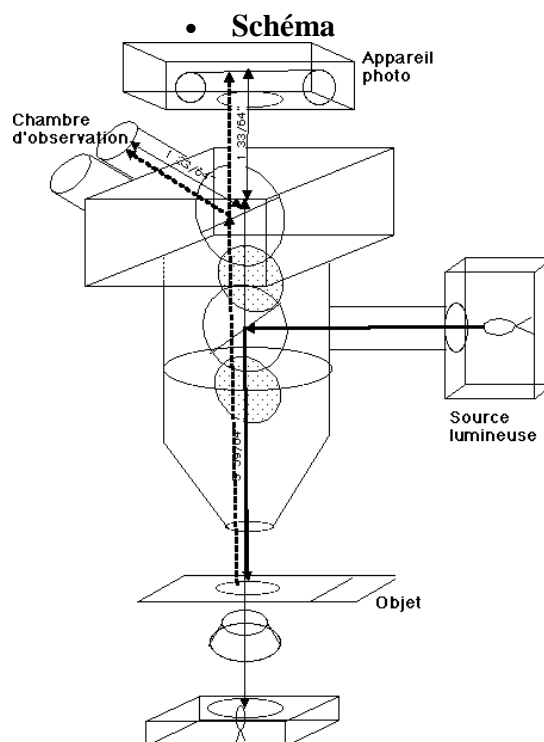
## V Le microscope à fluorescence

- **Définition**

Microscope dont la source lumineuse est une lampe émettant un rayonnement très intense (il existe plusieurs intensités de sources lumineuse) sélectif qui est sélectionné par un filtre dit d'excitation

- **Principe**

Source lumineuse ultraviolette adaptée sur un microscope conventionnel.



Certaines substances ont la propriété, lorsqu'elles sont éclairées par des lumières de courte longueur d'onde, d'émettre une lumière de longueur d'onde plus élevée. C'est la fluorescence. En microscopie, cette propriété est utilisée pour visualiser certaines structures. En général, les radiations ultra violettes ou bleues sont utilisées pour l'excitation et l'observation se fait dans le visible.

Certains objets sont naturellement fluorescents: on parle de fluorescence primaire ou d'autofluorescence. D'autres objets peuvent acquérir une fluorescence par imprégnation de colorants fluorescents appelés fluorochromes: c'est la fluorescence secondaire.

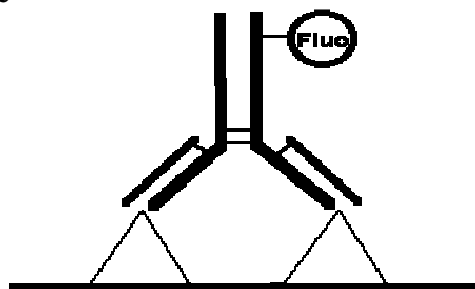
Les pigments chlorophylliens font partie des substances autofluorescentes. Ils fournissent des observations faciles et spectaculaires en passant d'une couleur verte en lumière naturelle à une couleur rouge en fluorescence.

### Une application très importante en biologie : Immunofluorescence:

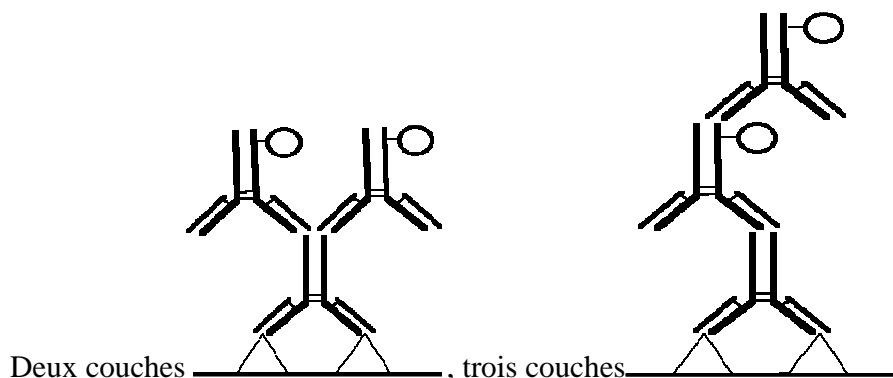
On utilise des fluorochromes marquant soit des anticorps ( immunochimie ) soit des sondes nucléiques ( hybridation moléculaires ) **Fluorescence spontanée**: lipides, pigments ( vitamine A = fluorescence verte ) **Fluorescence induite** : Acide phosphorique et vitamine A = fluorescence rouge Fluorescence induite par le formol des amines biogènes par constitution d'un cycle supplémentaire.

#### Immunofluorescence

- **Définition** : utilisation d'anticorps marqués par un fluorochrome dont le produit est stable et peut être stocké



- **Amplification**:



- **Applications**

**Immunofluorescence sur coupes de tissus congelés: microscope à fluorescence utilisant une lampe à vapeurs de mercure**

**Mise en évidence des dépôts extracellulaires: Ig ( immunoglobulines ), C ( complément ), Fibrine, amylose, dépôts de chaînes légères d'immunoglobulines**

**Etude des constituants de la matrice extracellulaire**

Des applications biomédicales en néphrologie et en dermatologie



La lampe à vapeur de mercure? cf diaporama

-  
-  
-  
-  
-

### Quelques fluorochromes classés selon leur longueur d'onde d'émission

- DAPI ( ADN ) ----->
- AMCA ( proteines ) ----->
- Hoechst 33258 ( ADN ) ----->
- FITC / DTAF ( proteines )
- Cy 3
- B-Phycoérythrine ( proteines )
- R-Phycoérythrine ( proteines )
- XRITC ( proteines )
- Lissamine Rhod-B
- Texas Red ( proteines )
- R-Phycocyanine ( proteines )
- Quantum Red
- Cy 5 ( proteines )

### Autres

Iodure de propidium (ADN )

Bromure d'ethidium ( ADN )

Quinacrine

Rhodamine

Bleu Evans

## **VI Le microscope confocal :**

A compléter en recherche personnelle.

## VII Les colorants. Pour information et support bibliographique

"Matière colorée mise en contact avec un support se fixe sur ce support de façon durable en lui communiquant de la couleur"

- Le **chromophore** est le support de la couleur et l'**auxochrome** est le site de fixation

### **Familles chimiques des colorants**

Nitrés

Monoazoïques

Diazoïques

Sels de Tetrazolium

Triphenylméthane

Xanthéne

Quinoneimine

Polycycliques

Naturels

Fluorochromes

## **Principe**

Les molécules colorées peuvent se fixer sur les tissus soit par simple affinité tinctoriale ( colorations signalétiques ), soit à la suite d'une réaction chimique ( colorations histochimiques et histoenzymologiques )

- **Cibles des colorants**

- **Nucléaire**

- Bleu : Hemalun, Hematoxyline
- Rouge : Kernechtrot ( rouge nucléaire )
- Vert : Vert de methyle

- **Cytoplasmique** : Eosine

- **Tissu conjonctif** :

Safran Vert lumière Bleu d'aniline Rouge sirius

- **Tissu élastique** : Orcéine

- **Démasquage des cibles** : puis dépôt d'argent

Réticuline

Granules cytoplasmiques : grimelius

- **Identification de composants chimiques**

Histochimie

Histoenzymologie

- Immunochimie