

*Techniques d'Analyse
par*
MICROSCOPIE



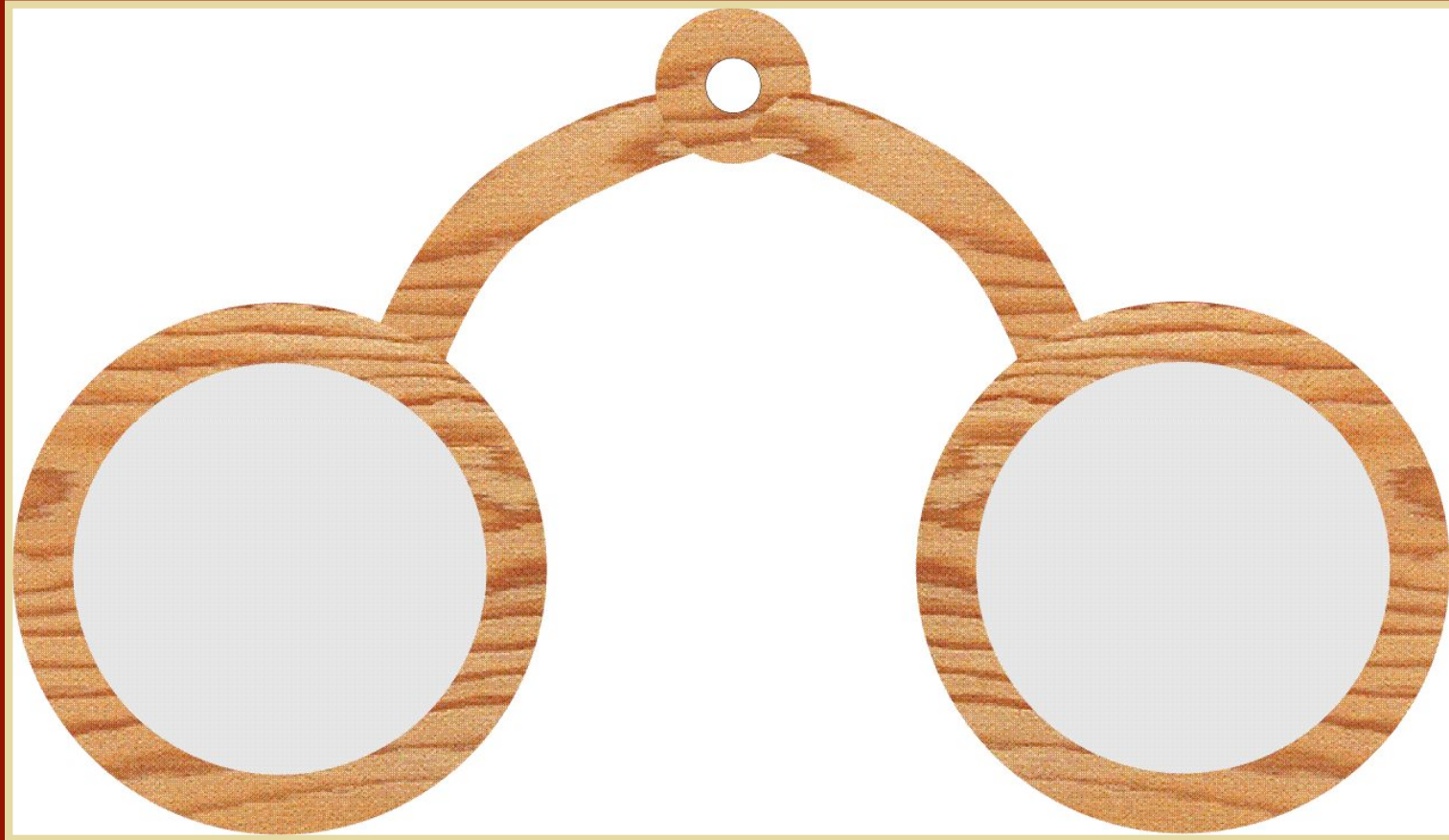
**Cours proposé par
Edmundo NAVA SAUCEDO
aux étudiants de L1-S2**

Loupes et lunettes de vue

Les premières lentilles, de forme *convexe*, ont été inventées par les Arabes au IX^e siècle. Ces verres, ayant un effet grossissant, sont alors utilisés comme *loupes*. Toutefois, le polissage des verres est loin d'être parfait et la qualité de vision n'est pas très bonne.

Au début du II^e millénaire, les Occidentaux s'approprient les connaissances du monde musulman, notamment en Espagne où les deux civilisations se côtoient. Ainsi, la loupe est “ réinventée ” par les moines anglais Robert Grosseteste et Roger Bacon au XIII^e siècle. C'est peu après, à la fin du XIII^e siècle, qu'un Italien nommé Degli Armati observe que des loupes, à condition de ne pas être trop convexes, permettent aux personnes vieillissantes ayant du mal à voir les objets proches, de corriger ce défaut (que l'on appelle maintenant *presbytie*). Degli Armati invente alors un système en bois permettant de faire tenir ensemble les deux verres : les “ bésicles ” sont nées !

Loupes et lunettes de vue



*Des “ bésicles ” pour les presbytes :
il faut les tenir à la main !*

Loupes et lunettes de vue

Au XIV^e siècle, les bésicles sont rebaptisées “lunettes”, car la forme ronde des verres évoque de petites Lunes. Au XV^e siècle sont inventés les verres *concaves* : on observe qu’ils permettent de corriger la *myopie* (fait de voir flous les objets éloignés). Les branches de lunettes, quant à elles, sont inventées au XVIII^e siècle.

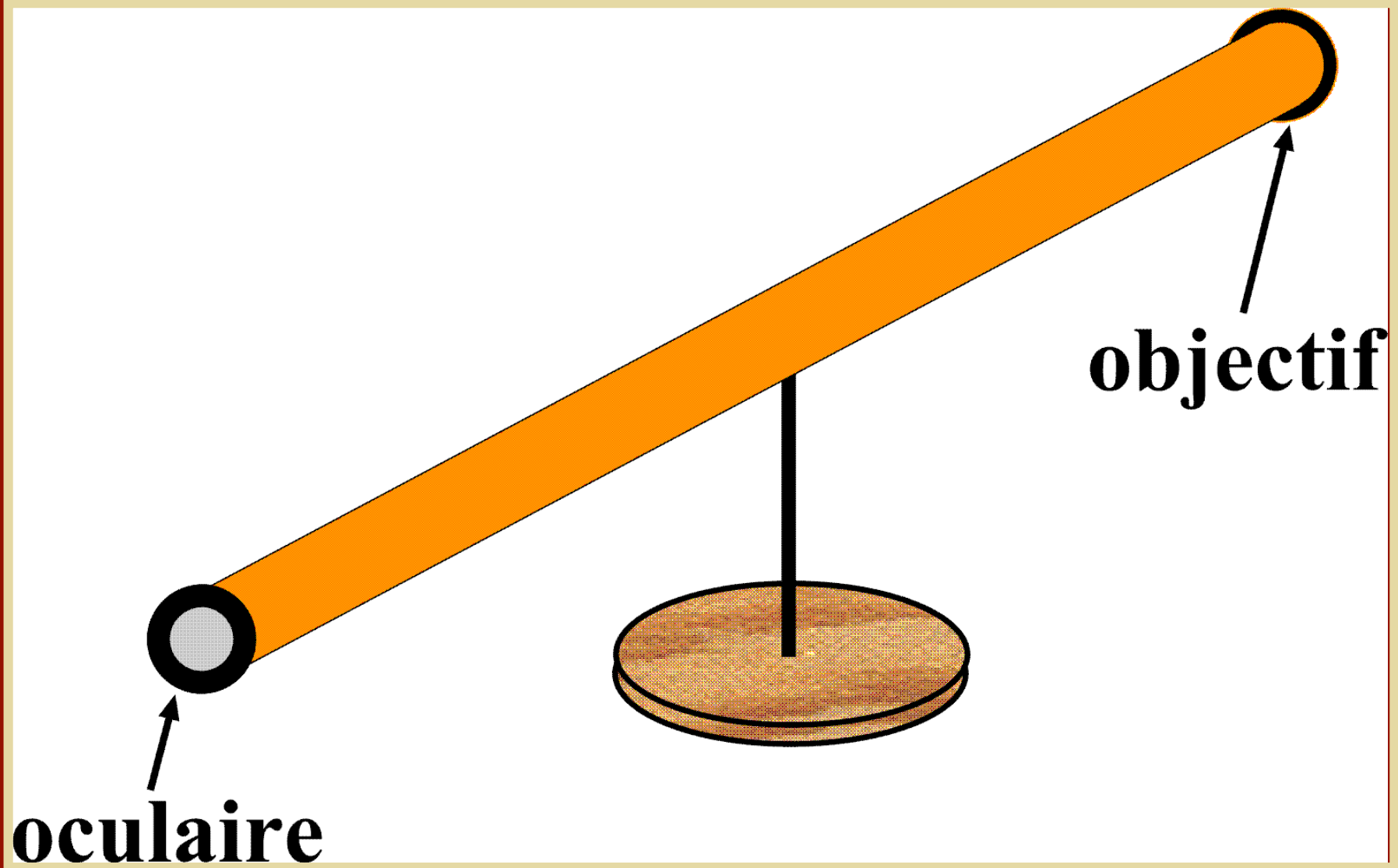
L’idée des verres de contact est ancienne. Le premier à la concrétiser vraiment est, semble-t-il, l’astronome anglais John Herschel au XIX^e siècle : il les fait tenir sur la cornée de ses yeux au moyen de gélatine ! Les premières lentilles de contact souples, en plastique, n’apparaîtront qu’en 1964 et ce sera alors un grand succès commercial.

Longues-vues et lunettes

Les toutes premières *longues-vues* datent de la fin du XVI^e siècle. Elles sont constituées d'un long tube en métal, avec à une extrémité l'“ objectif ” (côté tourné vers l'objet à regarder) et de l'autre l'“ oculaire ” (côté où l'on met l'œil). L'objectif est une lentille *convergente*, tandis que l'oculaire est une lentille *divergente* ; à l'époque, ces deux lentilles ont un petit diamètre (environ 3 cm).

Ces longues-vues, ou “ lunettes ”, donnent une image à *l'endroit*, pas très lumineuse et grossie de 3 à 5 fois selon les modèles. Au début, ces lunettes sont gardées secrètes : utilisées par les militaires, elles leur permettent de mieux apercevoir l'ennemi.

Longues-vues et lunettes



Une lunette du début du XVI^e siècle

Longues-vues et lunettes

Le savant italien Galilée, ayant entendu parler des lunettes, décide d'en construire une pour observer le ciel et les astres. Il soigne particulièrement le polissage des verres. Avec son instrument qui grossit 30 fois, il parvient en 1610 à observer des choses jusqu'alors inconnues : il y a des montagnes sur la Lune, Vénus présente des phases comme la Lune etc. L'astronomie fait ainsi d'énormes progrès.

Un peu plus tard, les astronomes remplacent l'oculaire divergent par un oculaire *convergent*. Dans ces conditions, l'image est à *l'envers*, mais ce n'est pas bien gênant pour observer un astre ; et par contre on peut obtenir un grossissement plus élevé.

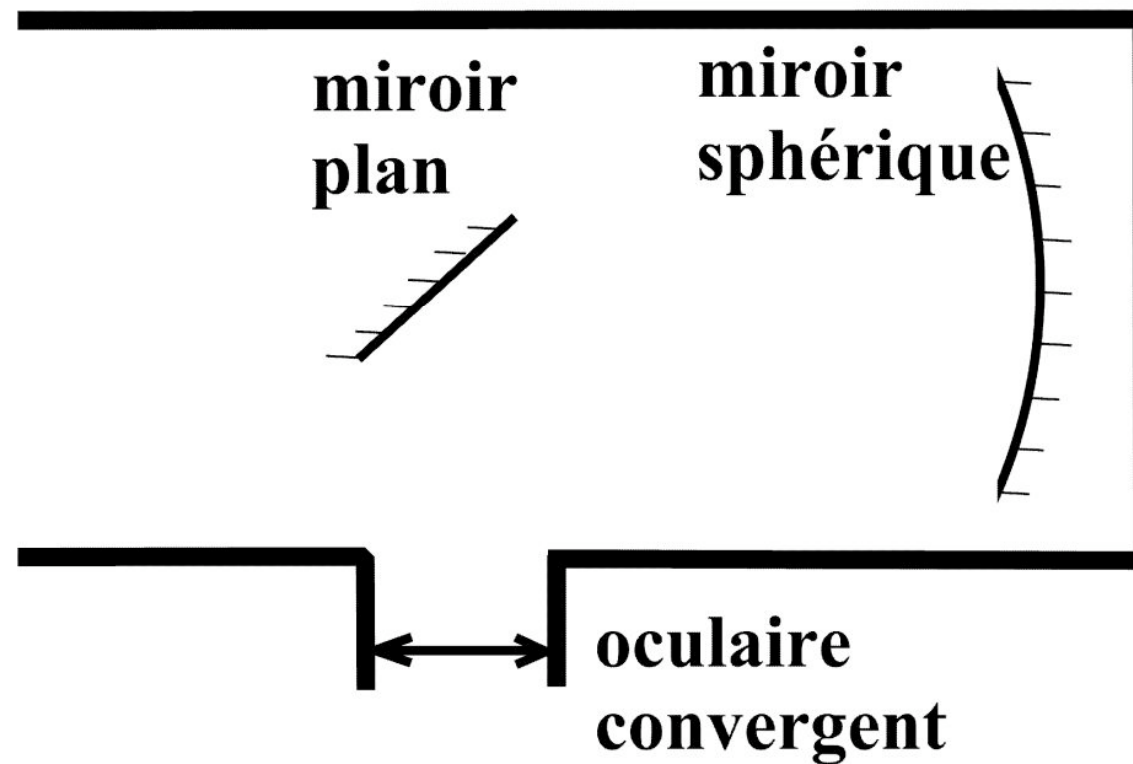
Galileo Galilei (1564 - 1642)



Télescopes

Cependant, les lunettes astronomiques ont divers inconvénients. En particulier, elles donnent des images qui présentent des irisations parasites. Ce problème est résolu avec l'invention du télescope, dont l'objectif est un miroir concave, au lieu d'une lentille. S'inspirant de projets plus anciens, c'est l'Anglais Isaac Newton qui construit le premier télescope en 1671.

Télescopes



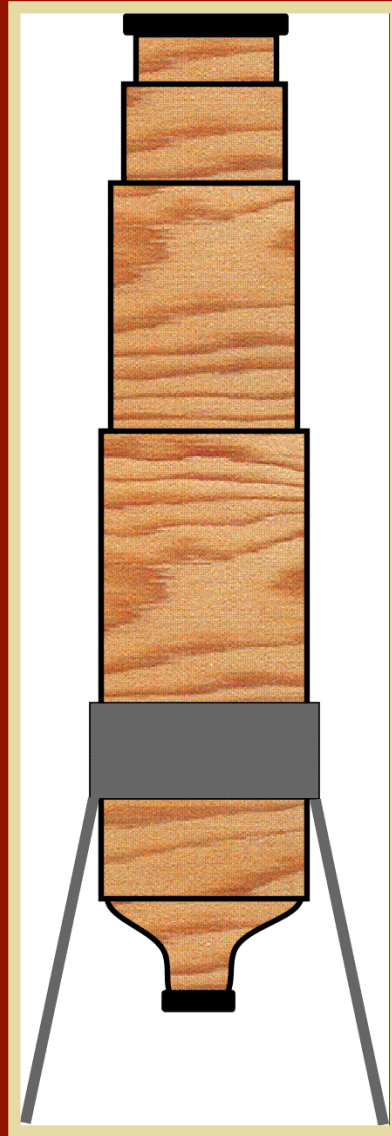
L'intérieur d'un télescope.

Microscopes

Les premiers microscopes sont inventés au début du XVII^e siècle, par des savants hollandais. Certains de ces instruments sont constitués d'une seule et unique lentille convergente : ce ne sont donc que des "loupes améliorées". D'autres comportent déjà un objectif convergent et un oculaire convergent (comme les microscopes actuels). Toutefois, au début, en raison de la médiocre qualité de ces lentilles, les images ne sont pas d'une bonne netteté.

Un Hollandais du XVII^e siècle, Van Leeuwenhoek, est resté célèbre dans le domaine des observations microscopiques. D'une part, en soignant la forme des lentilles, il a réussi à construire des microscopes (à une seule lentille) de bonne qualité, grossissant plus de cinquante fois. D'autre part, il a effectué grâce à eux des découvertes très intéressantes en biologie. Il est en effet le premier à avoir pu observer de minuscules êtres vivants : microbes, globules sanguins, ...

Microscopes



Un microscope du XVII^e siècle

Microscopie

- **Le terme de microscope a été employé pour la première fois en 1625 par Giovanni Faber dans une lettre décrivant une invention de Galilée. L'instrument dont il parlait ne ressemblait pas à ce que nous appelons aujourd'hui un microscope: c'était un télescope modifié pour l'examen d'objets proches.**
- **Le microscope composé de deux lentilles convergentes a été inventé en 1608 par un Hollandais Zacharias Janssen. Son principe est encore valable aujourd'hui.**

Zacharias Janssen (vers 1595)



FIG. 1. ZACHARIAS JANSSEN, THE INVENTOR OF THE COMPOUND MICROSCOPE. (FROM "DE VERO TELESCOPH INVENTORE.")

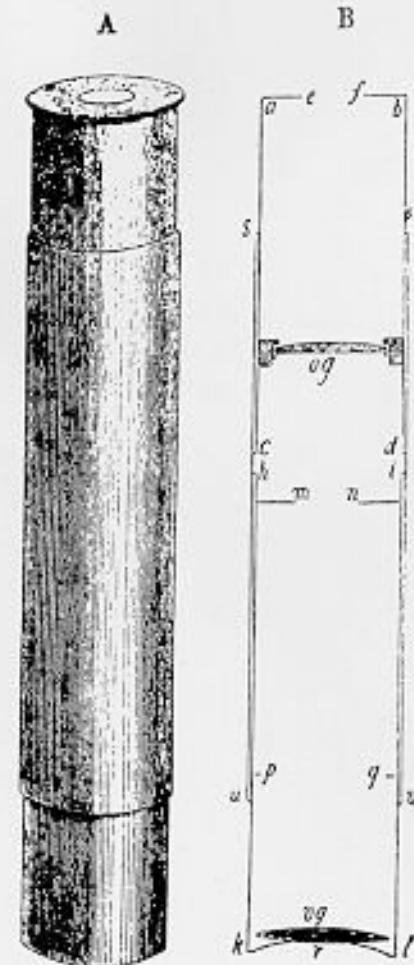
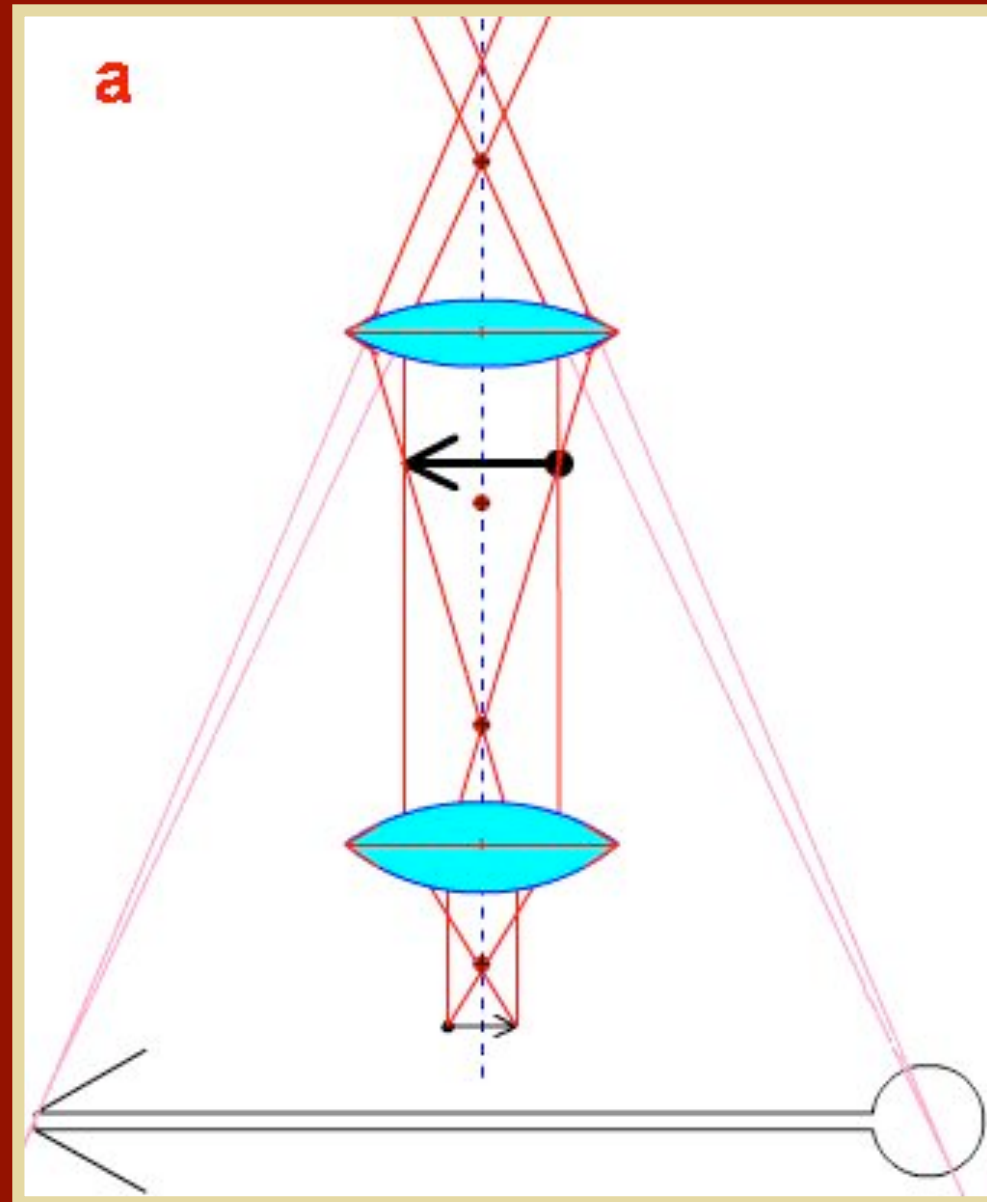


FIG. 2. OLD MICROSCOPE IN THE MUSEUM OF THE ZEELAND SCIENTIFIC SOCIETY, MIDDELBURG, ASCRIBED TO JANSSEN. (FROM DISNEY, "ORIGIN AND DEVELOPMENT OF THE MICROSCOPE.")

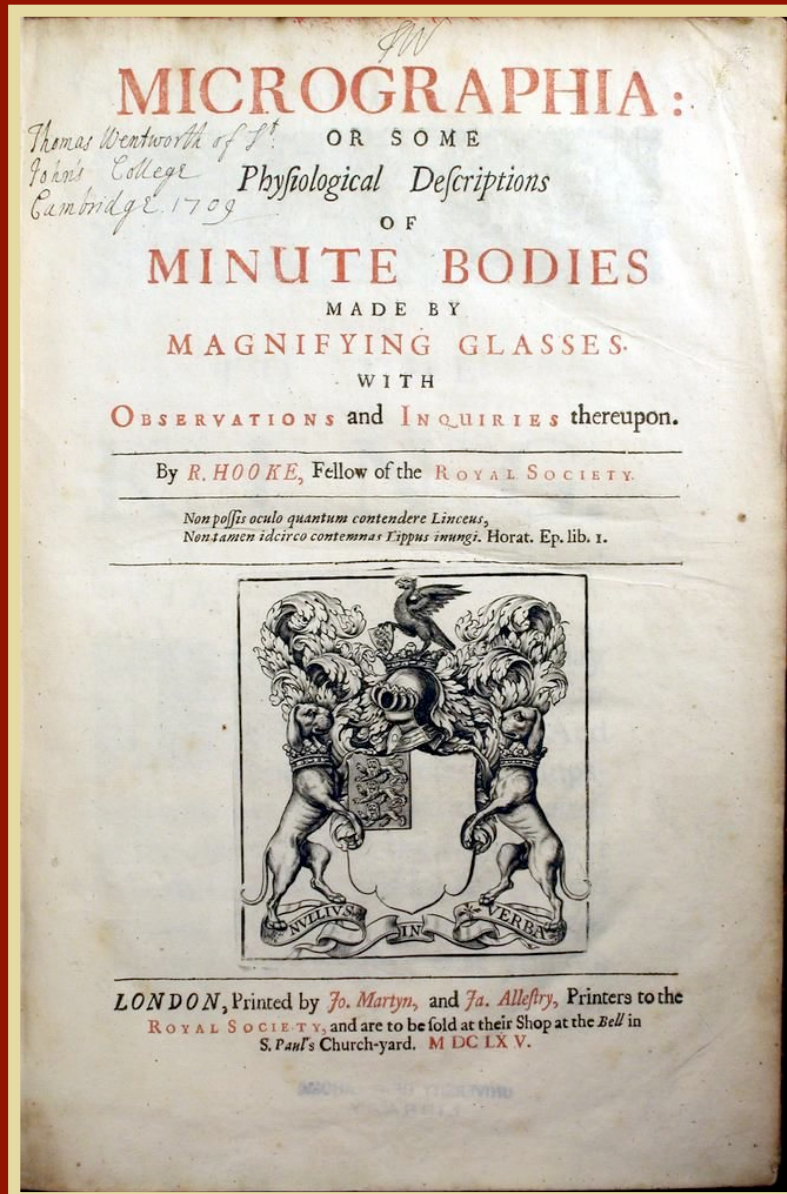
Microscopie



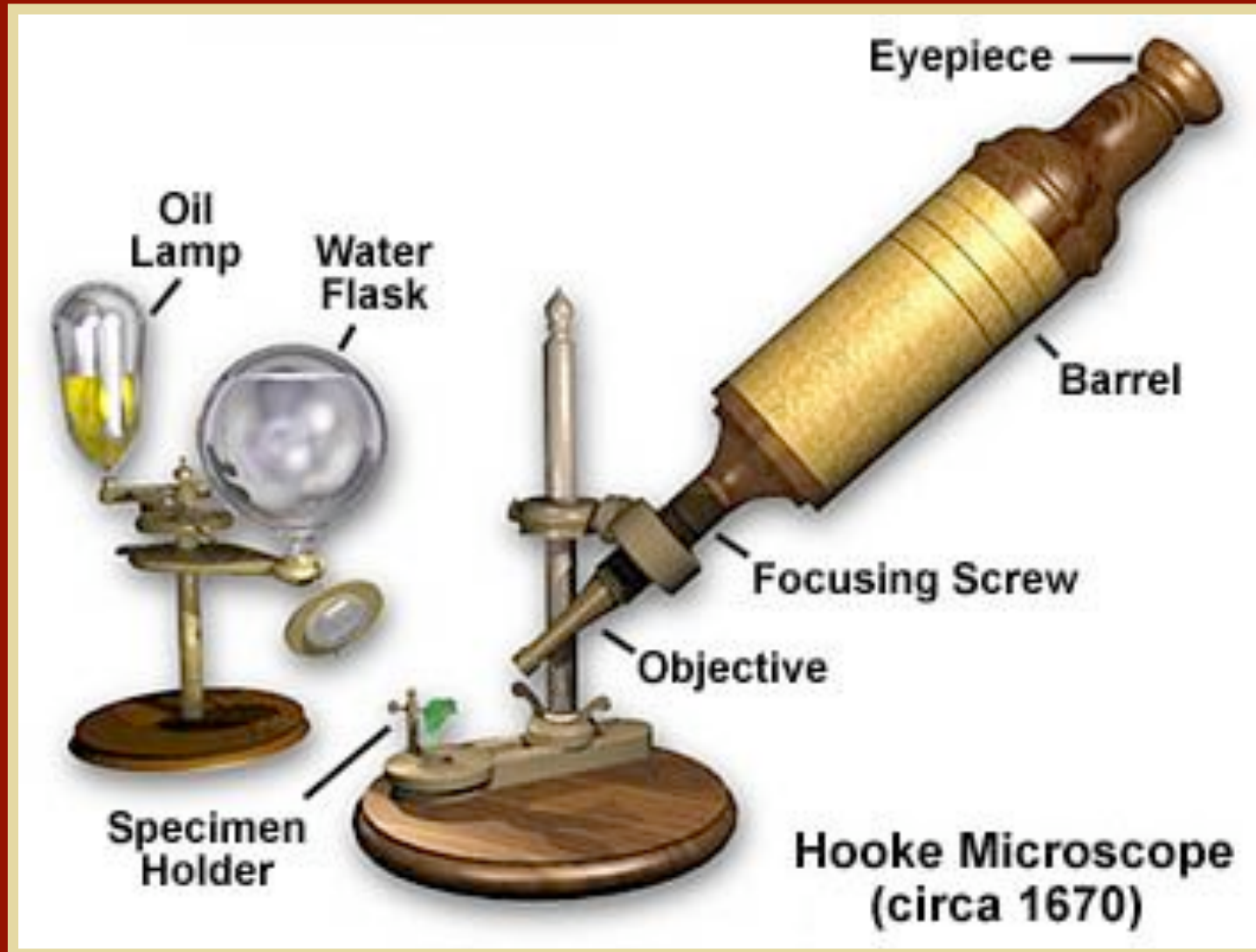
Microscopie

Le premier livre décrivant les observations faites au microscope a été publié par Robert Hooke (1635-1703). En 1663, on lui demanda de faire des conférences sur ses travaux utilisant des microscopes. La microscopie prit alors un bon départ car, pour sa deuxième démonstration, Hooke décida d'examiner la structure du liège. Sur des coupes minces faites au rasoir, il discerna les petites loges qui composaient ce matériau et les appela "cellules". En une seule expérience, il avait inventé la technique fondamentale de la microscopie et donné son nom à l'unité essentielle de la Vie. Il publia ses résultats en 1665 dans *Micrographia*.

Robert Hooke (1635 - 1703)



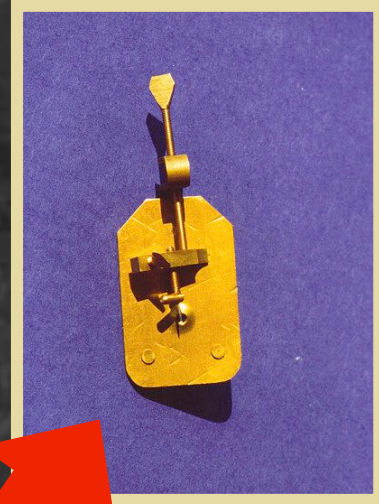
Robert Hooke (vers 1670)



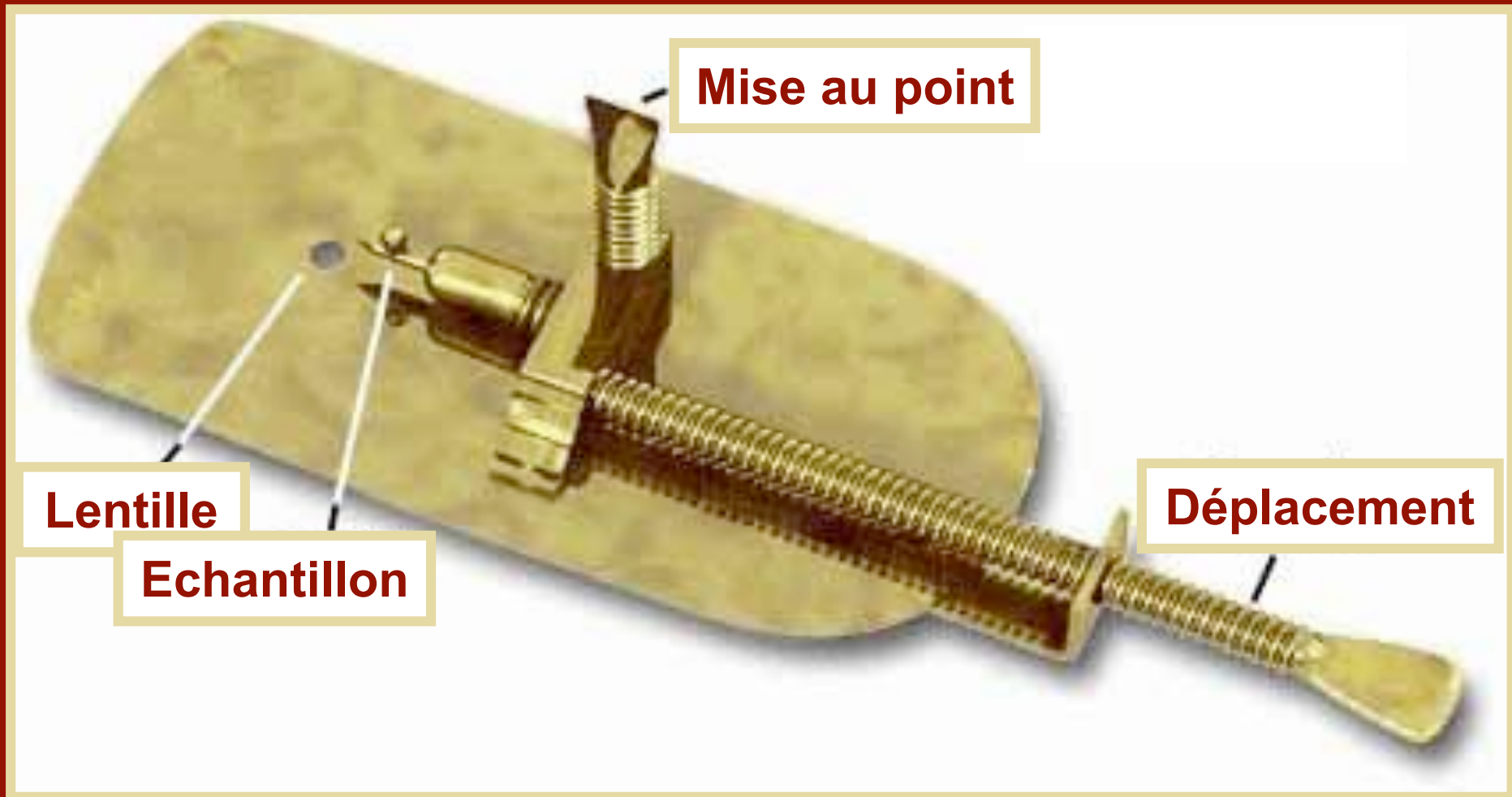
Microscopie

- En 1668, trois ans après la publication du livre de Hooke, un Hollandais du nom de Antonie Van Leeuwenhoek, se rendait à Londres pour rendre compte à la Royal Society des ses observations microscopiques concernant les « animalcules ». Ainsi, il allait devenir le pionnier de la microbiologie, science que Louis Pasteur allait fortement développer deux siècles plus tard.
- Au cours de sa vie Leeuwenhoek construisit plus de 500 microscopes à une lentille. Il réalisa la première description de micro-organismes, dont les bactéries.

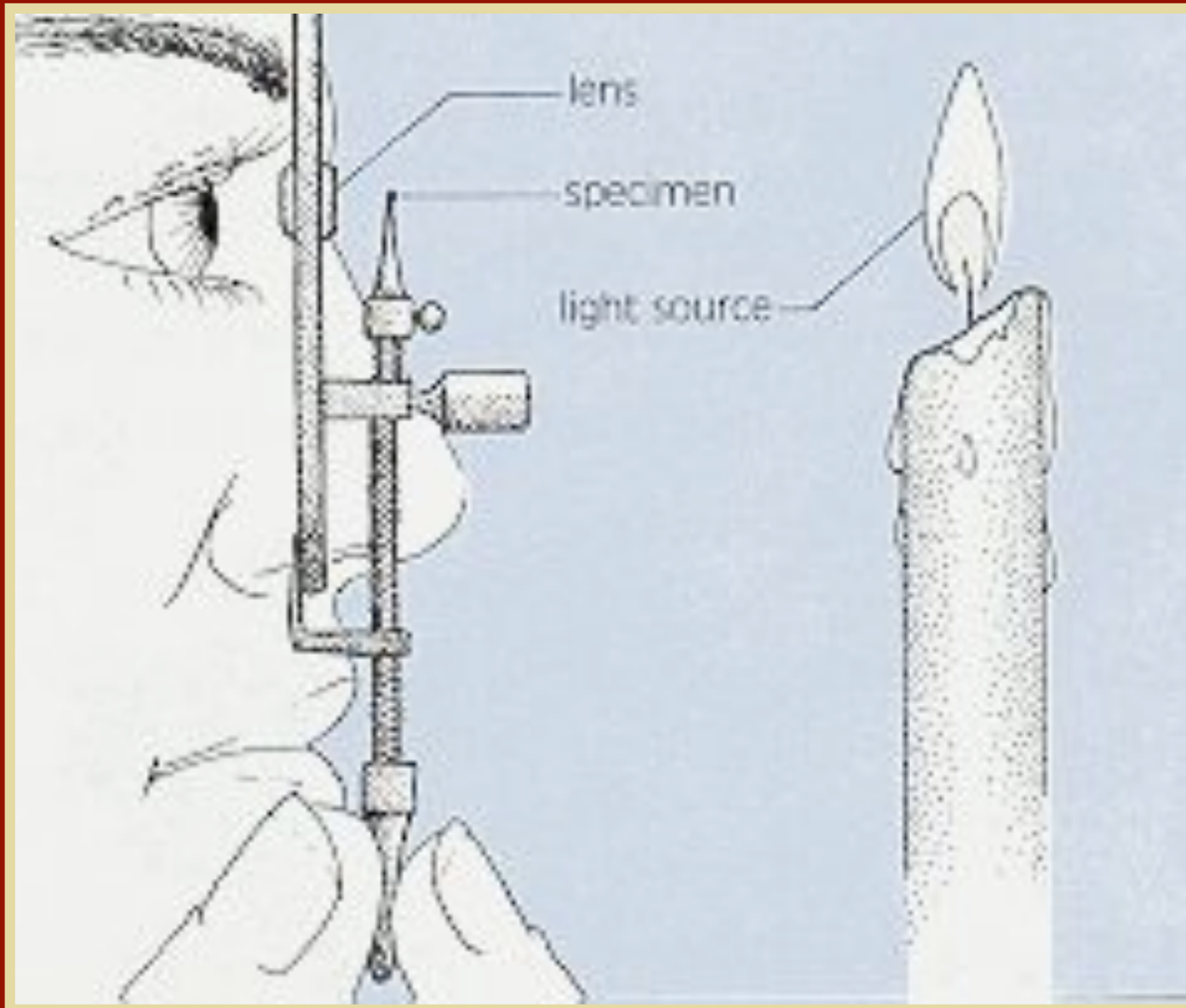
Antonie Van Leeuwenhoek (1632 - 1723)



Microscope de Leeuwenhoek (vers 1660)



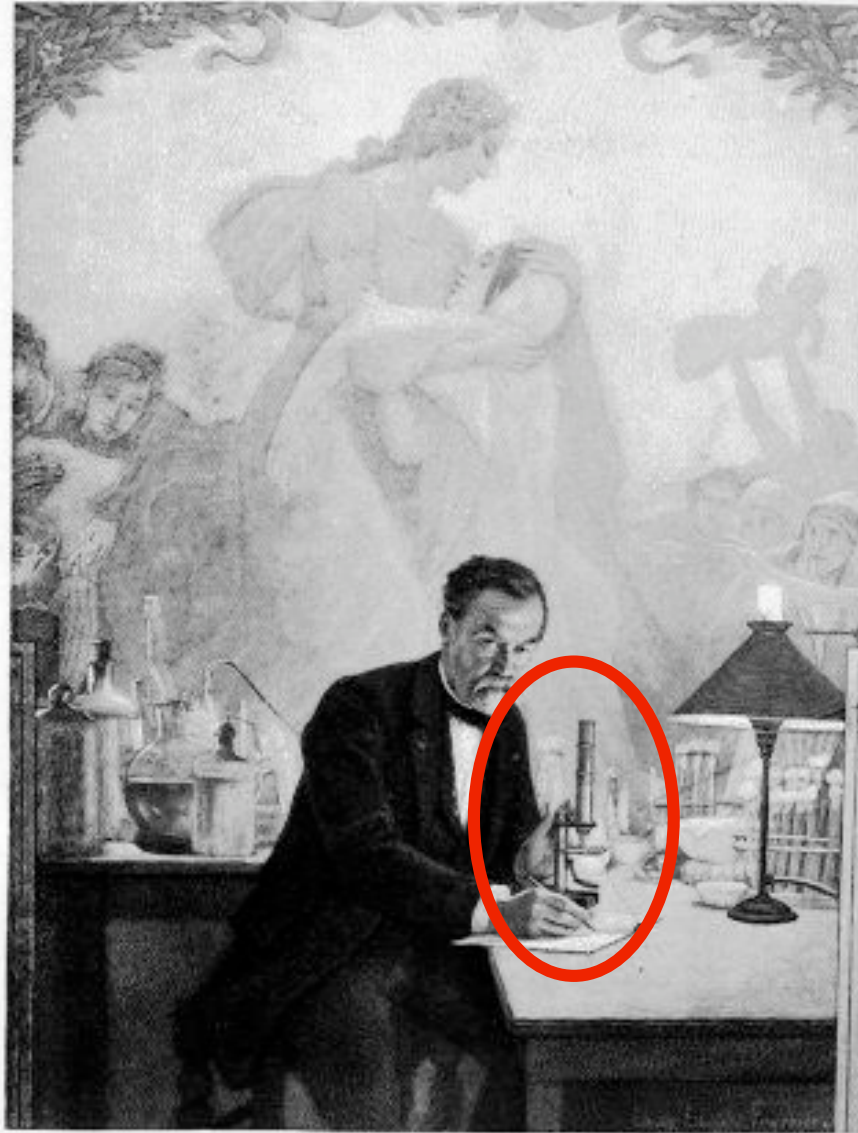
Microscope de Leeuwenhoek (vers 1660)



Louis Pasteur (1822 -1895)



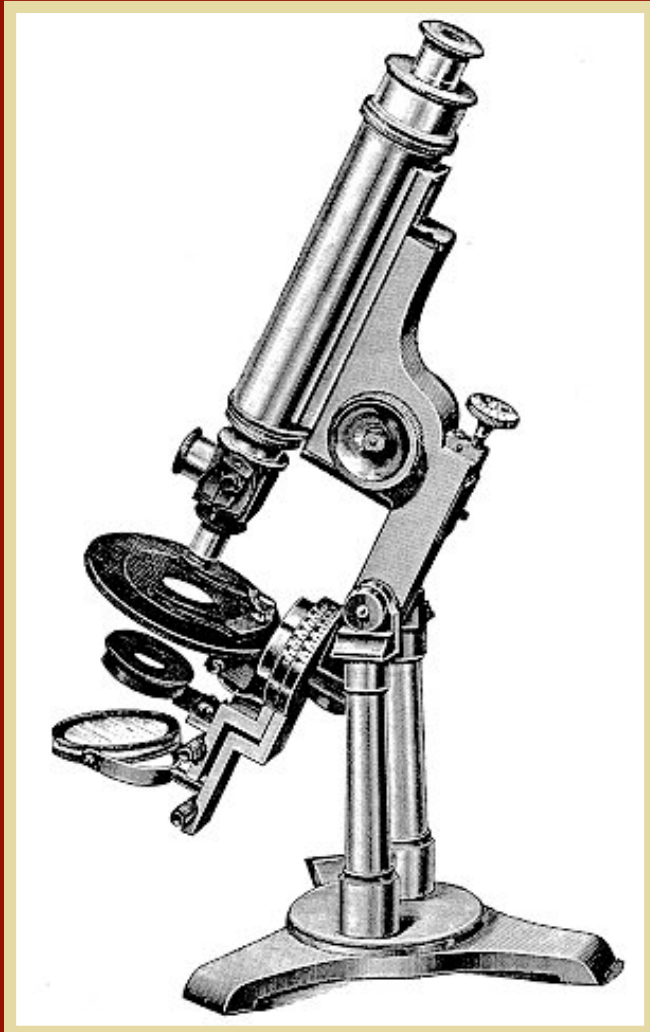
Louis Pasteur (1822 -1895)



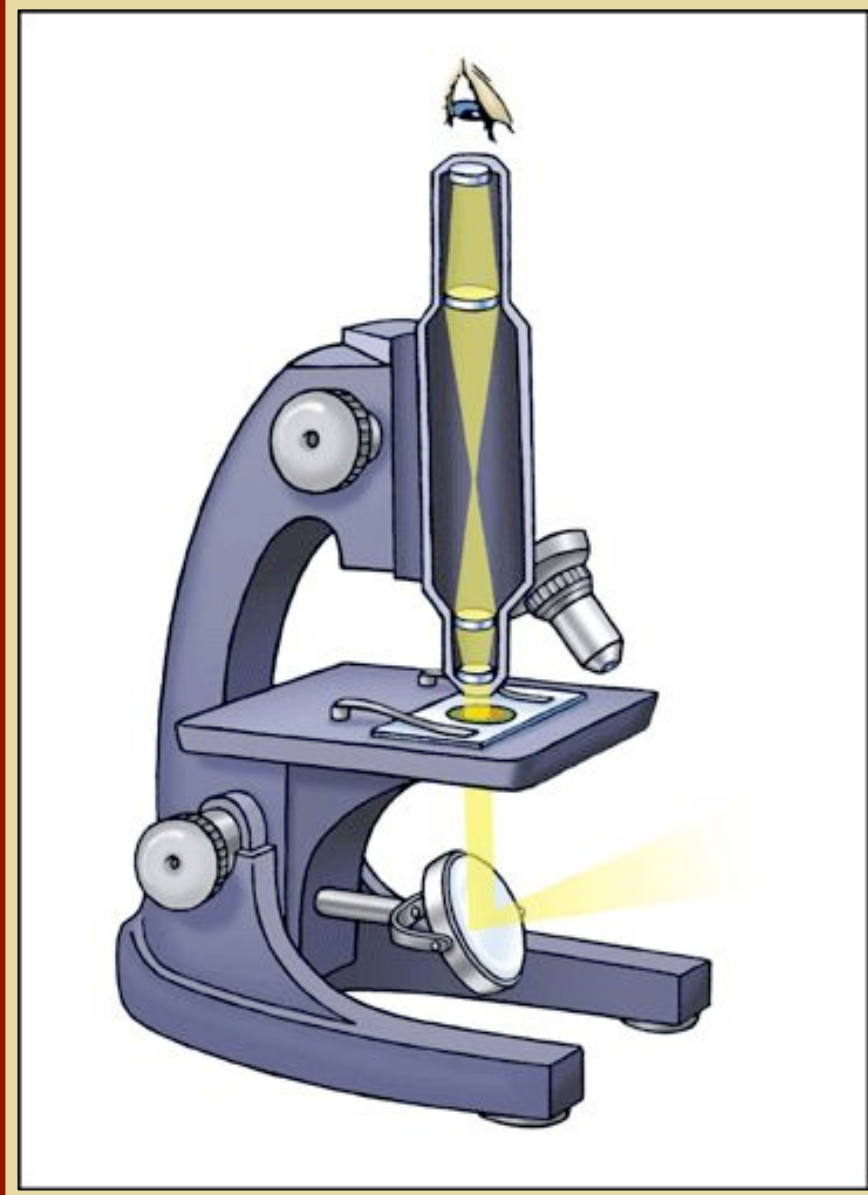
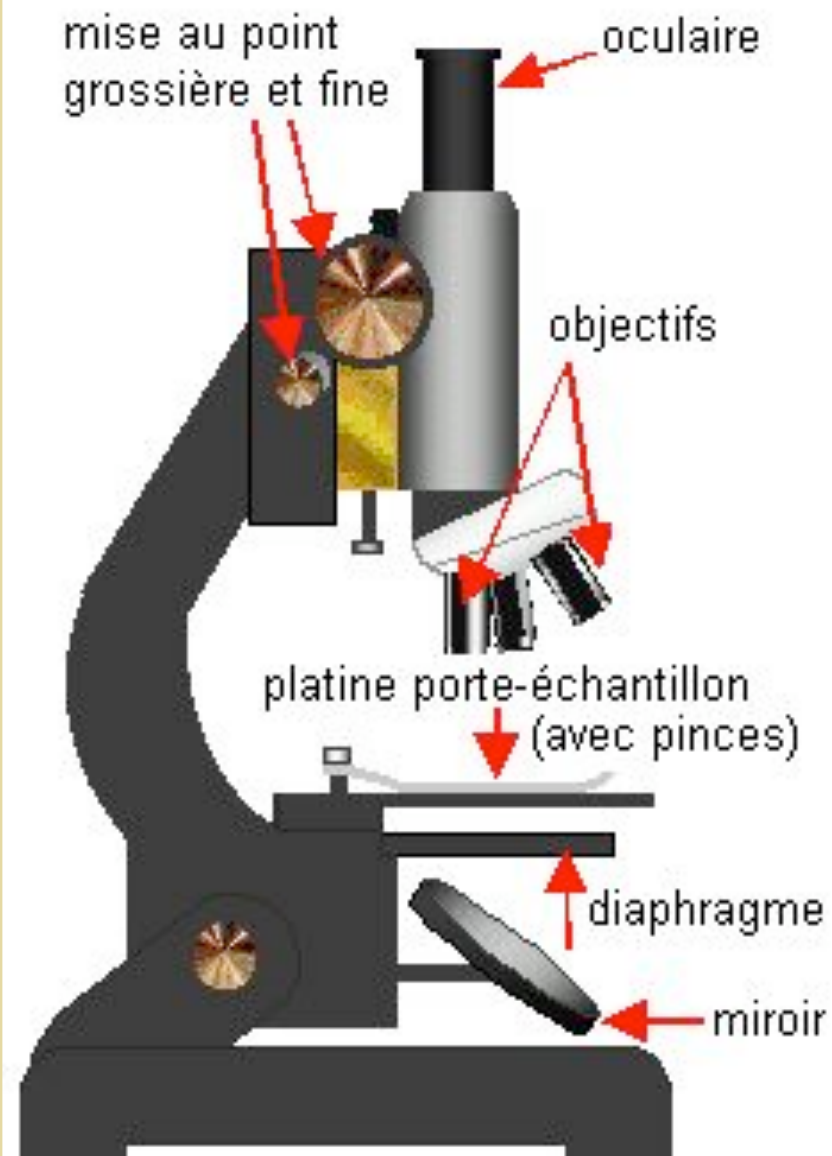
"A SOUVENIR OF PASTEUR."

From a photograph by Ad. Braun & Co. (Braun, Clément & Co., Successeurs) after the painting by Louis E. Fourrier.

Le microscope de l'époque de Pasteur



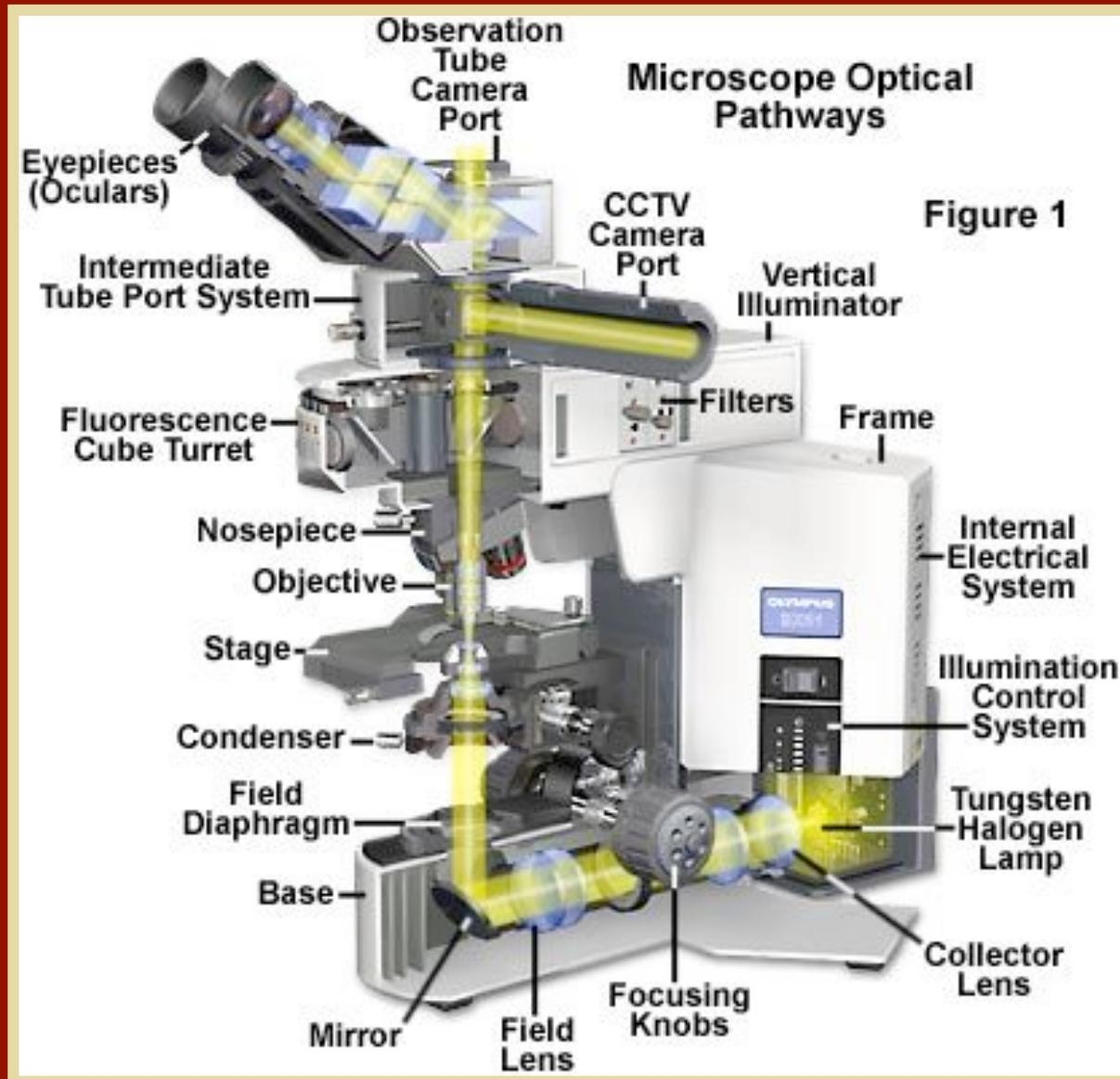
Les parties du Microscope



Objectifs



Un microscope moderne



Microscope inversé



Microscope inversé

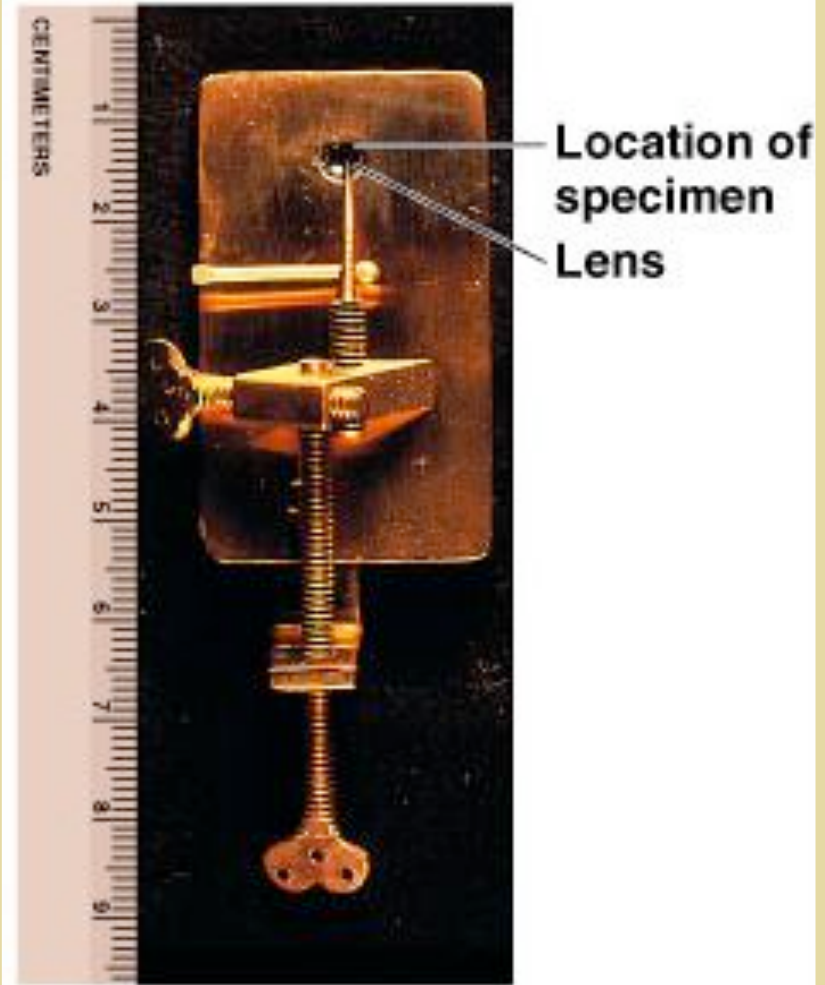


Microscope inversé



Microscopie : Les instruments

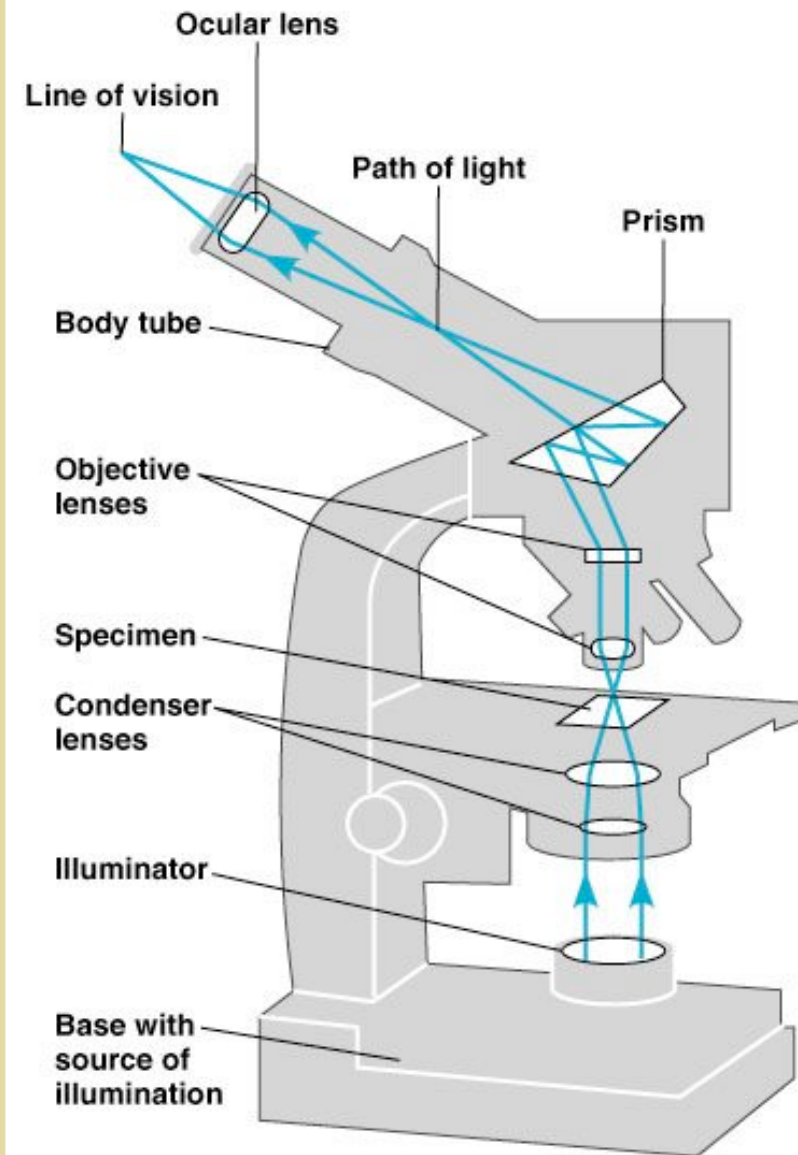
- LE MICROSCOPE
LE PLUS SIMPLE



(b) Microscope replica

Microscopie photonique

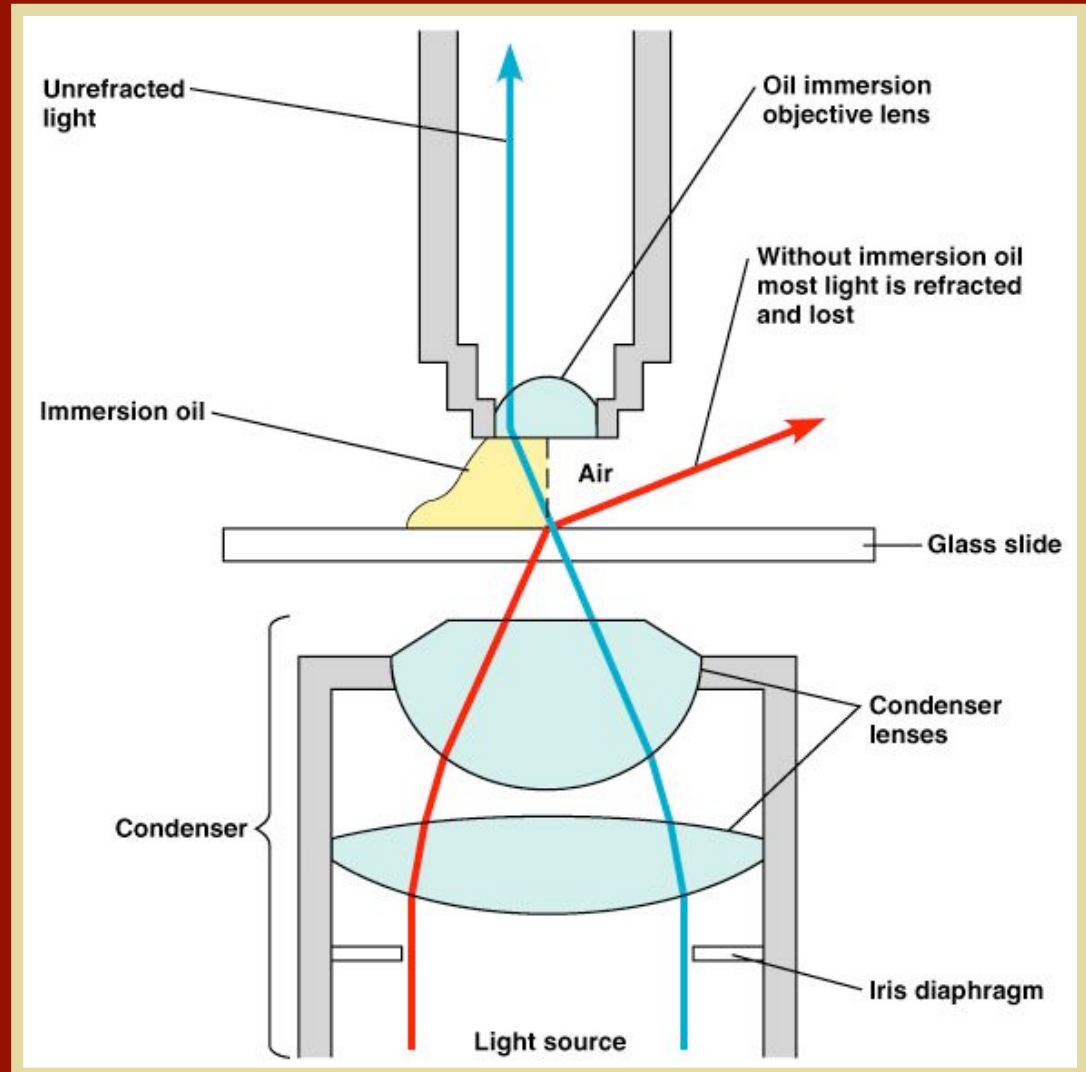
- Microscope optique
- Grossissement =
objectif x oculaire



(b) The path of light (bottom to top)

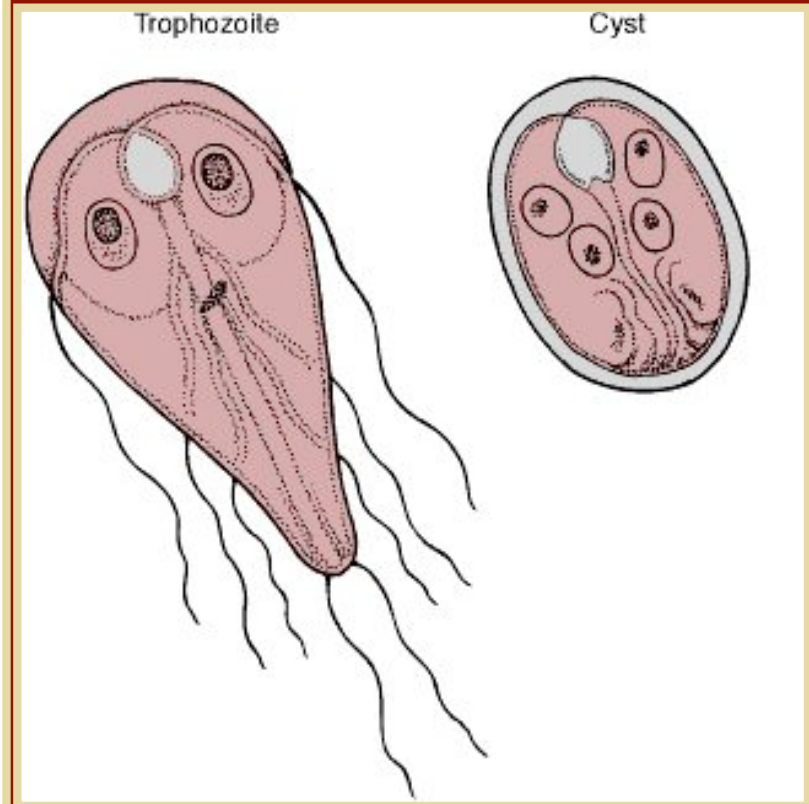
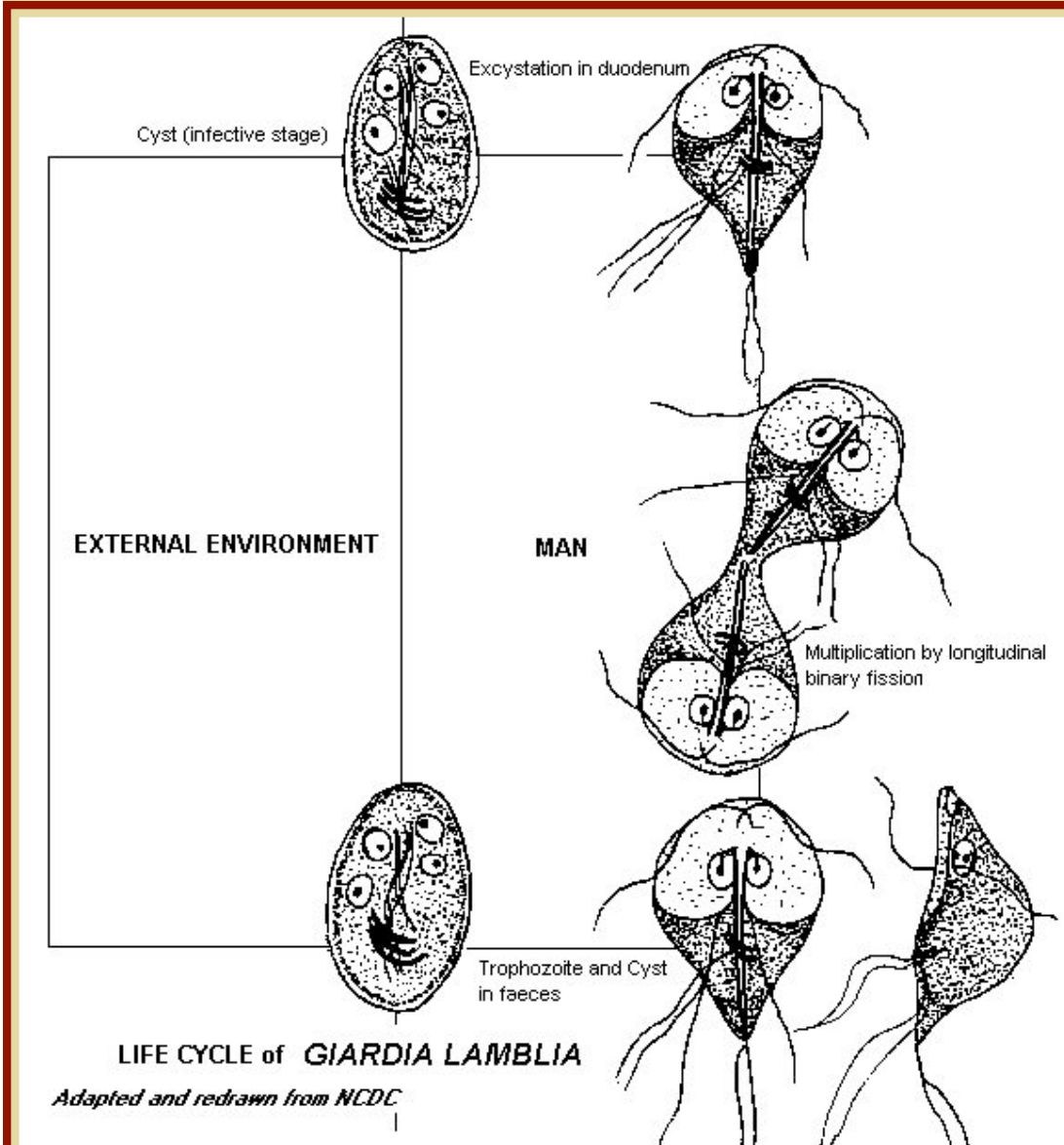
Microscopie photonique

- L'indice de réfraction
- Avec les objectifs plus puissants la lumière réfracte plus dans l'air
- L'huile d'immersion permet de faire passer le maximum de lumière



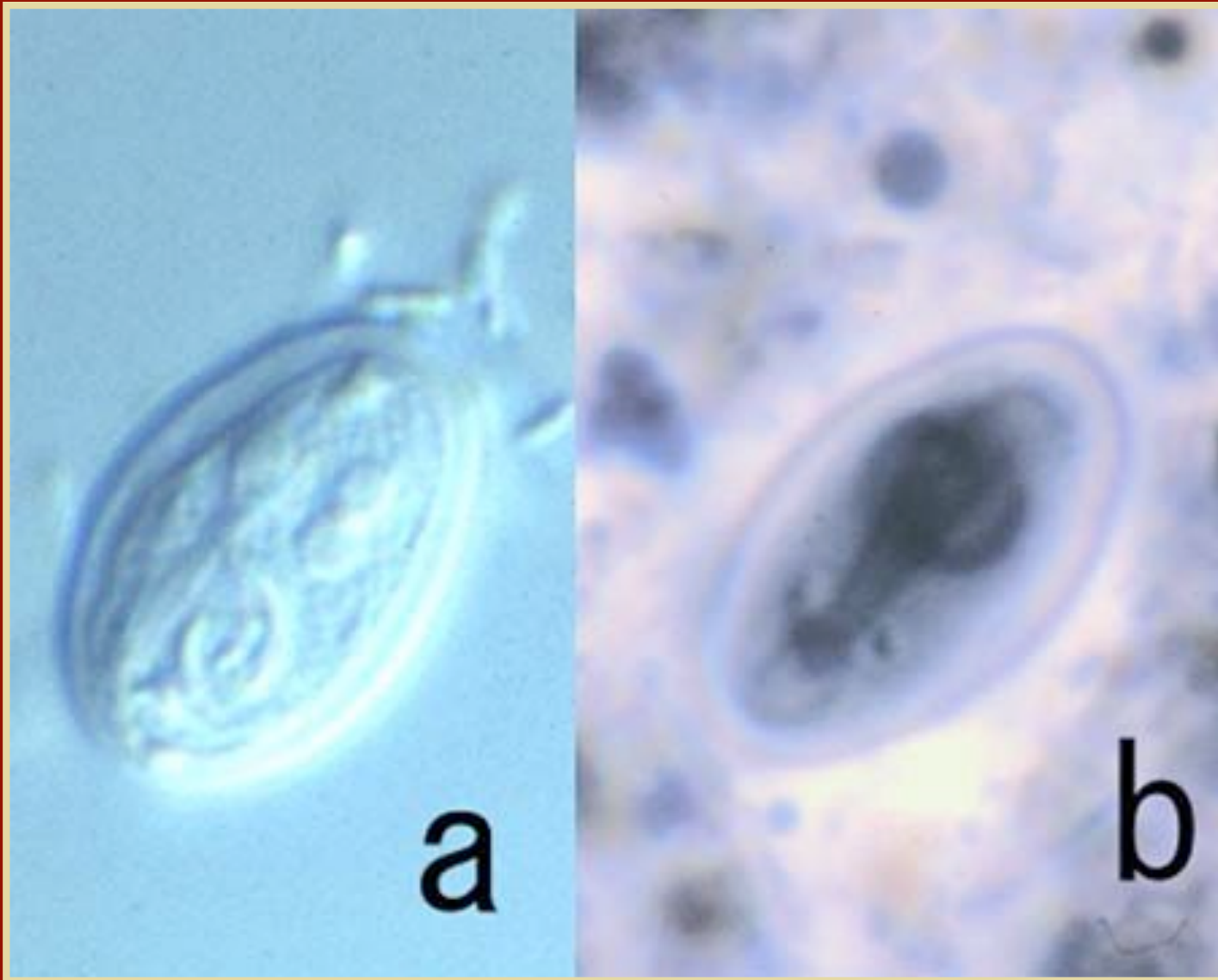
Différentes techniques de microscopie
utilisées dans l'étude de *Giardia lamblia*

Giardia lamblia



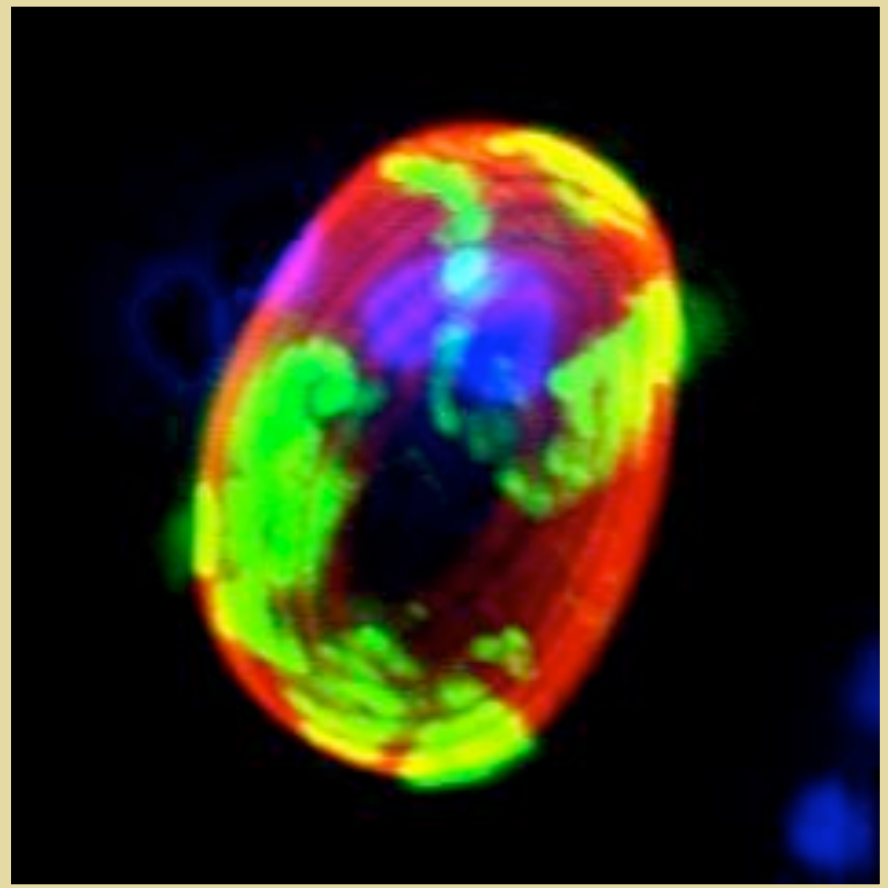
- Cycle, trophozoïte et kyste

Giardia lamblia



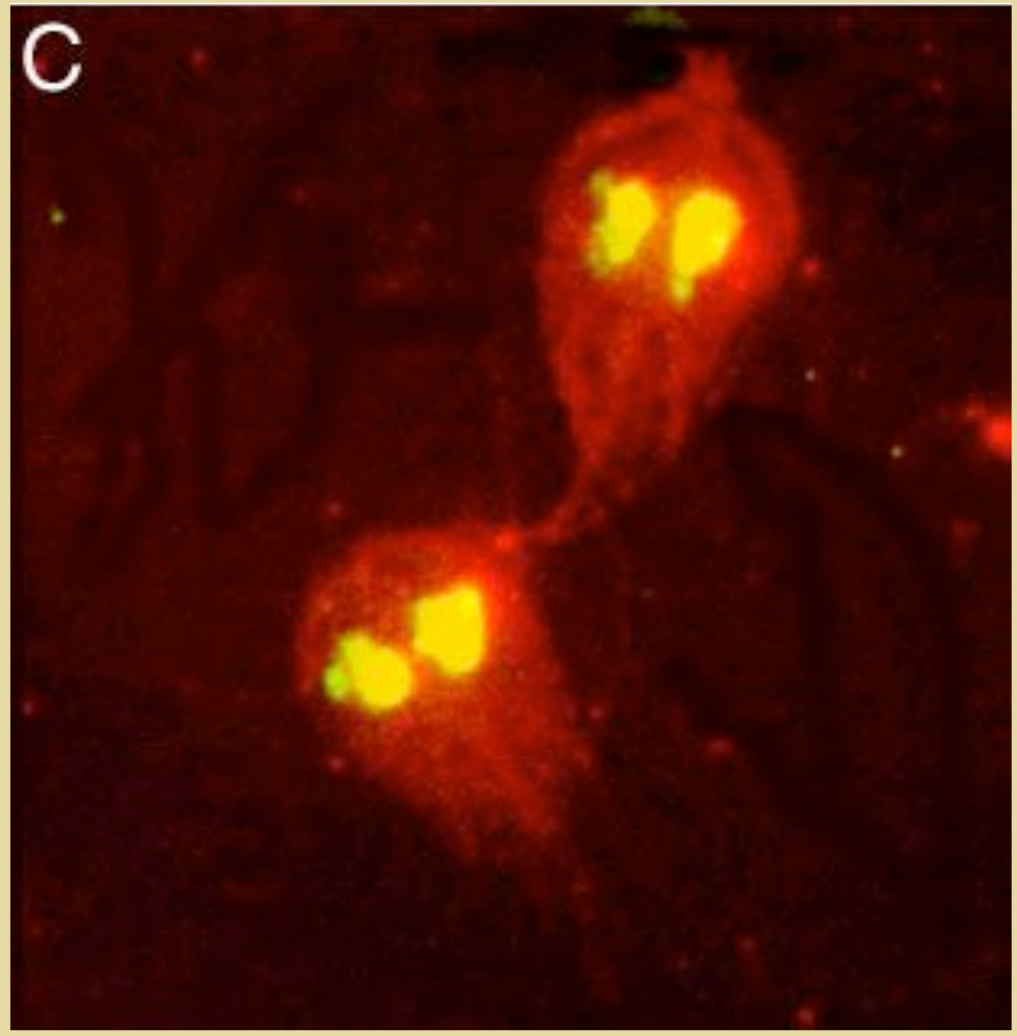
- Kyste

Giardia lamblia



- Kyste

Giardia lamblia



- Trophozoite

Giardia lamblia



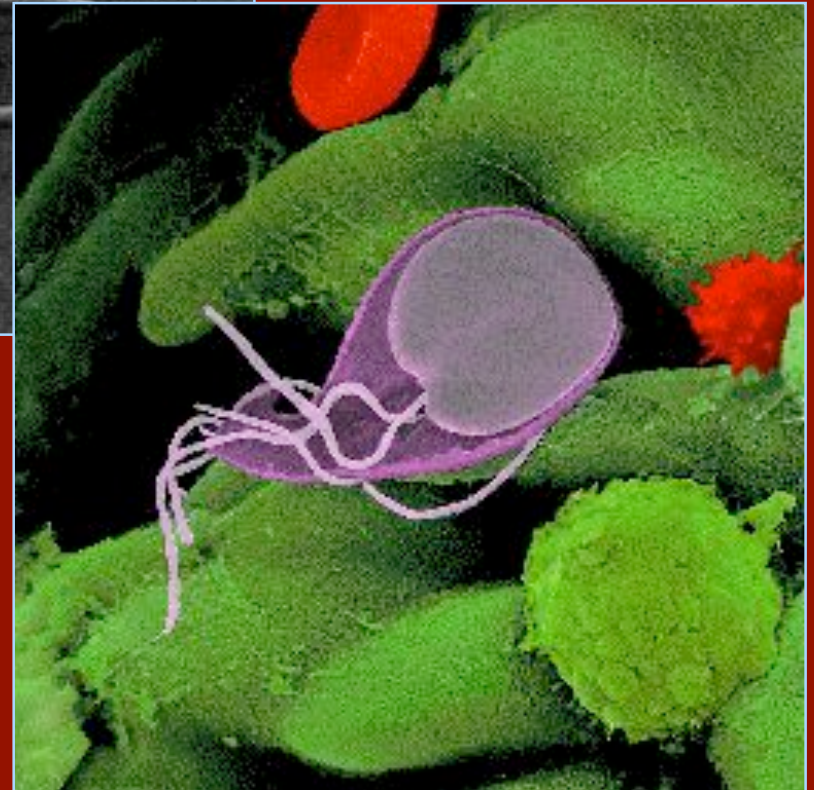
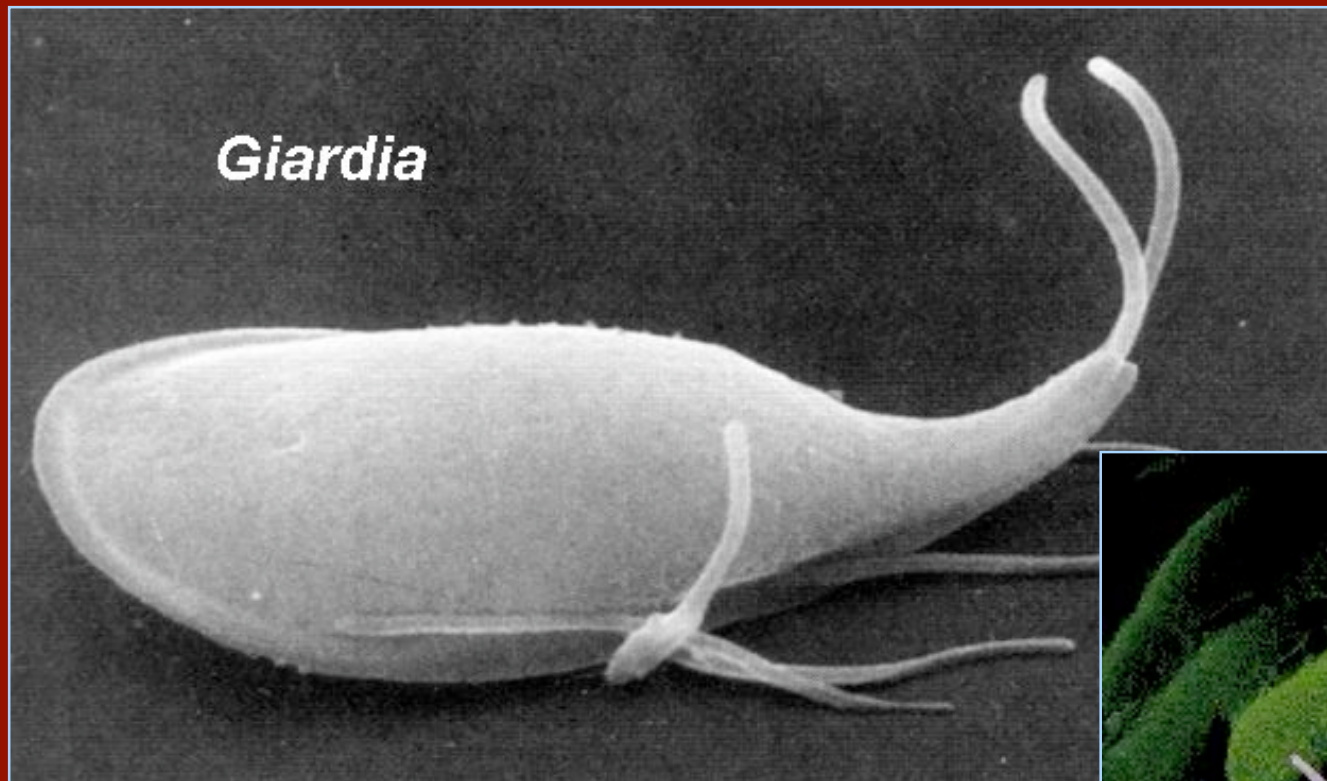
Fond noir



Contraste interférentiel

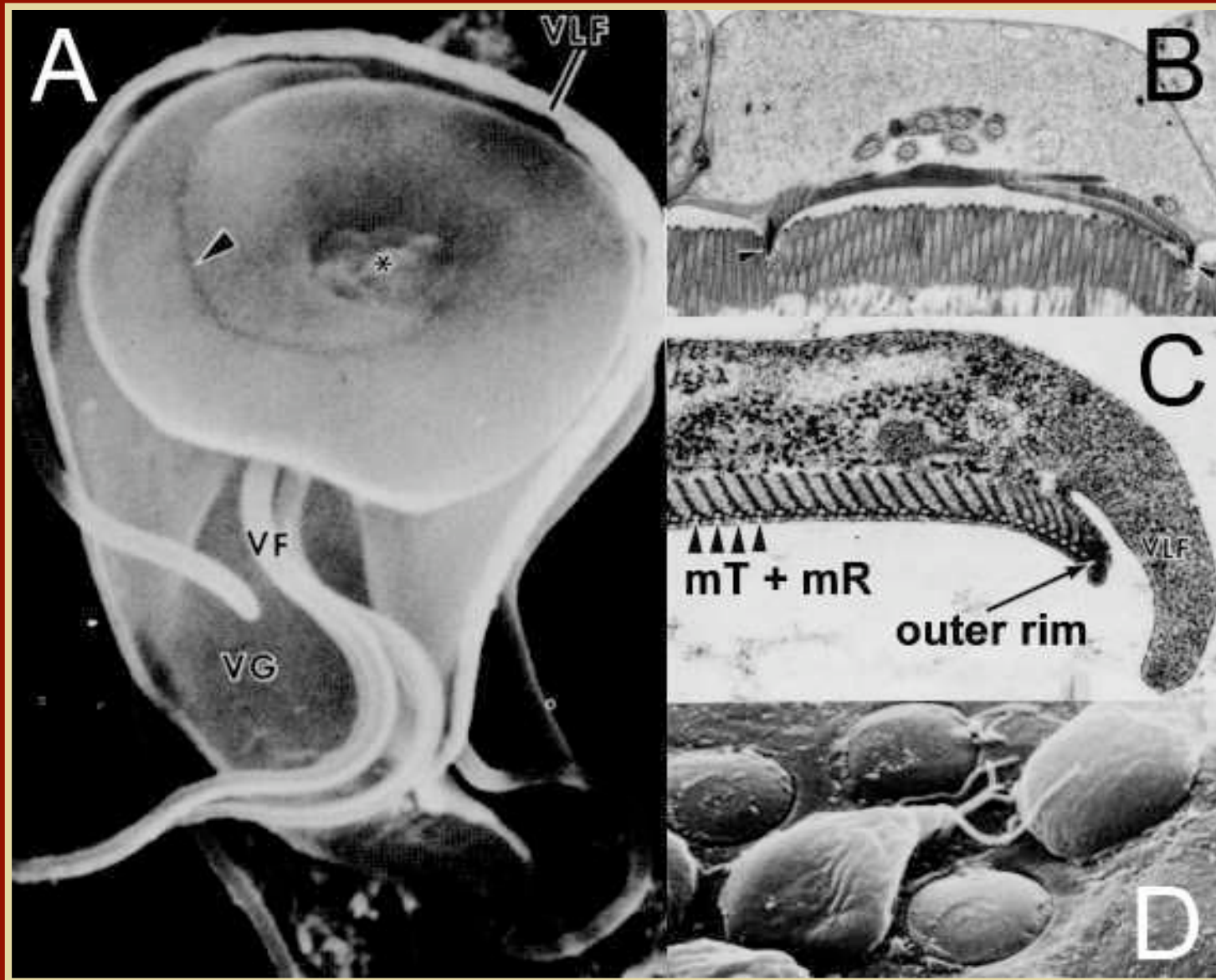
- Trophozoïte

Giardia lamblia



- Trophozoöte

Giardia lamblia

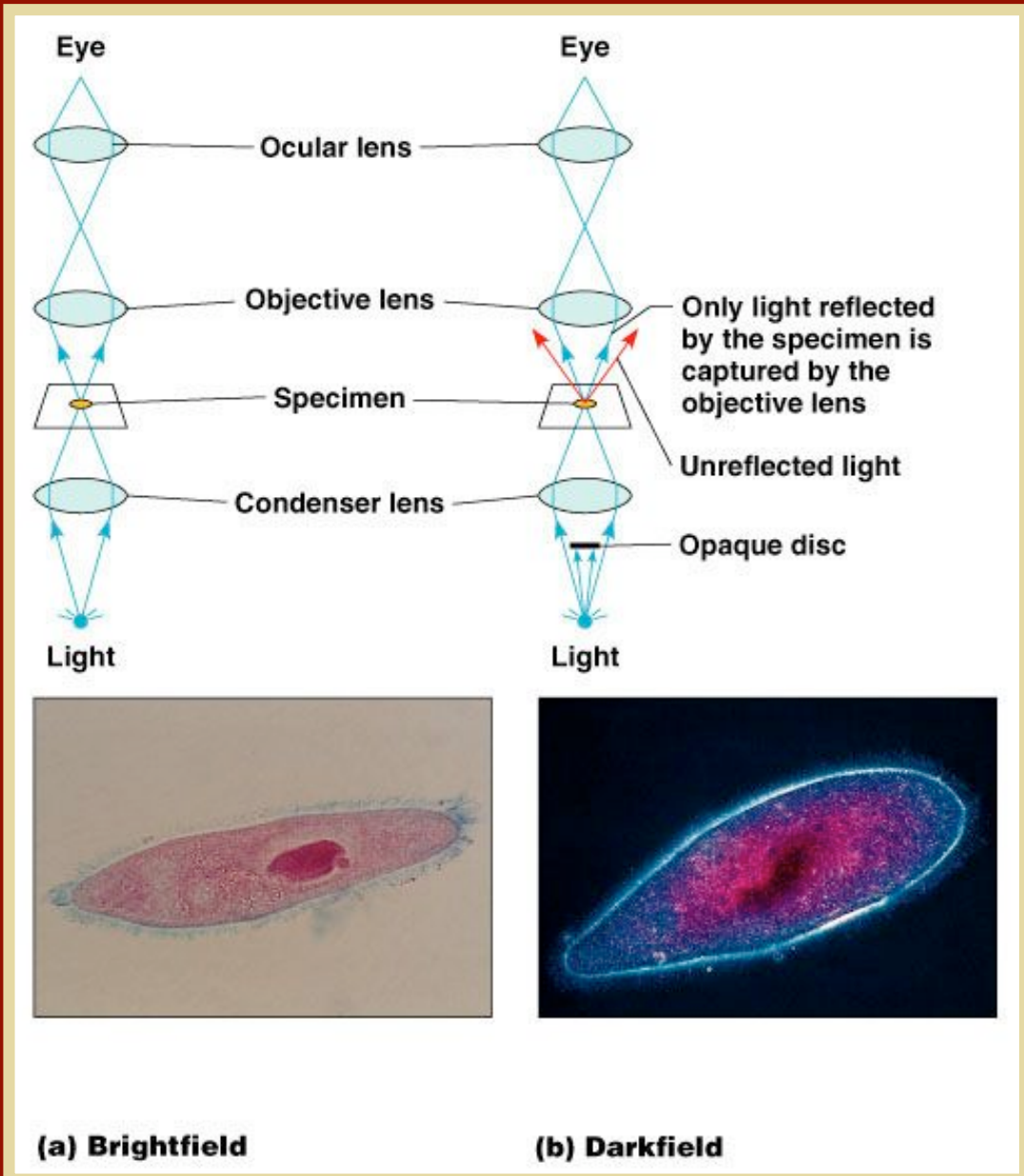


- Trophozoite

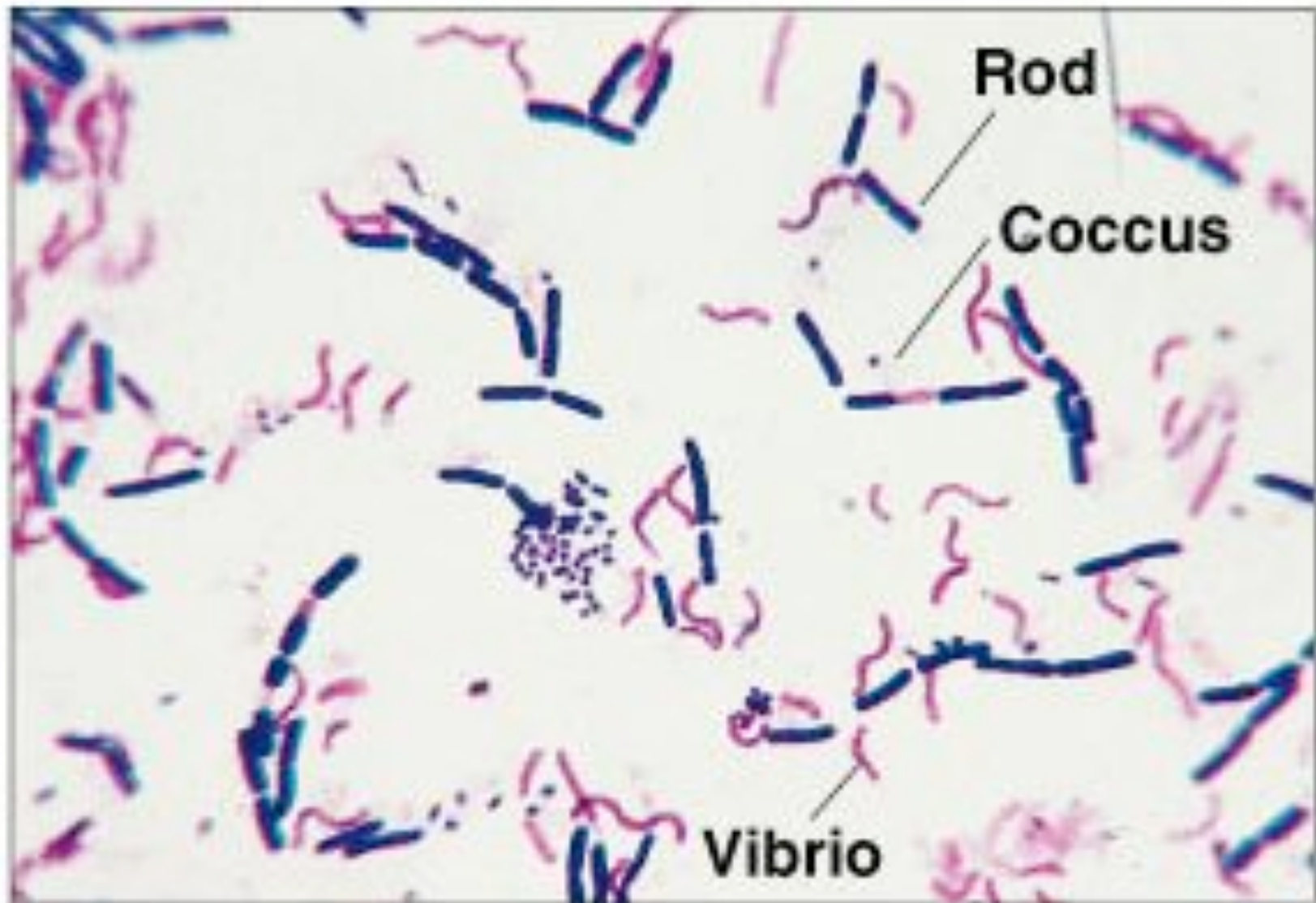
Différentes techniques de microscopie

Fond Clair

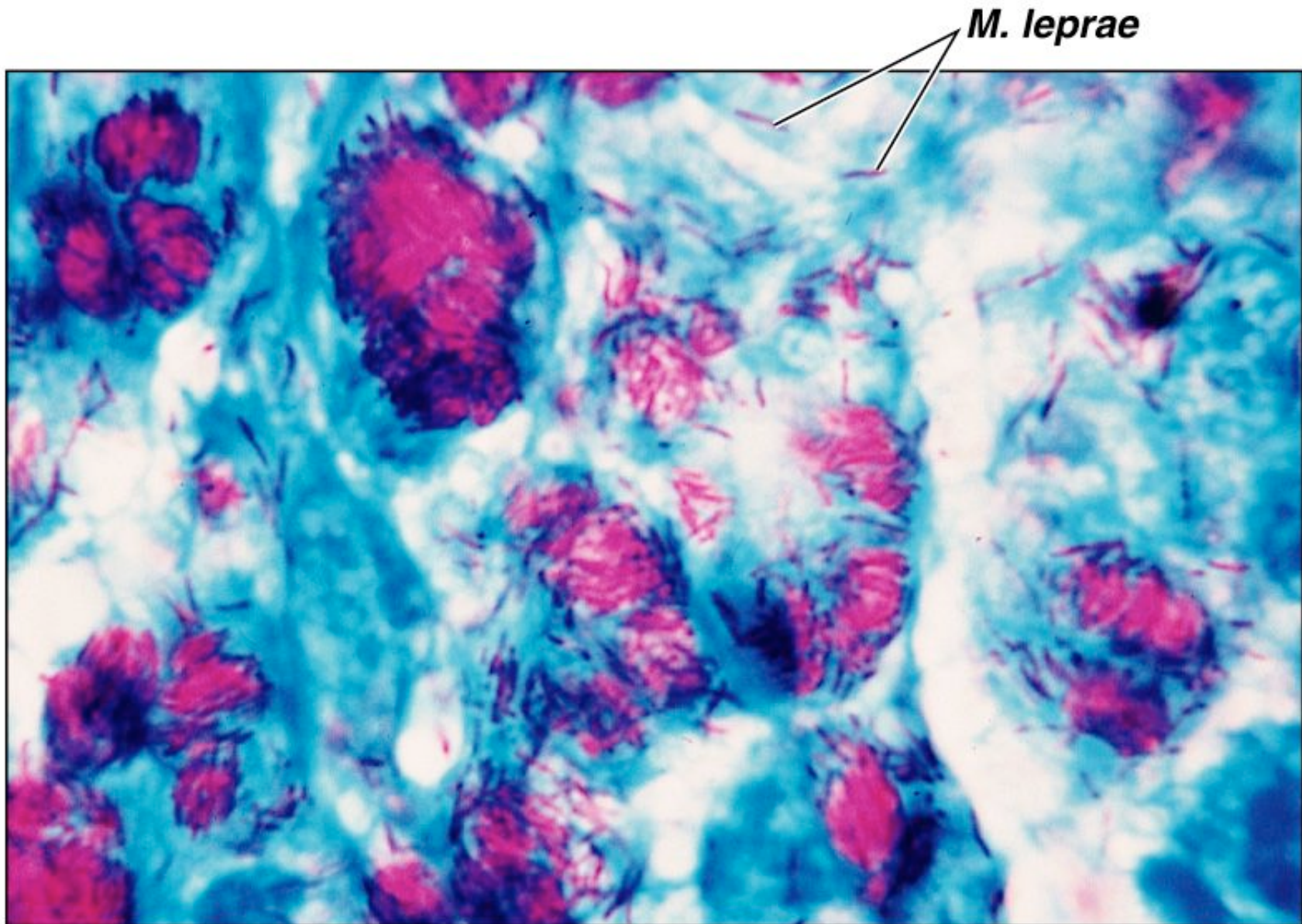
- Les objets opaques sont visibles sur un fond clair
- La lumière réfléchie par l'objet ne doit pas traverser l'objectif



Coloration de Gram

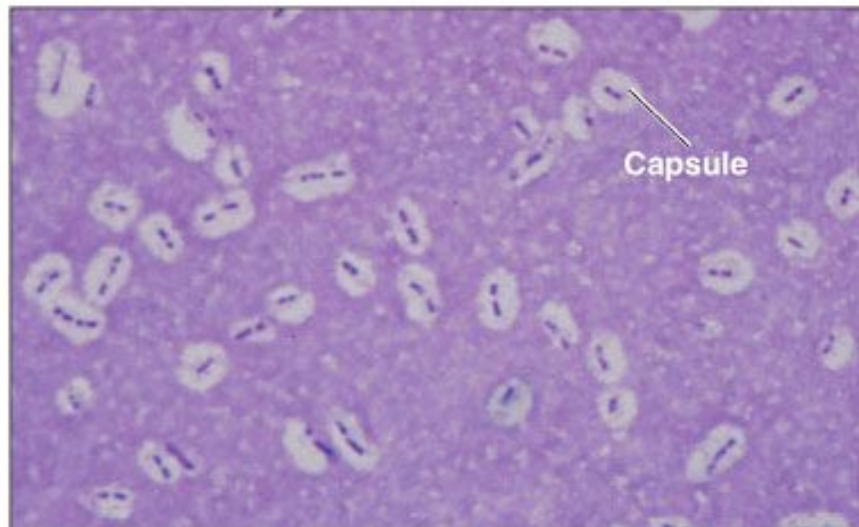


Coloration de Ziehl-Neelsen

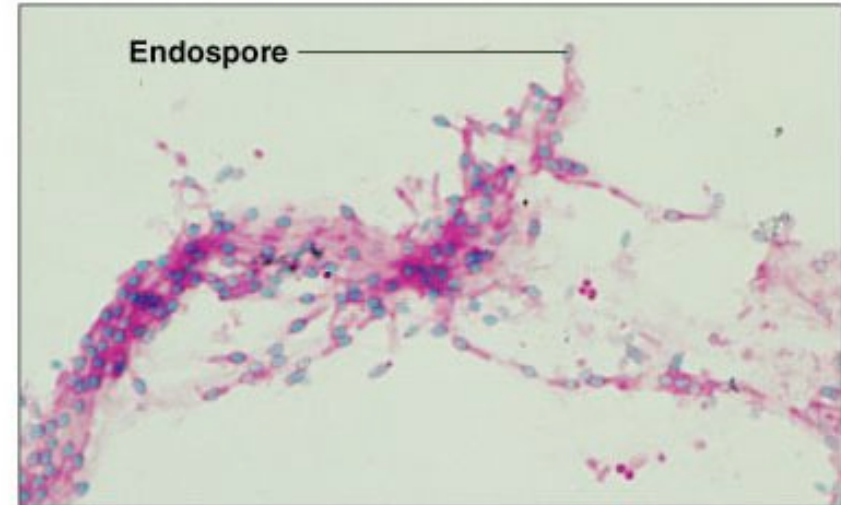


Autres Colorations

- Coloration négative à l'encre de Chine
- Coloration de spores
- Coloration de flagelles



(a) Negative staining.



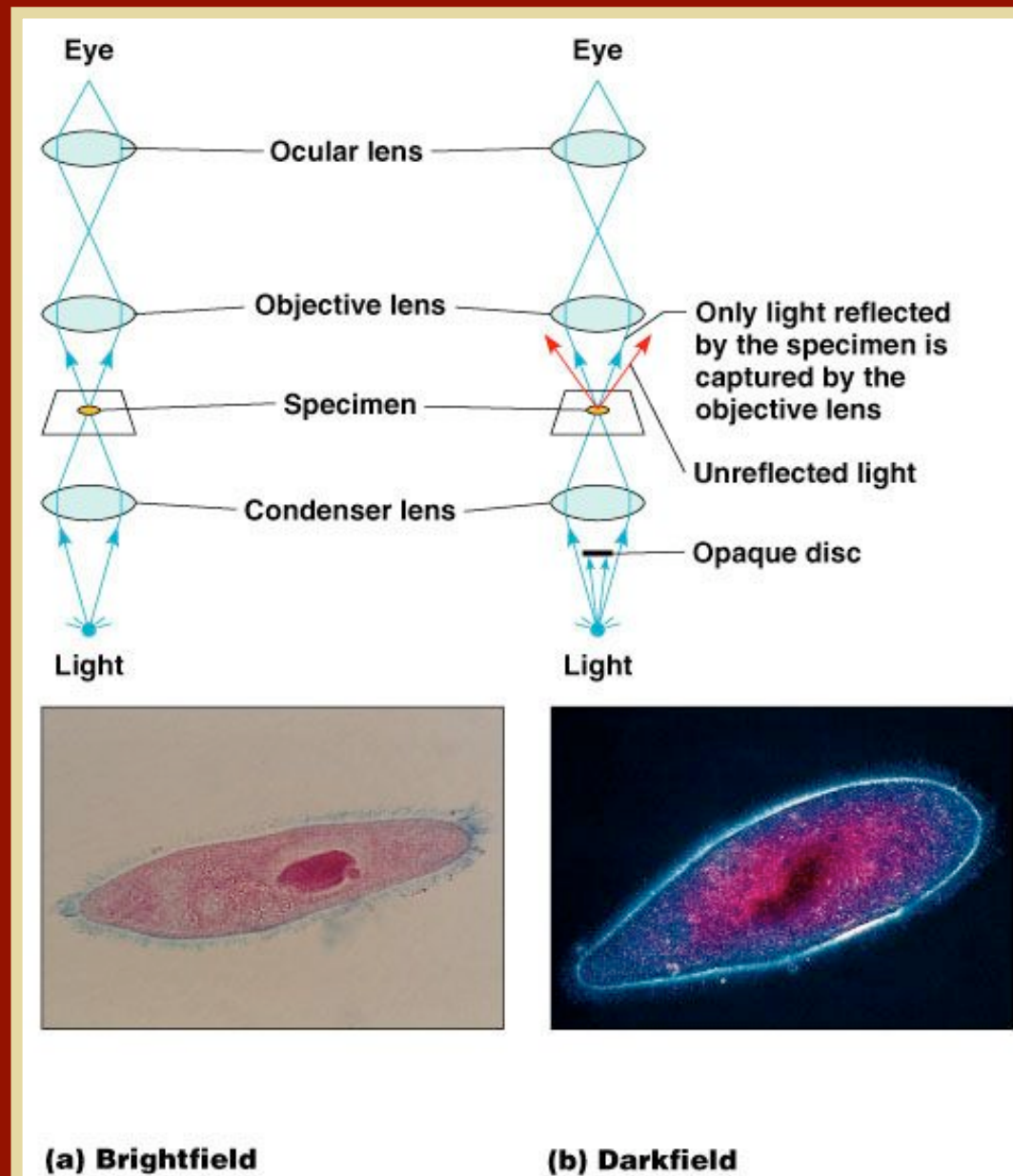
(b) Endospore staining.



(c) Flagella staining.

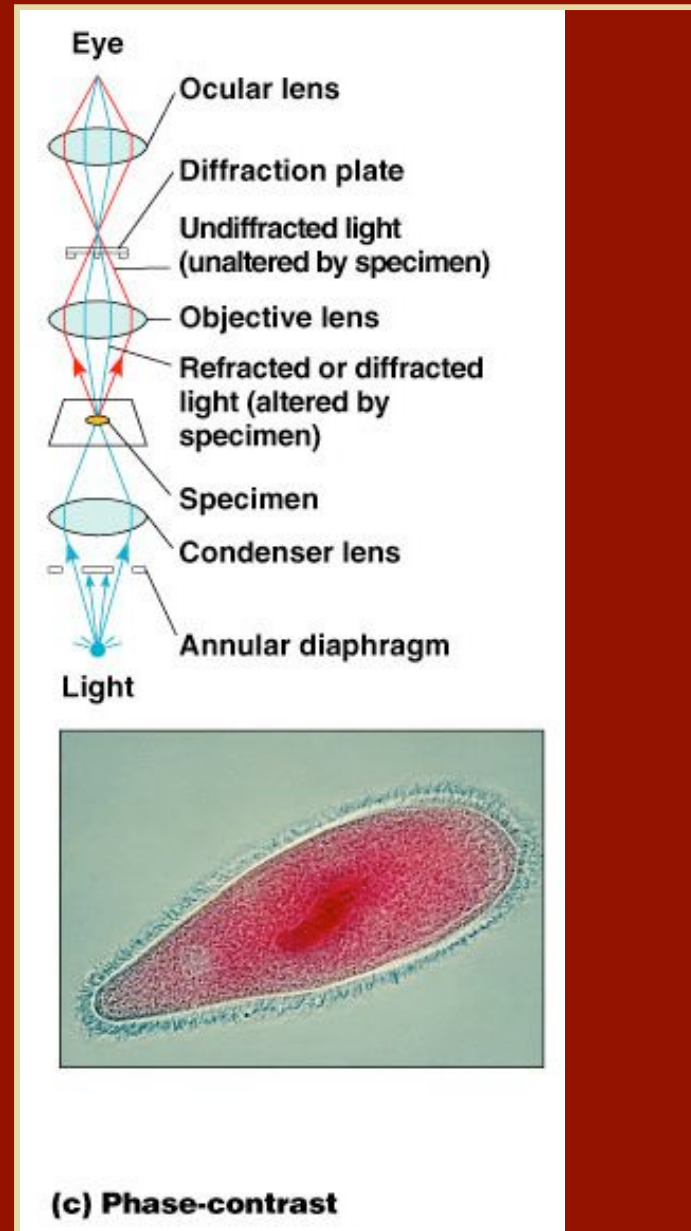
Fond Noir

- Les objets sont visibles sur un fond noir
- Seulement la lumière réfléchie par l'objet traverse l'objectif



Contraste de Phase

- Accentue la diffraction de la lumière qui traverse l'objet

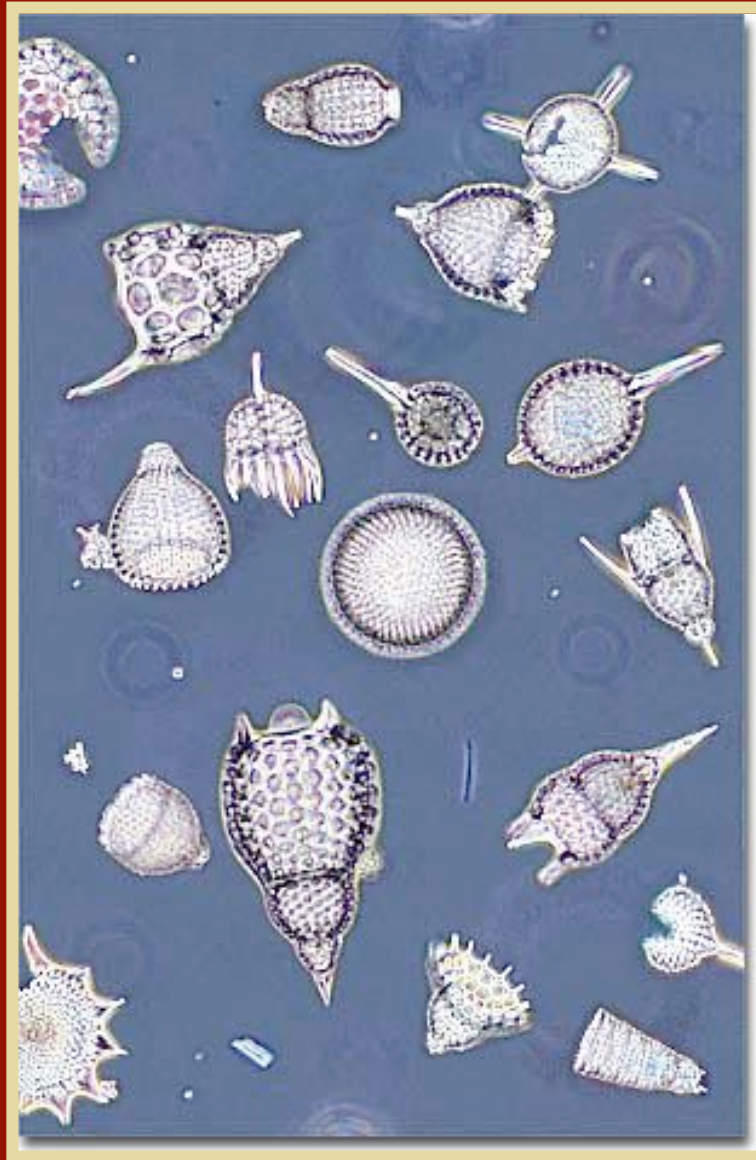


Contraste de Phase



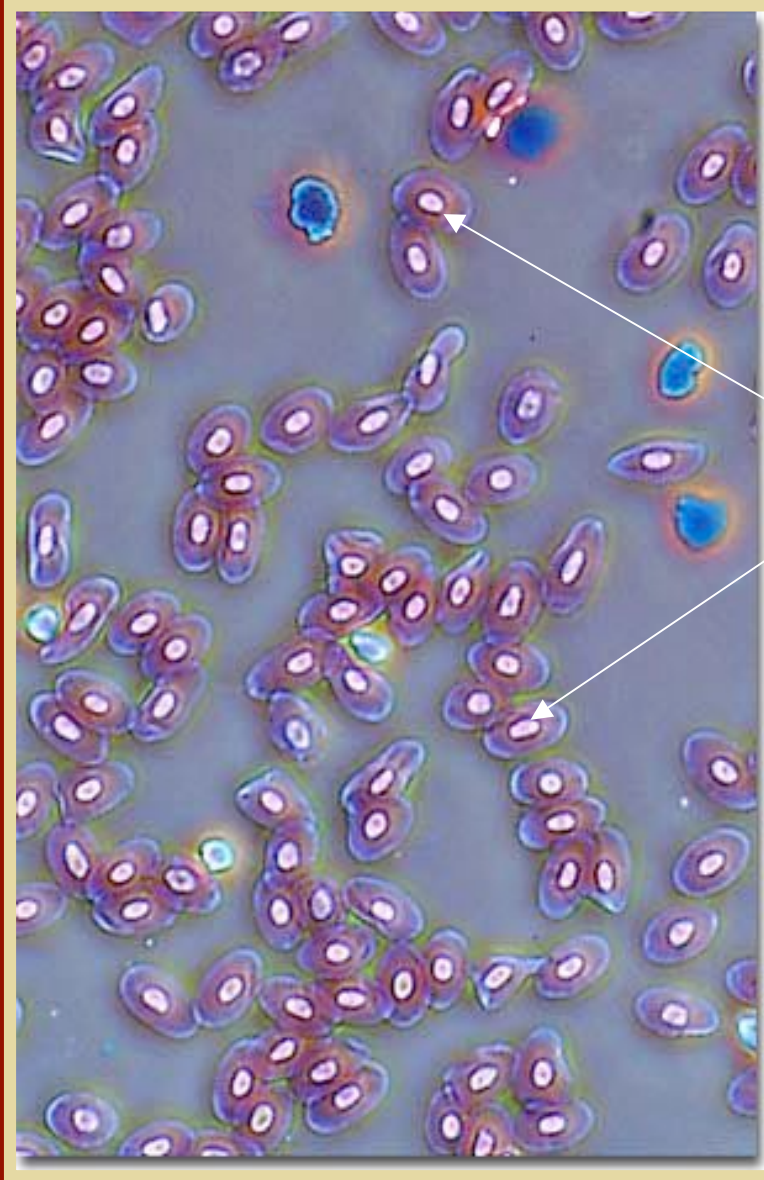
- Paramécie (Phaco)

Contraste de Phase



- Radiolaires (Phaco)

Contraste de Phase

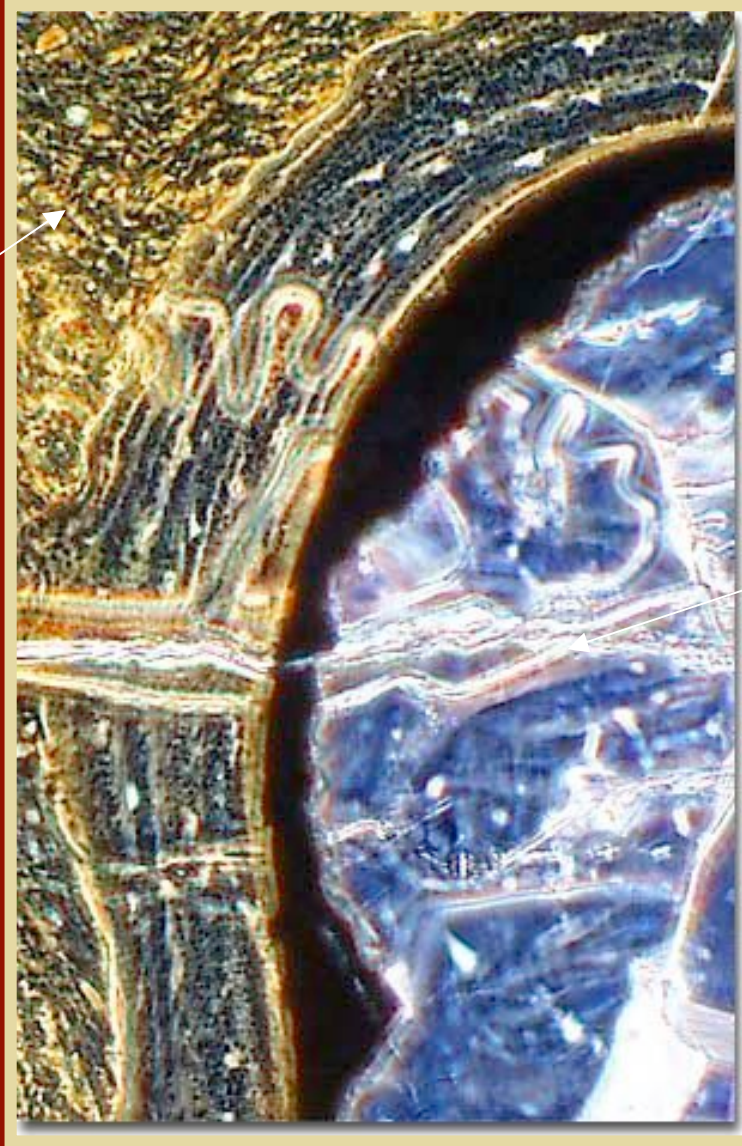


noyaux

- Globules rouges d'amphibien (Phaco)

Contraste de Phase

agate



quartz

Os de dinosaure fossilisé par de l'agate (Phaco)

Contraste Interférentiel de Nomarski

- Accentue la diffraction de la lumière qui traverse l'objet: utilise plusieurs faisceaux lumineux

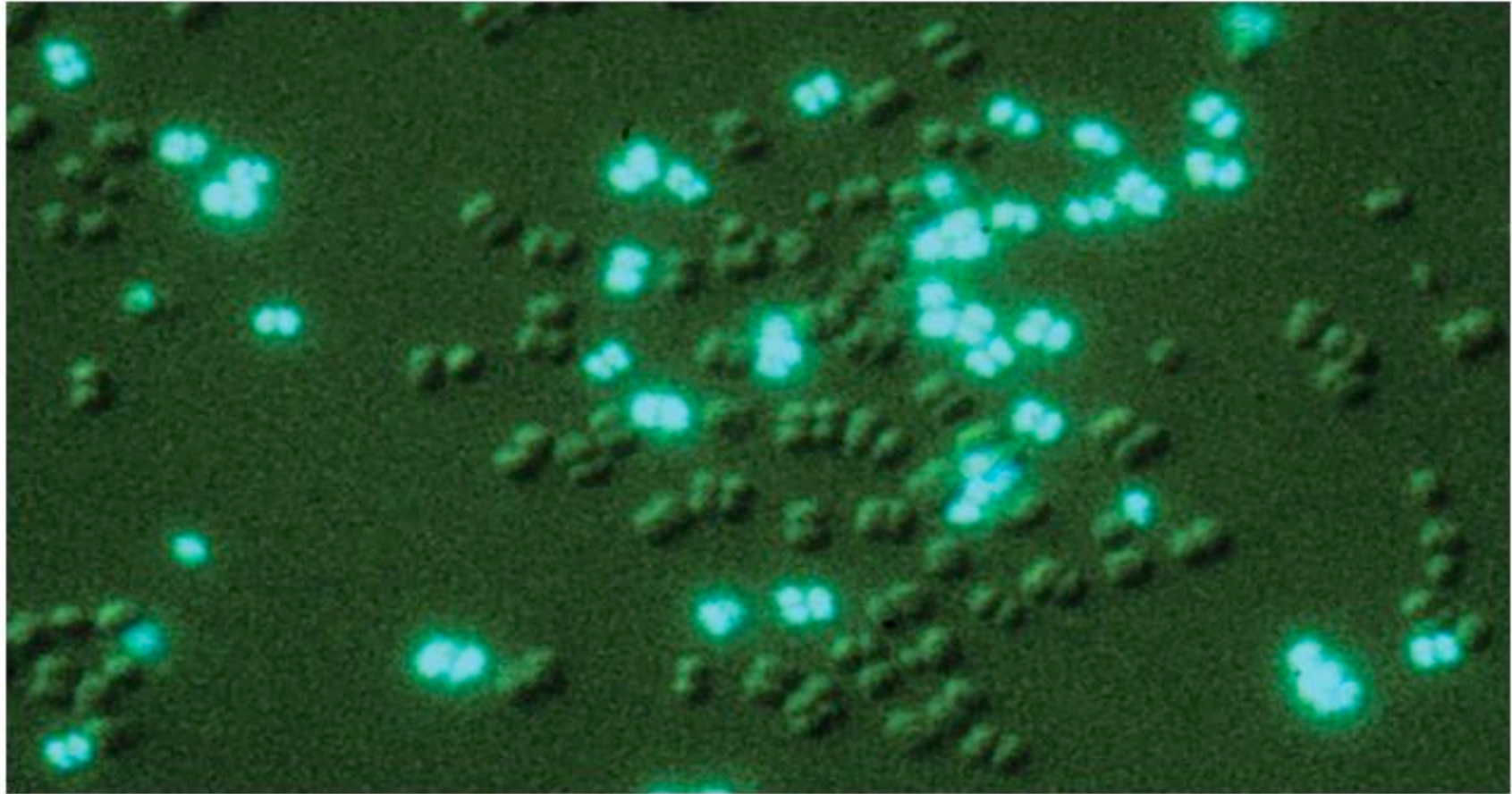


Epi-Fluorescence

- Utilise la lumière UV ou une longueur d'onde bien déterminé (e.g. bleu)
- Les substances fluorescentes absorbent la longueur d'onde d'excitation et émettent de la lumière dans le visible
- Les cellules peuvent être traitées avec des colorants fluorescents (fluorochromes)

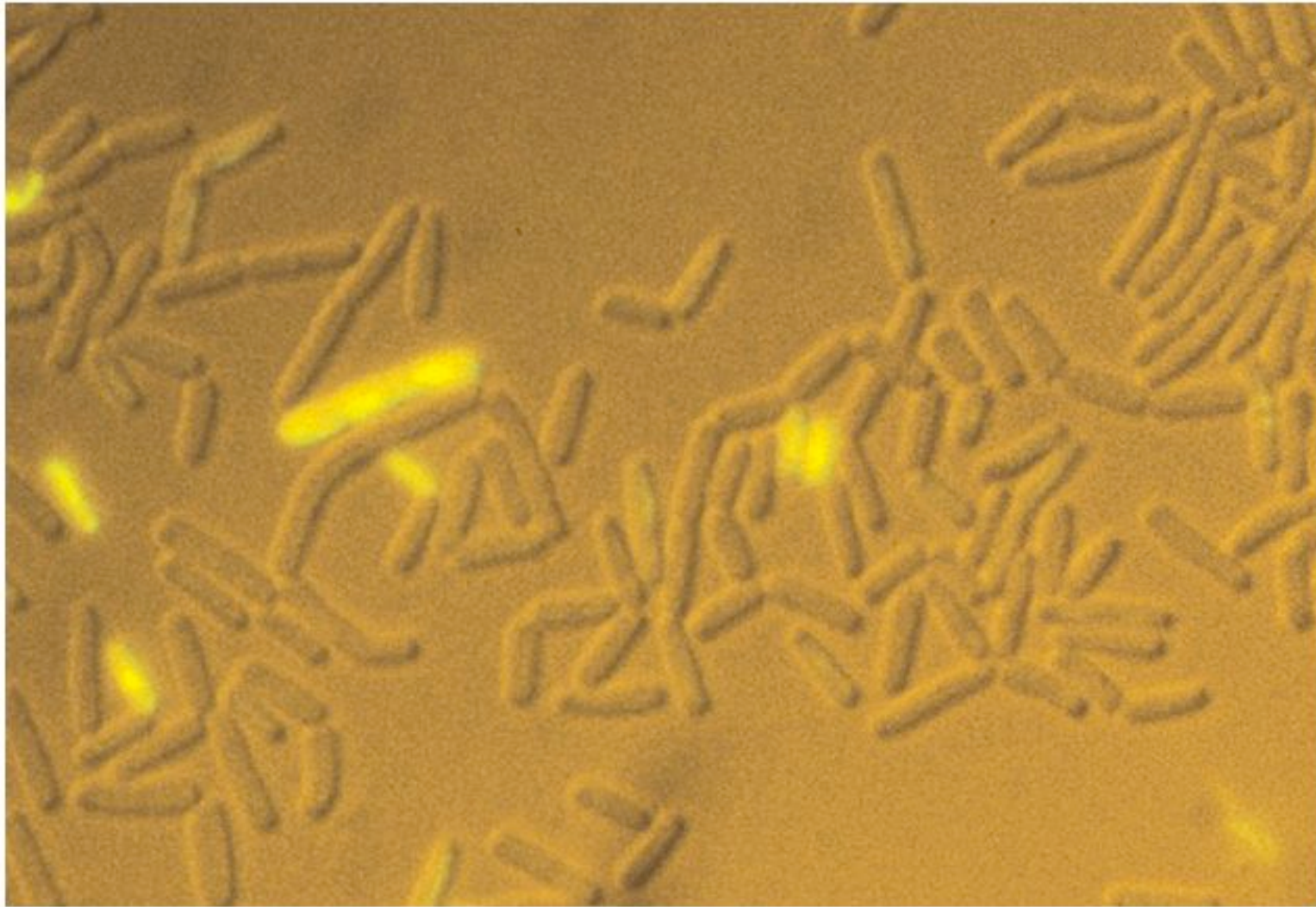


Epi-Fluorescence



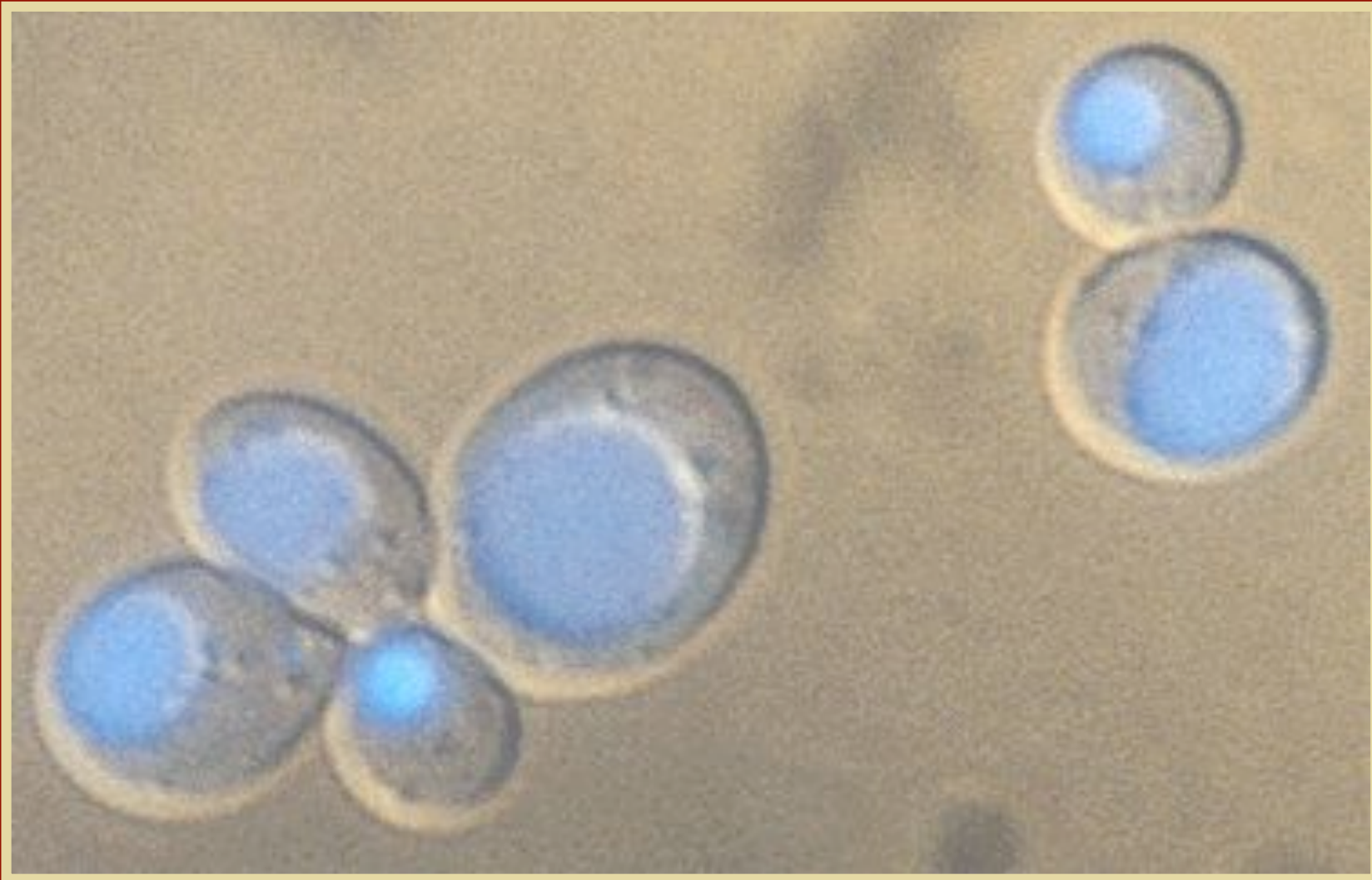
- Culture mixte de cellules viables et cellules tuées par l'alcool isopropylique de *Micrococcus luteus* teintées par le Bleu SYTOX (acides nucléiques), qui ne pénètre pas les membranes intactes. Les cellules mortes présentent une fluorescence bleu.

Epi-Fluorescence



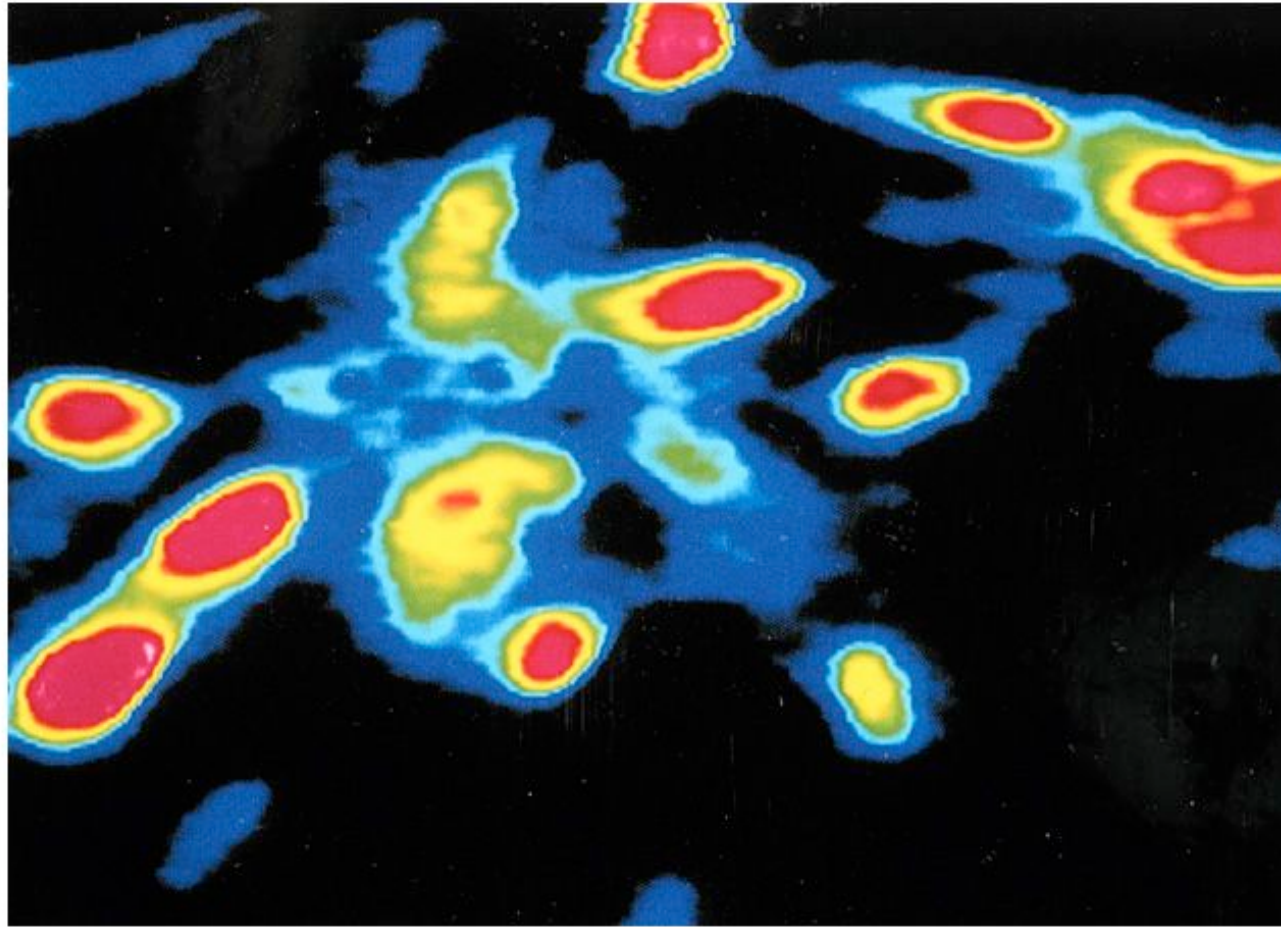
Bacillus cereus teint avec du vert SYTOX (acides nucléiques).

Epi-Fluorescence



Vacuoles des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) teintées avec le 7-amino-4-chloromethylcoumarin, L-arginine amide (Arg-CMAC).

Epi-Fluorescence



- **Cellule cérébrales de l'hypothalamus teintes avec du Calcium Green-1. Les cellules répondent au neurotransmetteur glutamate avec l'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique.**

Confocal à Balayage Laser

- Utilise des fluorochromes et de la lumière Laser
- Le laser illumine chaque plan de du spécimen pour produire une image 3D



Résolution

- La résolution est la propriété qui ont les lentilles ou l'instrument optiques à différencier deux points d'un échantillon.
- Un microscope avec un pouvoir de résolution de 0,4 nm peut différencier deux points d'un écart de $\geq 0,4$ nm.
- Les faisceaux de lumière de longueur d'onde courtes permettent une meilleure résolution.

Microscopie électronique

- **La microscopie électronique utilise des électrons à la place de la lumière (photons)**
- **La longueur d'onde plus courte des électrons permet une résolution plus importante**

Electronique à Balayage (MEB)

Microscope électronique à balayage

* Principe :

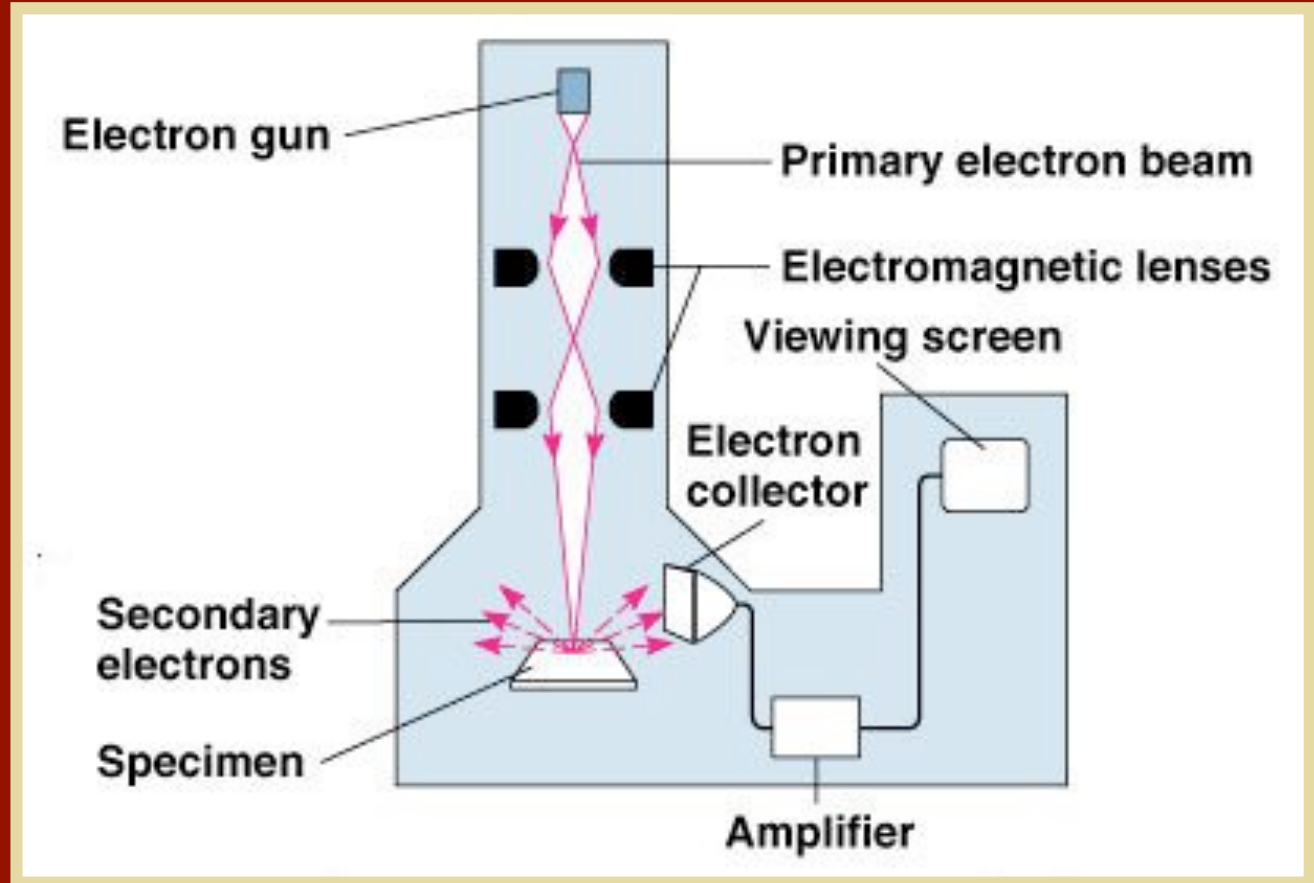
Les électrons réfléchis par la surface d'un objet métallisé
(coupe de tissu ou micro-objet) sont captés par un récepteur et l'image de la surface de l'objet apparaît sur un écran après balayage de toute sa surface

* Fonctionnement :

agit sur le principe d'une grosse loupe

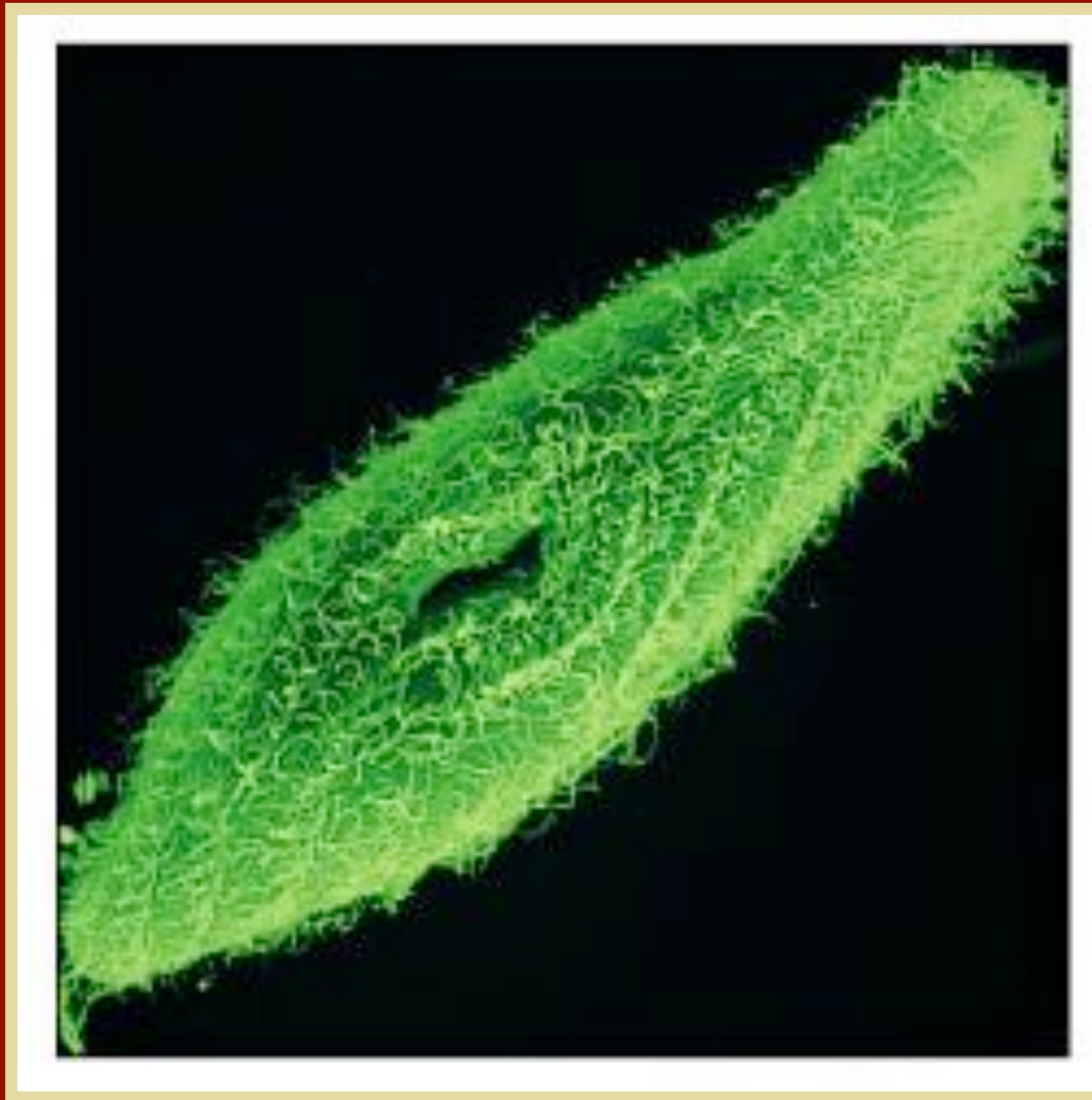
Electronique à Balayage (MEB)

- Un canon à électrons produit un faisceau d'électrons qui balaient la surface entière du spécimen
- Les électrons secondaires produits par le spécimen forment l'image



Electronique à Balayage (MEB)

- 10 000 - 100 000 $\times$; résolution 20 nm



Electronique à Transmission

Microscopie électronique à transmission

* Définition

Microscope utilisant comme source de rayonnement l'émission d'électrons émis par un filament (ce rayonnement ne peut exister que s'il existe un vide associé dans l'appareil)

* Principe

Source lumineuse: filament de carbure de tungstène chauffé, attraction des électrons par un champ électrique

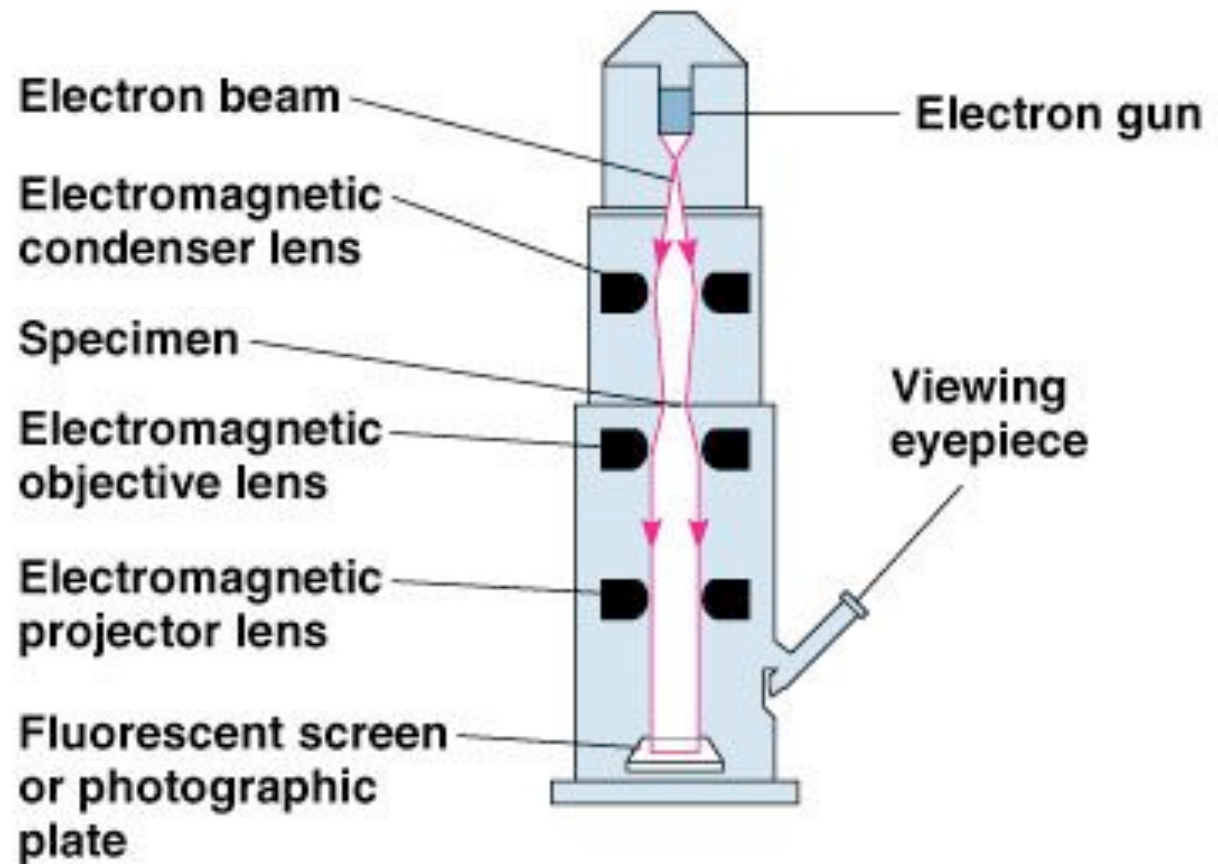
Lentilles électroniques : solénoïdes entraînant en plus de la condensation du faisceau un mouvement de rotation de celui-ci

Objet traité spécialement pour travailler sous vide

Le rayonnement transmis stimule un écran phosphorescent qui re-émet une lumière dans le visuel qui permet l'analyse de l'image (il faut donc travailler dans le noir)

Electronique à Transmission (MET)

- Coupes ultrafines des spécimens
- Le faisceau d'électrons traverse l'échantillon, puis une lentille électromagnétique jusqu'à l'écran ou la pellicule
- Les spécimens doivent être traités avec des sels de métaux lourdes

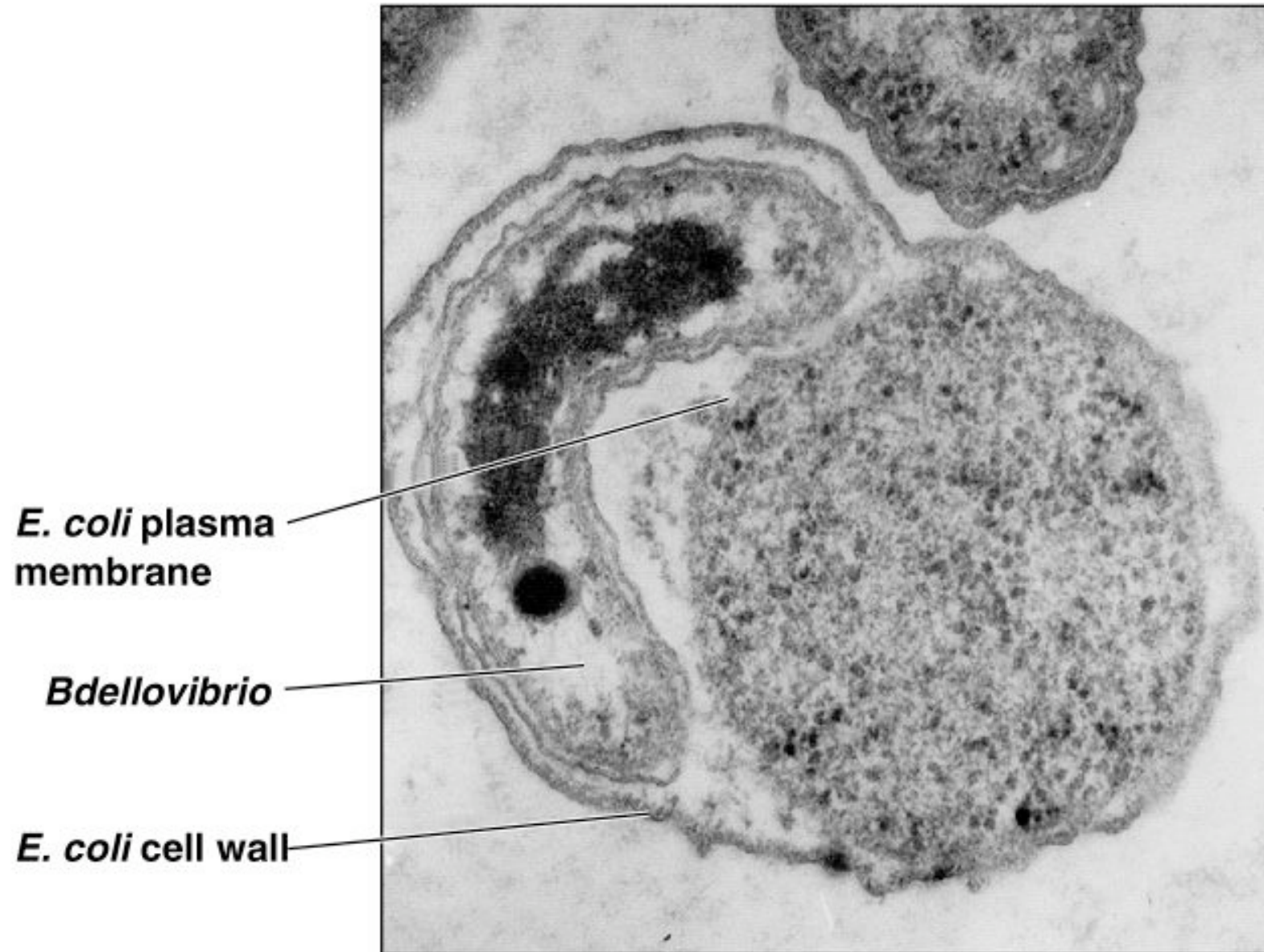


Electronique à Transmission (MET)

- 100 000 - 1 000 000 × ; résolution 2,5 nm



Electronique à Transmission (MET)



Analyse élémentaire

Analyse en microscopie électronique

* Définition :

Le rayonnement re-émis par les atomes de poids moléculaire supérieur à 23 après stimulation par un flux d'électrons a une longueur d'onde proportionnelle à l'énergie des électrons déplacés au sein des atomes stimulés

* Mécanisme

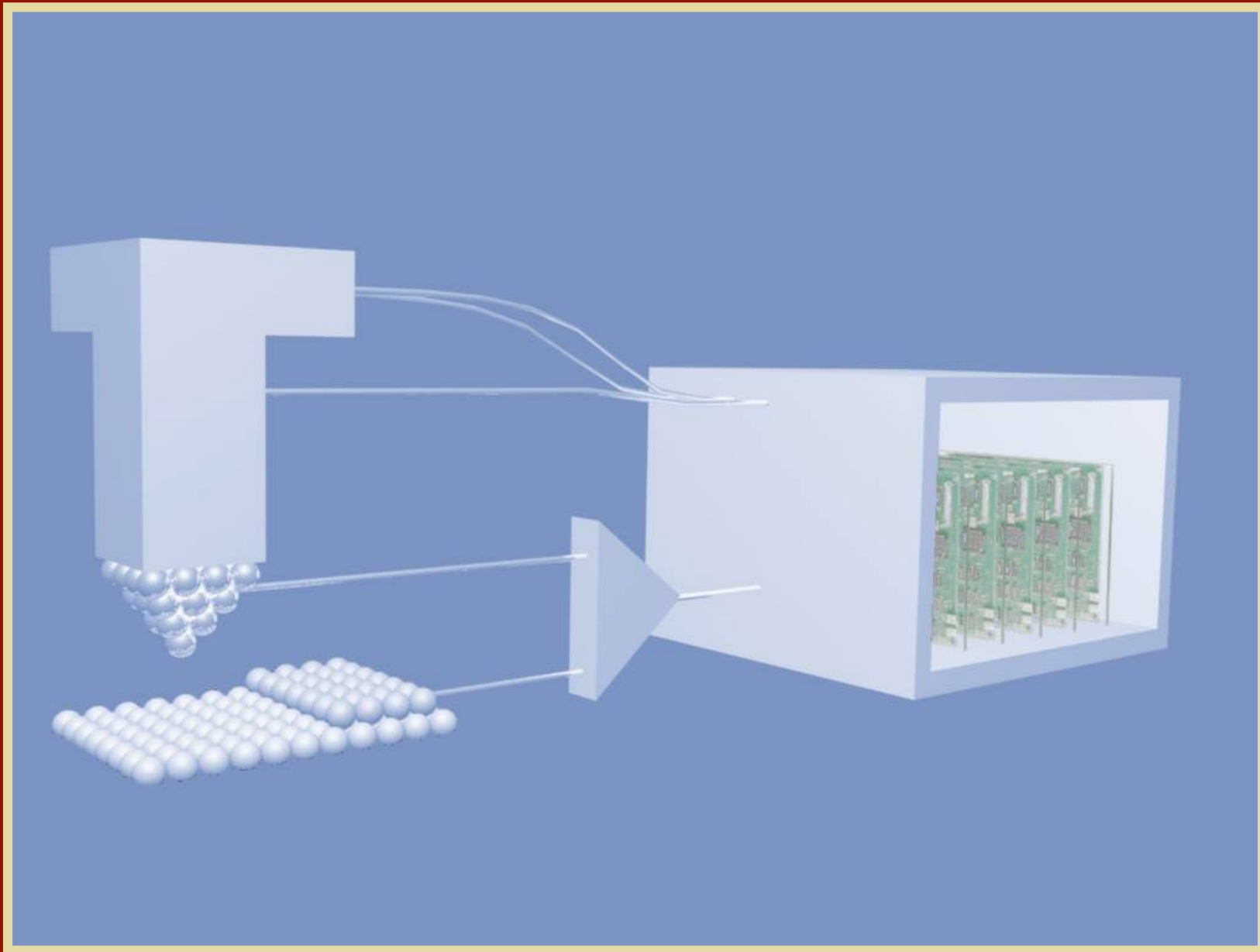
Émission électronique (sous vide)

Stimulation de l'objet non colore (zone sélectionnée en microscopie de transmission)

Analyse du rayonnement re-émis dont les pics de longueur d'onde (ou raies) permettent l'identification de l'atome détecté et de sa concentration

Identification des raies par un programme d'analyse automatique

Microscopie à Champ Proche



Microscopie à Champ Proche

La microscopie à champ proche

C'est à G. Binnig et H. Rohrer que l'on doit l'invention du premier microscope à effet tunnel. Ce dernier voit le jour il y a un peu plus de vingt ans dans les laboratoires d'IBM à Zurich. Grâce à leur invention, Binnig et Rohrer obtiennent le prix Nobel de physique en 1986. A l'heure actuelle, d'autres techniques dérivées existent; elles sont toutes regroupées sous le nom de microscopie à champ proche ou à sonde locale.

Microscopie à Champ Proche

La microscopie à champ proche (SPM : Scanning Probe Microscopy) regroupe un large éventail de techniques microscopiques où une sonde parcourt une surface à très faible distance. L'interaction qui s'établit entre la sonde et la surface de l'échantillon étudié, est enregistrée et visualisée sous forme d'image.

Microscopie à Champ Proche

Citons les deux formes principales de microscope à sonde locale: le microscope à effet tunnel (STM: Scanning Tunneling Microscope) qui utilise l'émission par effet tunnel d'électrons entre l'échantillon et une pointe métallique, et le microscope à force atomique (AFM: Atomic Force Microscope) qui utilise les forces de Van der Waals des atomes d'une surface agissant sur une pointe, localisée en bout d'un bras de levier.

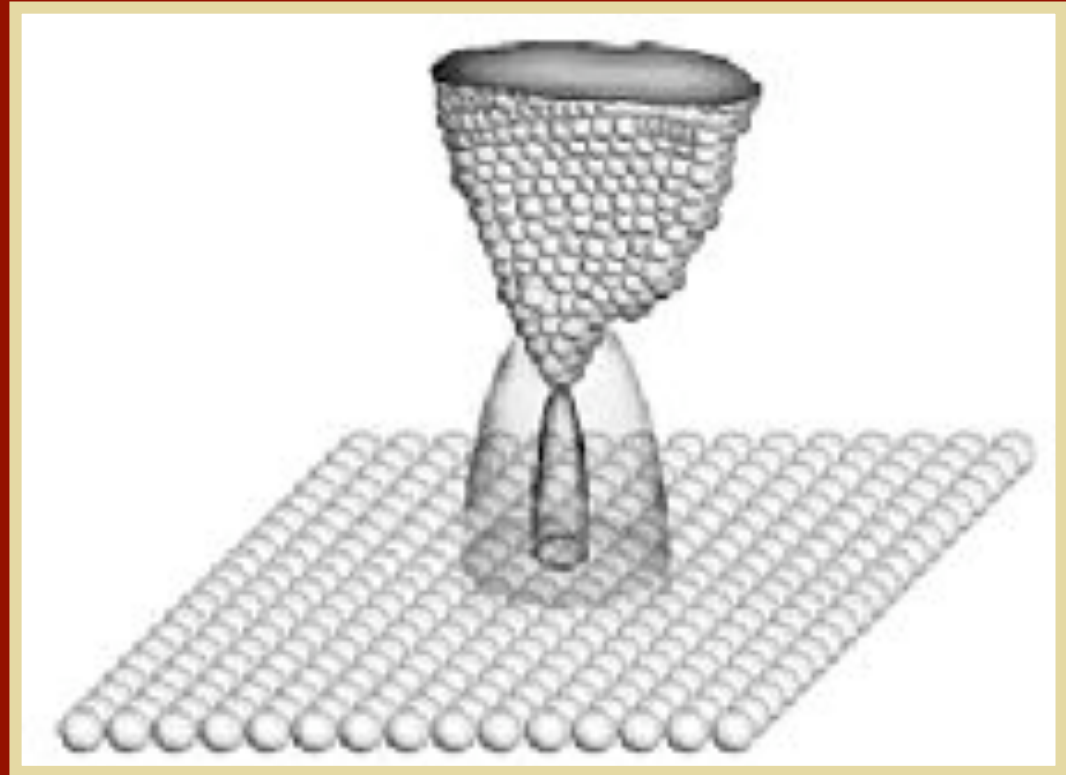
D'autres techniques existent, où les interactions utilisées peuvent être d'origine électrique (EFM: Electrostatic Force Microscope), magnétique (MFM: Magnetic Force Microscope),...

Effet Tunnel

Effet tunnel : en mécanique quantique, phénomène selon lequel une particule, arrivant sur une «barrière» au potentiel d'énergie plus élevé que la particule elle-même, possède une probabilité non nulle de traverser cette barrière (comme dans un tunnel).

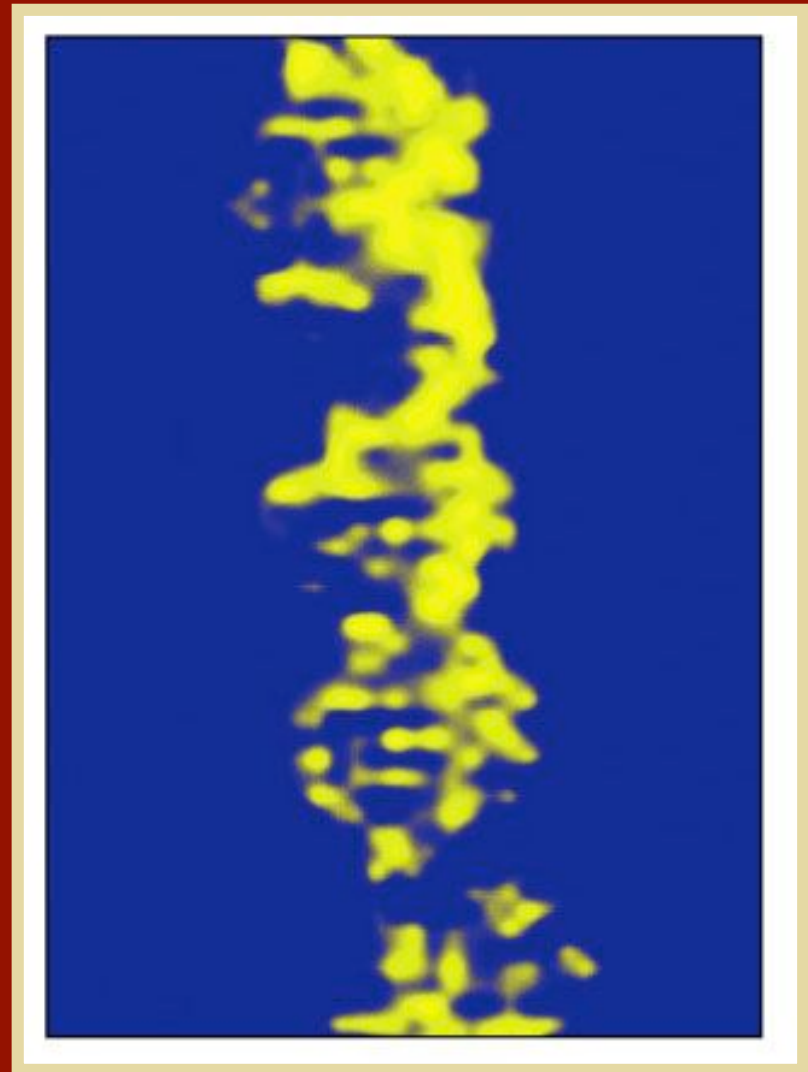
Microscopie à effet tunnel

- La microscopie à effet tunnel utilise une sonde métallique pour balayer l'échantillon
- La résolution est de 1/100 d'atome



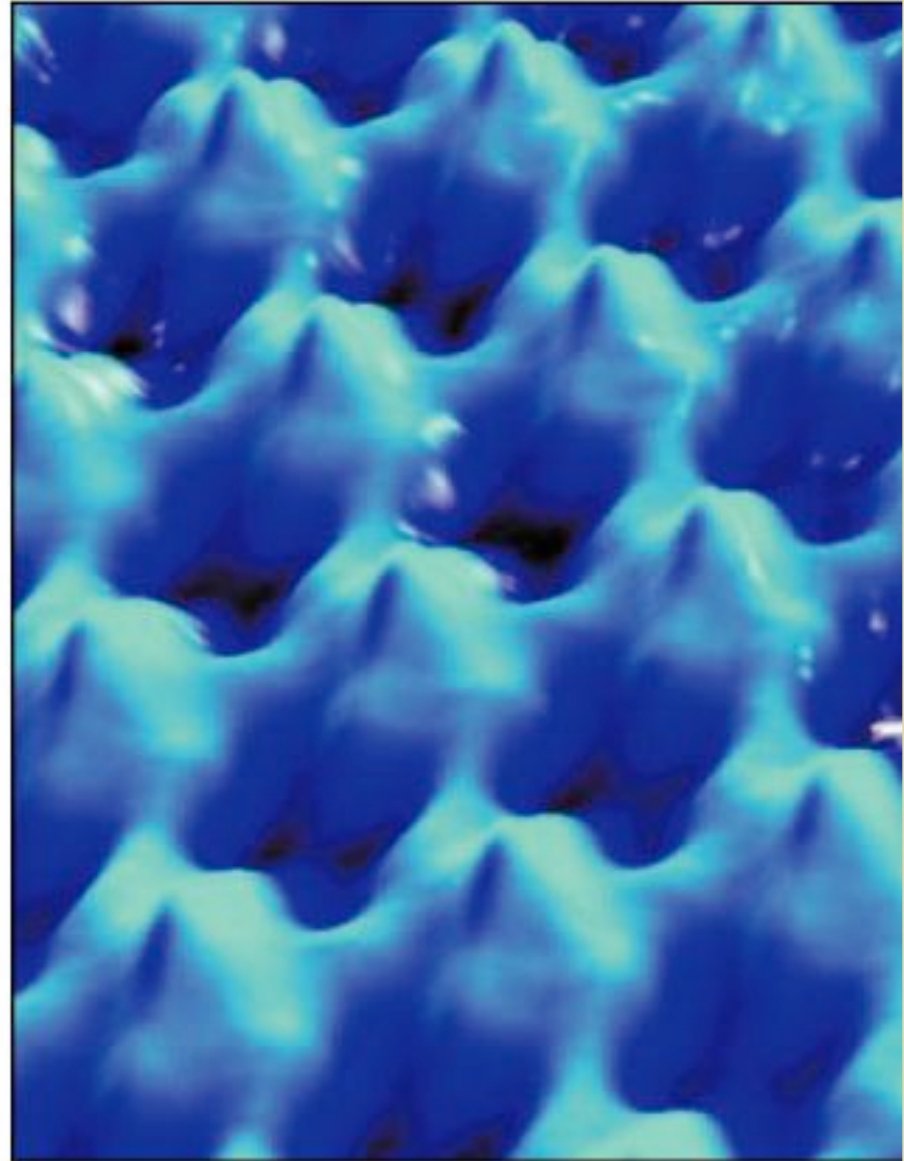
Microscopie à effet tunnel

- La microscopie à effet tunnel utilise une sonde métallique pour balayer l'échantillon
- La résolution est de 1/100 d'atome



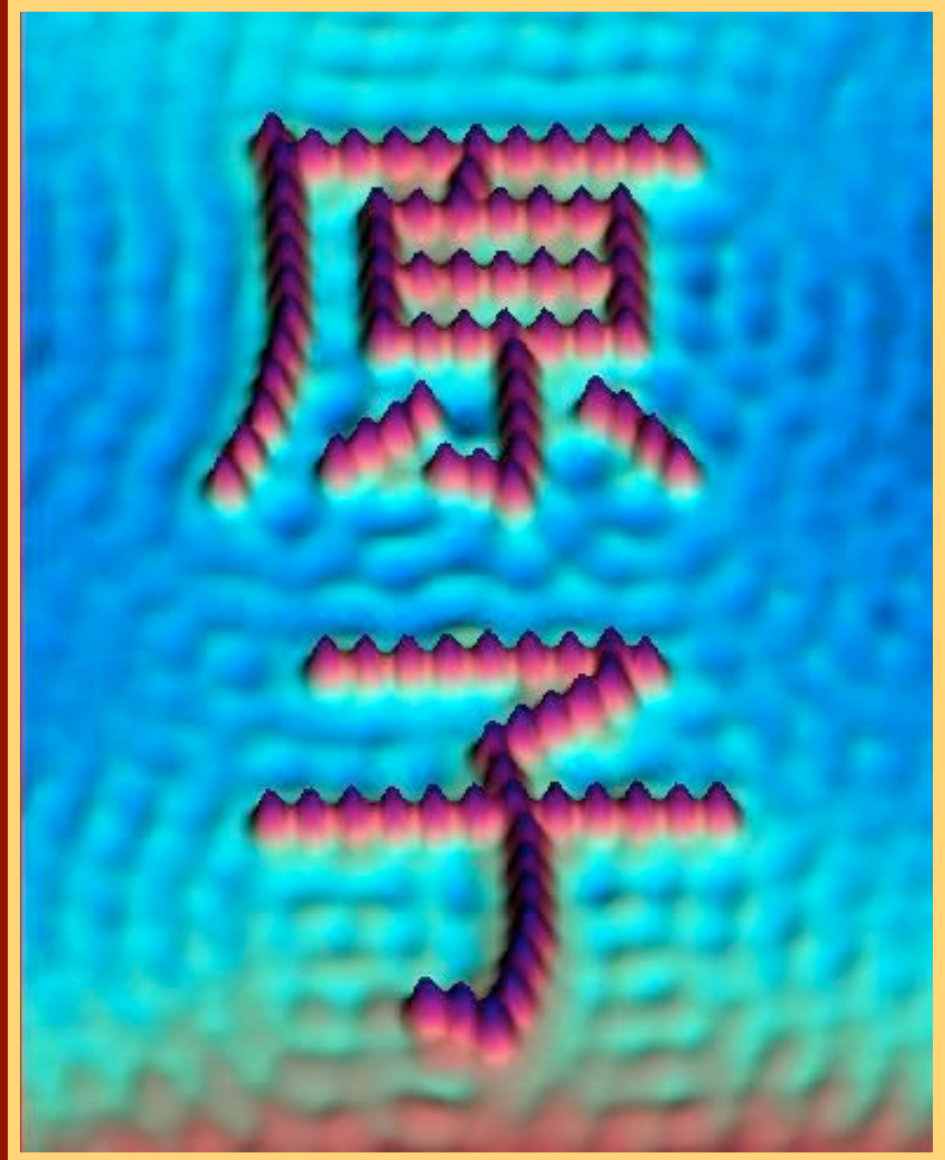
AFM (Microscopie à Force Atomique)

- L'AFM utilise un métal et une sonde en diamant très proche de l'échantillon
- Produit des images 3D



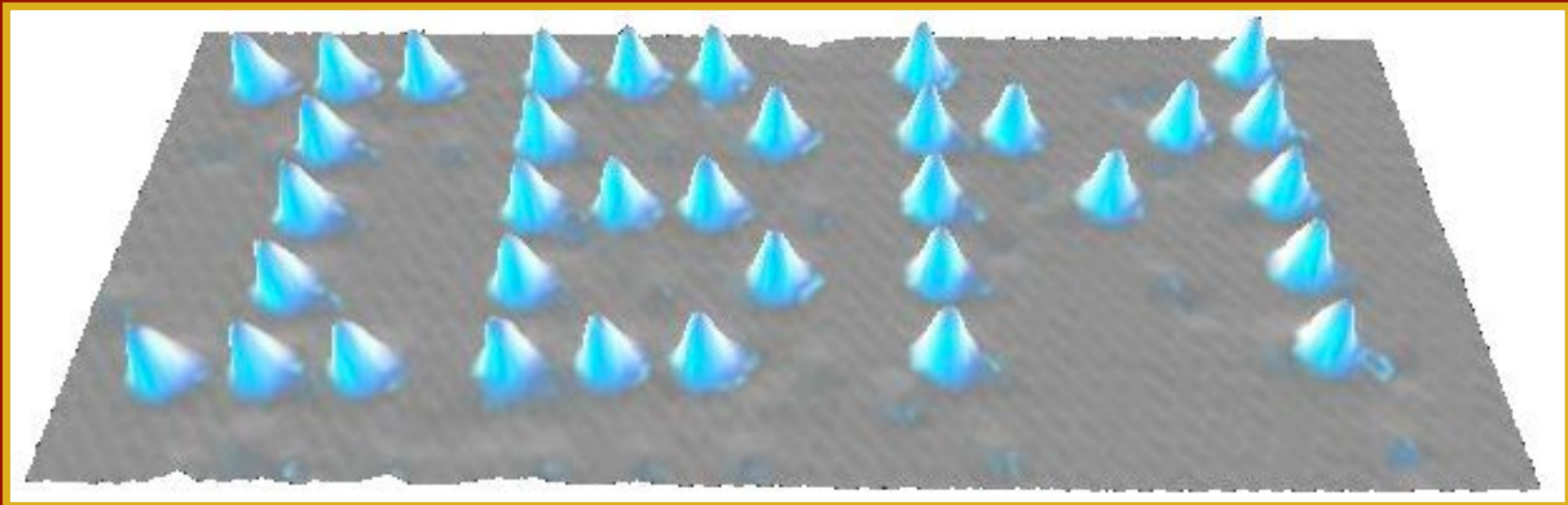
Nanotechnologies

- Atomes de fer sur cuivre

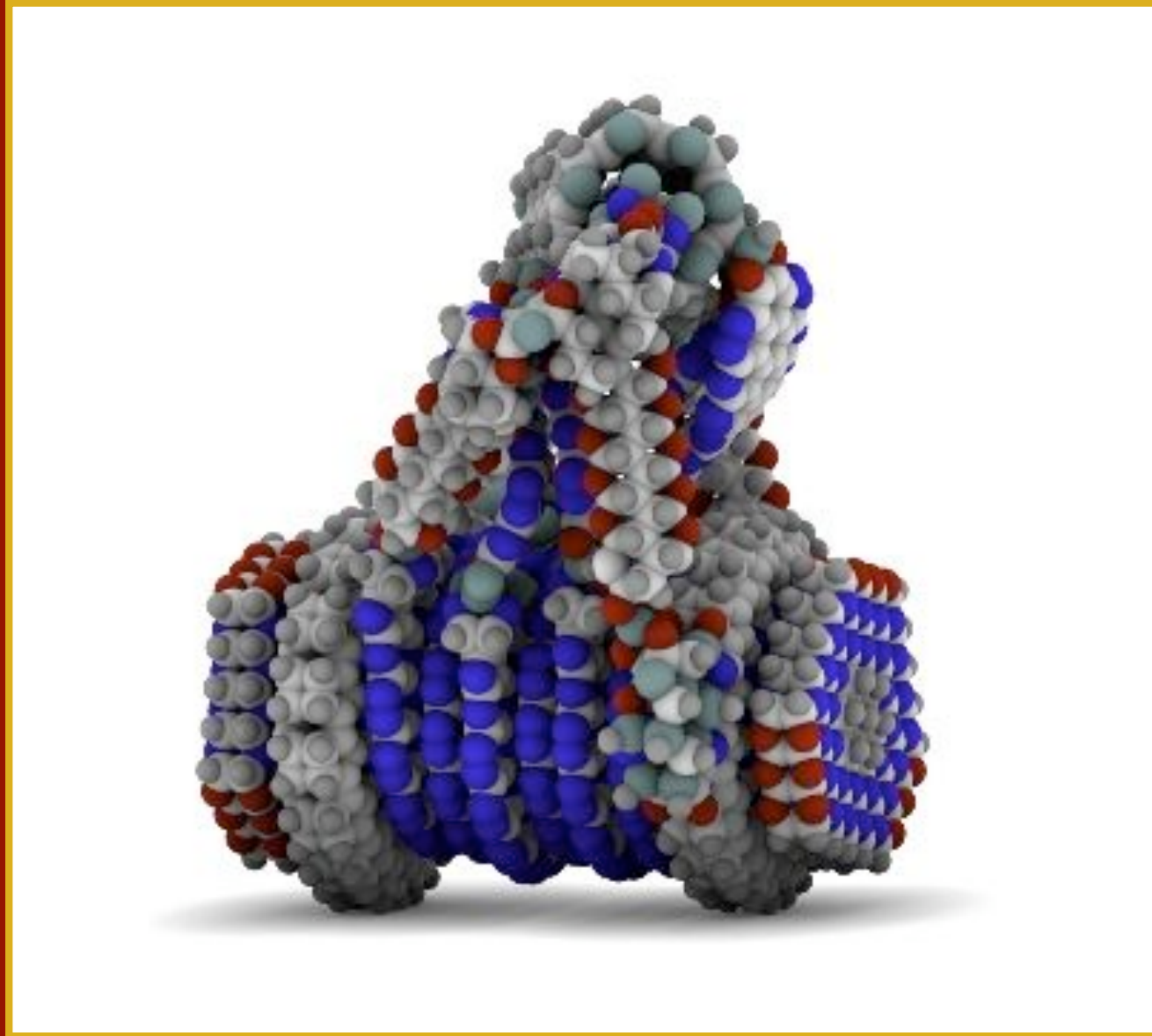


Nanotechnologies

- 35 atomes de Xénon sur Nickel
- Réalisé avec un microscope à effet tunnel, à -270°C .



Nanomachine



Cytométrie de Flux

Cytomètre de flux

- * **Définition : Étude d'une suspension monocellulaire dispersée circulant dans une veine liquide et passant devant un rayon lumineux (source laser le plus souvent) grâce a un système optique étudiant la lumière transmise et la lumière diffractée ou re-émise par un fluorochrome (immunofluorescence)**

- * **Principe : Source lumineuse monochromatique laser**

Chambre d'observation ou circule le flux cellulaire

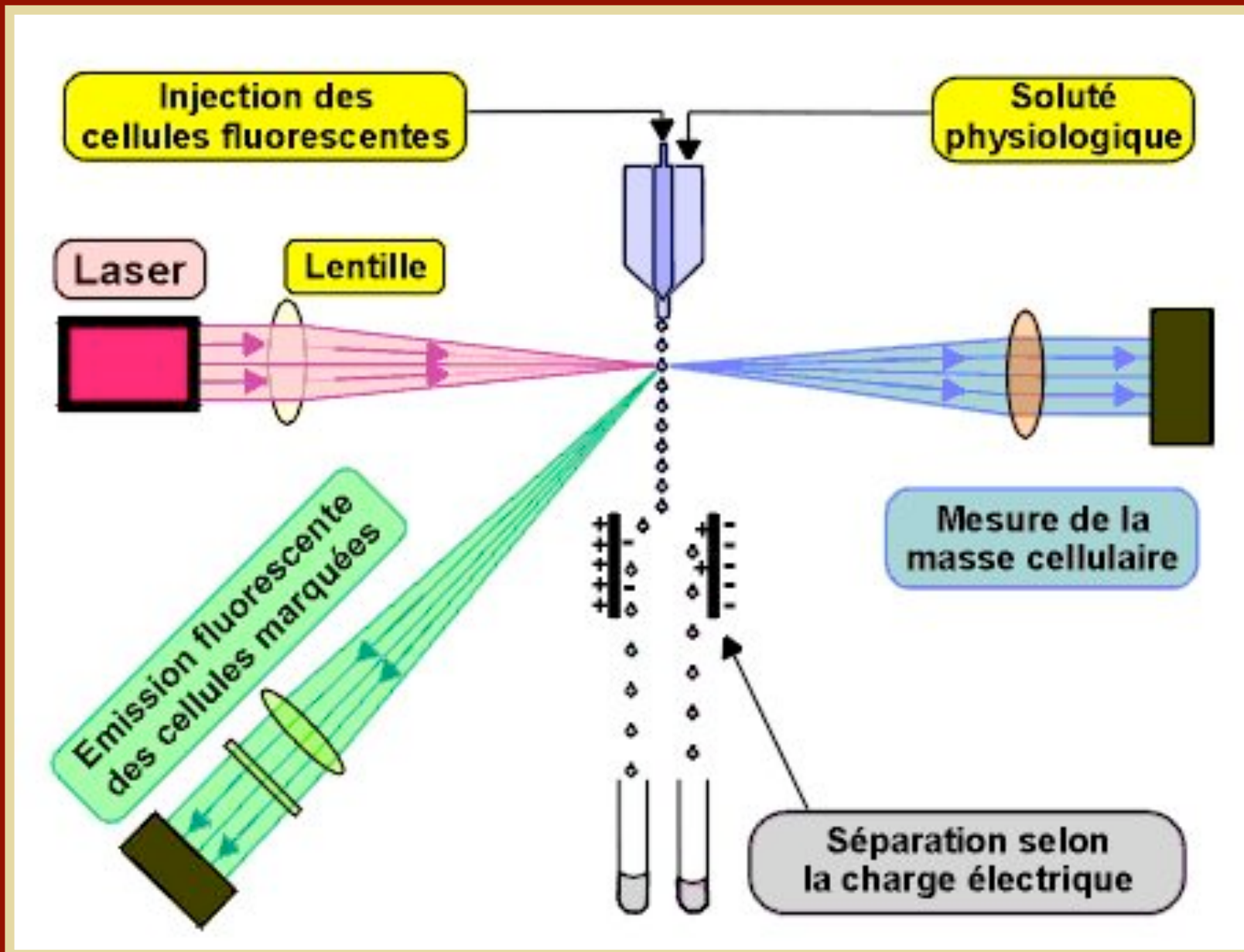
Analyse de la lumière transmise

Analyse de la lumière diffractée ou ré-emise

Stockage informatique des données acquises en fonction du temps

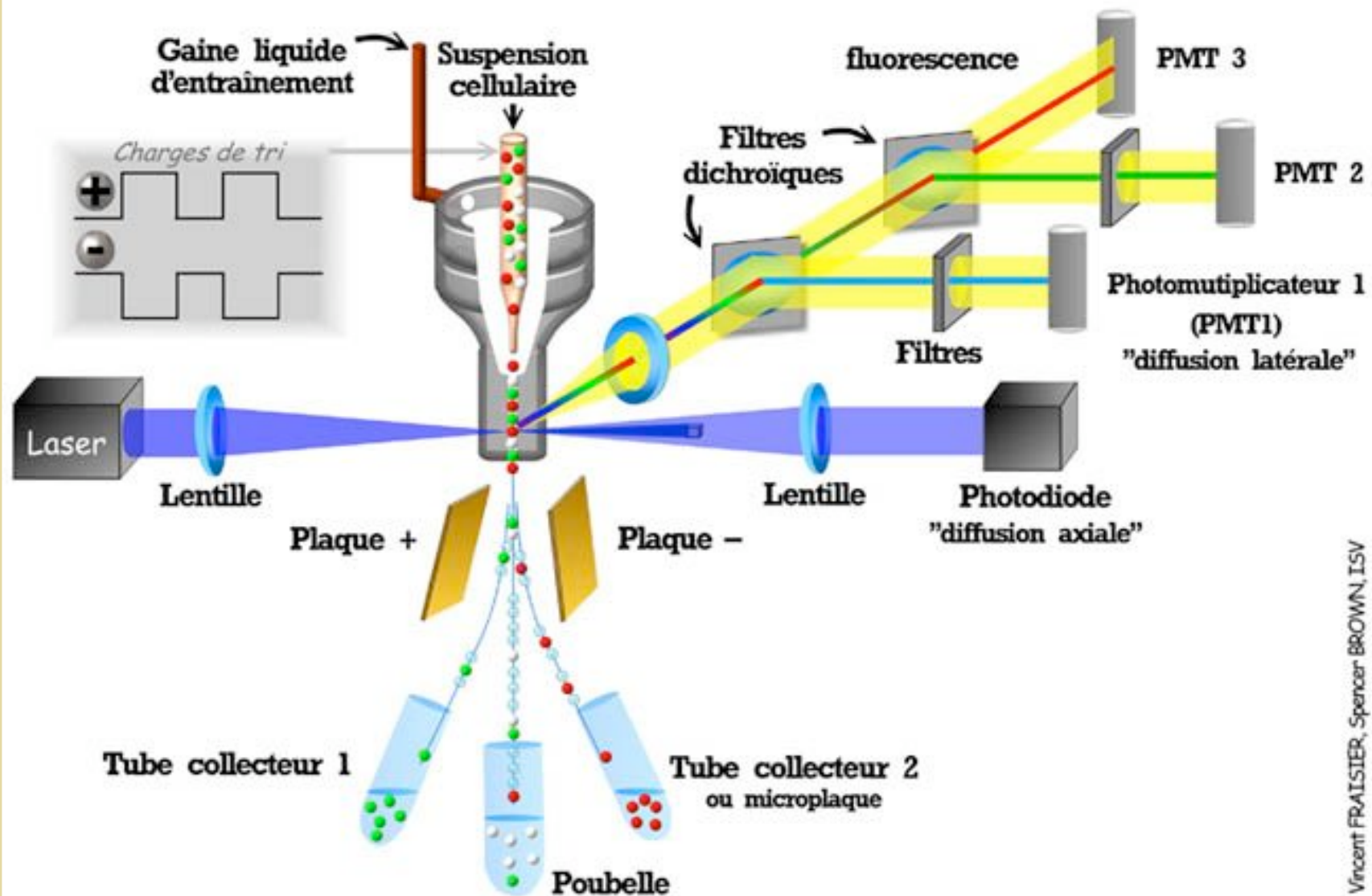
Projection sur un écran selon les paramètres choisis

Cytométrie de Flux

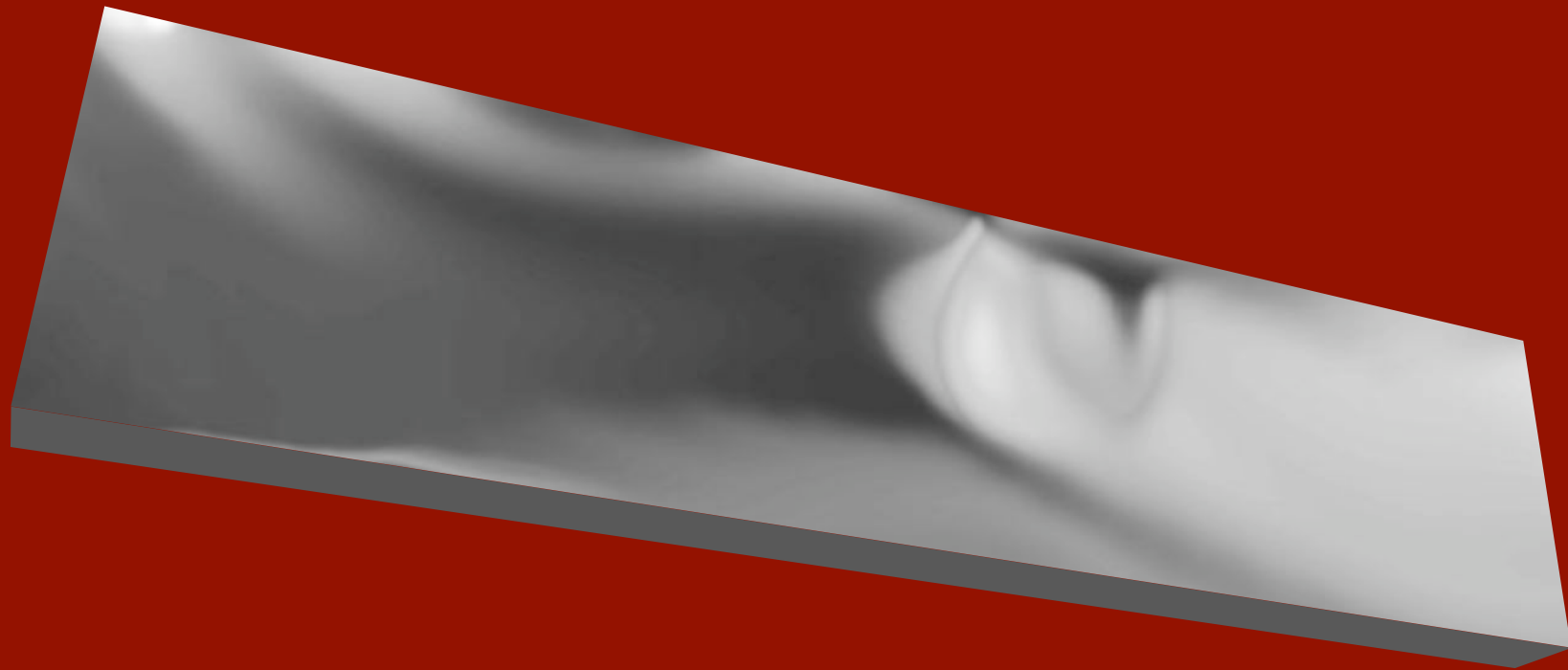


Cytométrie de Flux

Représentation schématique d'un cytomètre de flux



Technique d'Analyse par Microscopie



À Suivre ...