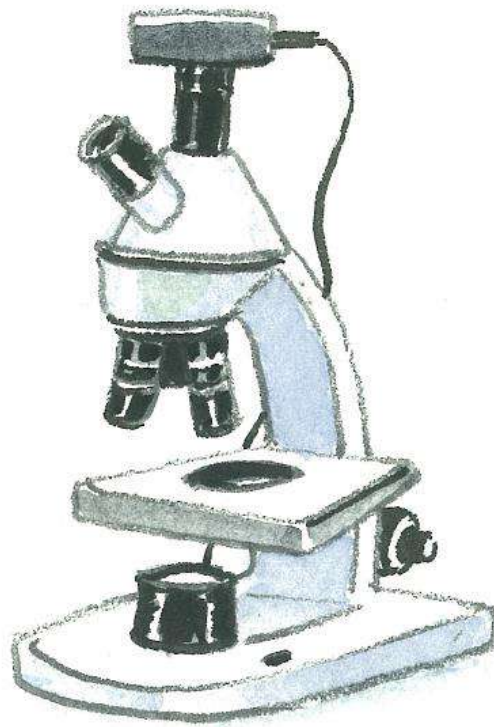




DOSSIER DECOUVERTE

Le Microscope

Observer, grossir, représenter...





SOMMAIRE

<u>Au fil de l'histoire.....</u>	<u>3</u>
<u>Le microscope, du principe à l'utilisation.....</u>	<u>8</u>
<u>Le microscope au service de la science.....</u>	<u>13</u>
<u>Glossaire.....</u>	<u>18</u>



Au fil de l'histoire...

L'Homme a découvert depuis longtemps des accessoires lui permettant d'agrandir ce qu'il regarde. Sous sa forme la plus simple, le microscope que l'on connaît aujourd'hui n'est qu'une simple combinaison de loupes qui met en œuvre le pouvoir grossissant d'une lentille*.

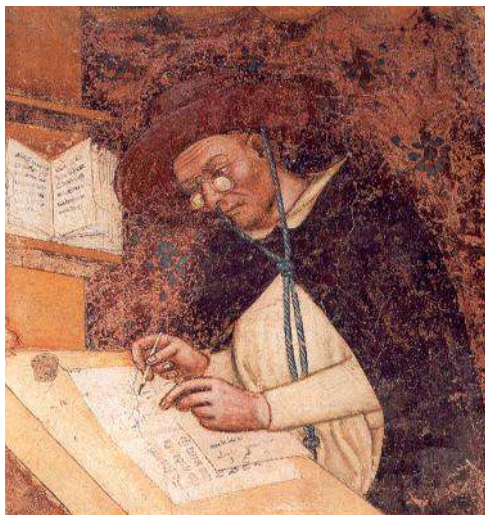
Etape par étape

Avant notre ère : premiers usages des lentilles

La plus ancienne lentille* découverte (-700) est une lentille plan convexe* provenant des ruines de Ninive (actuellement en Irak). Vers -500, Aristophane mentionne les « sphères ardentes » en cristal de roche ou en émeraude. Au I^{er} siècle, Sénèque remarque que les objets deviennent plus gros et plus distincts lorsqu'ils sont vus au travers d'une sphère remplie d'eau, et Pline fait état de l'emploi de lentilles de verre pour la mise à feu. À Rome, les vestales les utilisaient pour raviver le feu sacré et Néron, myope, regardait les combats de gladiateurs à travers une lentille d'émeraude. L'astronome Ptolémée devait également connaître l'existence des verres grossissants.



La plus ancienne lentille découverte
Crédit: Google



Fin du XIII^e siècle : les lunettes

Le moine anglais Bacon fait mention de l'utilisation de lentilles pour la correction des défauts de l'œil : les lunettes sont inventées. Cette invention est attestée par les portraits des cardinaux Nicolas de Rouen et Hughes de Provence, peints en 1352. On savait donc tailler et polir des lentilles.

Peinture de Thomas de Modène portant des lunettes, 1352
Crédit: Google

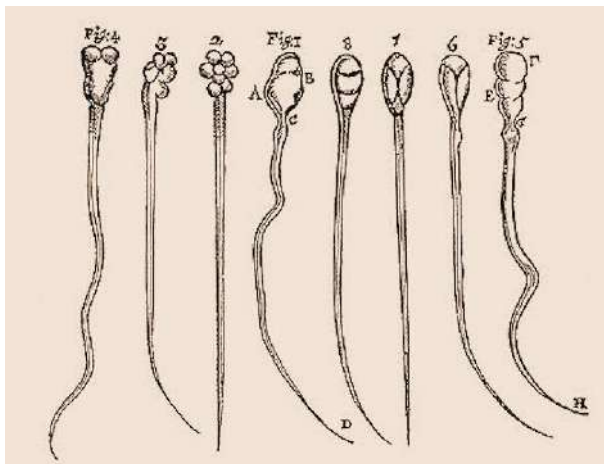


1590 : utiliser plusieurs lentilles

Les microscopes composés (c'est à dire à plusieurs lentilles) les plus anciennement connus datent de 1590. Ils ont été construits par les opticiens lunetiers hollandais Jansen père et fils, qui ont découvert les capacités de l'association de plusieurs lentilles en observant le paysage à travers les vitres (dites aujourd'hui « culs de bouteille ») des fenêtres de leur atelier. Avant l'invention de Jansen, les microscopes existants étaient des microscopes simples composés d'une seule lentille biconvexe, c'est à dire une lentille avec deux faces convexes opposées, de très petite taille. Cette lentille de petite dimension ne recueillait qu'une faible quantité de lumière et l'œil travaillait avec une pupille trop petite : c'est un réel inconvénient. Cependant, l'on continua de préférer les microscopes simples car les microscopes composés présentaient de graves défauts dus aux lentilles mêmes.



*Le microscope composé de Jansen
Crédit: Google*



Dessins de spermatozoïdes de Antoine van Leeuwenhoek - Crédit: Google

1675 : au-delà de l'œil

Le néerlandais Antoine van Leeuwenhoek est connu pour ses améliorations du microscope simple. Ses microscopes sont constitués d'une simple lentille sertie dans une plaque métallique, donc en fait une simple loupe. L'objet est fixé sur une pointe pouvant être déplacée dans son plan en translation et rotation et le long de l'axe optique pour assurer la mise au point. Le plus puissant de ses instruments conservés aujourd'hui a un taux d'agrandissement de 275 fois et un pouvoir de résolution* de $1,4 \mu^*$. Ses microscopes lui permettent d'observer ce qui est invisible à l'œil nu ! Il a publié, dès 1673, de nombreuses observations où il décrit des bactéries, les protozoaires*, les spermatozoïdes, les cellules de l'épiderme ...



1757 : le problème de l'aberration résolu

Il faut attendre 1757 pour qu'un opticien Anglais, John Dollond, découvre comment corriger le défaut d'aberration chromatique* des microscopes composés, c'est à dire la décomposition de la lumière blanche en une multitude de couleurs. Il s'agit de combiner deux lentilles, l'une convexe, l'autre concave, constituées de verres différents. Le microscope achromatique, c'est à dire qui empêche le phénomène de l'aberration chromatique, est né.



*Exemple d'aberration chromatique
Crédit: Google*

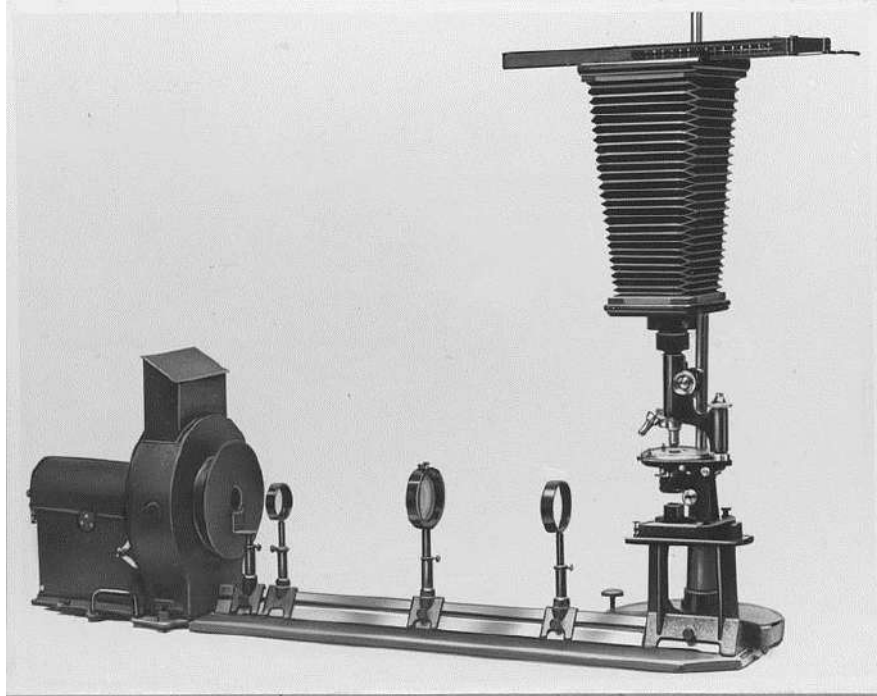
XIXe siècle : des progrès notables

Au XIXe siècle, la microscopie est examinée mathématiquement par les astronomes et les progrès réalisés sont fulgurants. On trouve à remédier à certains défauts, la conception des objectifs est améliorée. On introduit de nouvelles techniques permettant des différenciations dans l'image, tel le microscope polarisant* dû à Talbot en 1834. Pour conserver trace des informations, après leur représentation dessinée au moyen de la chambre claire* dès 1823, les premiers clichés photographiques sont obtenus en 1840. La réalisation la plus marquante se situe dans le domaine de la lumière, à tel point que les différents types de microscopes optiques se distinguent aujourd'hui par leur éclairage. En 1904, Köhler propose le premier microscope travaillant en ultraviolet*. Ceci contribue au développement ultérieur de la microscopie en fluorescence* dès 1908.

Grâce à ces progrès techniques, le XIXe siècle va être un grand moment de découverte microscopique. On découvre la reproduction cellulaire, le rôle du noyau... La bactériologie progresse avec la découverte de l'agent pathogène, d'où le dépistage des maladies et les cultures à la base des vaccins. On peut citer l'œuvre de Pasteur, les découvertes des bacilles de la lèpre par Hansen en 1874, de la



tuberculose par Koch en 1882, de la peste par Yersin en 1894. C'est Laveran, qui isole le parasite du sang humain responsable du paludisme, ce qui lui vaut d'être le premier Français à obtenir le prix Nobel de médecine en 1907.



*Le microscope de Kohler
Crédit: Google*

Seconde moitié du XXe siècle : le microscope électronique

Dans les années cinquante sont apparus les premiers modèles de microscopes électroniques, qui sont à bien distinguer des systèmes optiques. Ces appareils ont révolutionné le monde de l'observation microscopique en permettant, notamment avec le microscope électronique à balayage, de descendre à une observation de l'ordre de l'atome !



*Un des premiers microscopes électroniques
Crédit: Google*



Informations complémentaires :

Documents ressources sur "l'infiniment petit" créés par le CNDP

http://www2.cndp.fr/themadoc/micro/Rep_hist.htm

Histoire et notions d'optique

<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/medecine-oeil-vision-dela-vision-667/page/7/>

Toutes infos sur la microscopie

<http://micromonde.free.fr/>



Le microscope, du principe à l'utilisation...

Dans cette partie, nous nous intéressons au microscope optique qui est le microscope le plus simple et le plus largement répandu.

Le principe du microscope optique de base

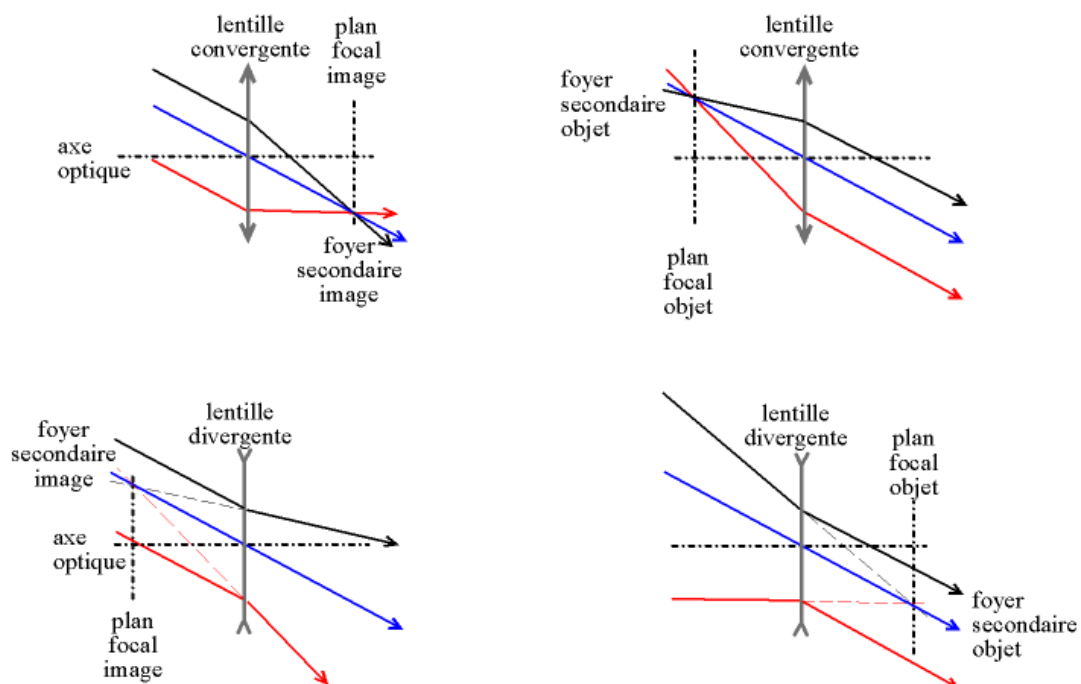
Fonctionnement d'une lentille

Une lentille est fabriquée dans un matériau transparent (verre ou plastique). L'épaisseur au centre est différente de celle des bords. L'une de ses faces n'est donc pas plane. Elle est destinée à faire converger ou diverger la lumière. Selon la forme de ses faces d'entrée et de sortie, une lentille sera convergente ou divergente. Toutes les lentilles symétriques par rapport à un axe appelé axe optique.

La grande famille des microscopes

- optique (encore appelé "photonique", à fond clair, à fond noir, polarisant, à fluorescence, à contraste de phase...)
- électronique (électronique en transmission, électronique à balayage)
- à champ proche ou sonde locale (à effet tunnel, à force atomique, optique en champ proche...).

Une lentille dont le centre est plus épais que les bords est une lentille convergente. Elle transforme un faisceau de lumière parallèle en un faisceau qui converge vers un point situé en aval de la lentille. Au contraire, une lentille divergente transforme un faisceau de lumière parallèle en un faisceau divergent qui semble provenir d'un point situé en amont de la lentille. Ces points de convergence des rayons lumineux sont appelés foyer.



Chemin optique à travers une lentille convergente et une lentille divergente - Crédit: Google

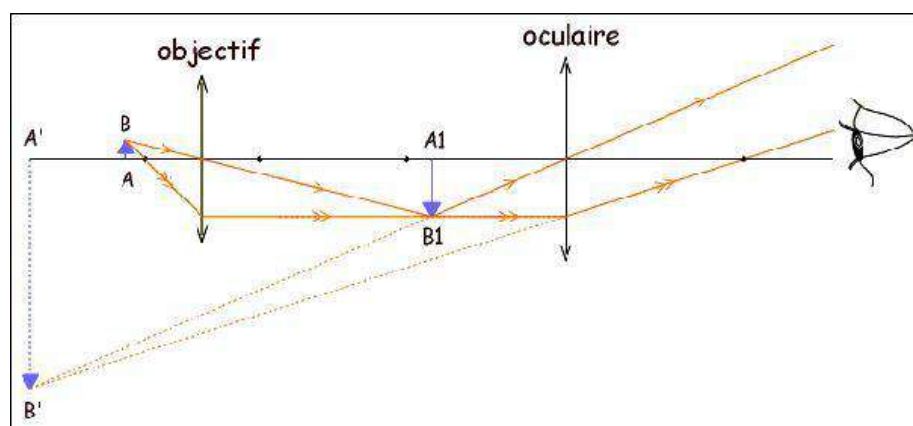


Quelques propriétés des lentilles

- O étant le centre optique de la lentille, tout rayon lumineux passant par O ne subit pas de déviation.
- Tout rayon parallèle à l'axe optique sort de la lentille en passant par le foyer* principal image.
- Tout rayon passant par (ou dirigé vers) le foyer* principal objet sort de la lentille parallèle à l'axe optique.

Grossir à l'aide de plusieurs lentilles : le principe du microscope optique

Un microscope est constitué d'un objectif et d'un oculaire, que l'on peut assimiler à 2 lentilles convergentes, l'oculaire ayant une distance focale* plus grande que l'objectif.



Chemin optique dans un microscope
Crédit: Google

L'objet AB à observer est placé devant la première lentille appelée objectif. Si l'objet est au-delà de la distance focale, cela forme une image réelle A1B1 renversée et de taille différente ; l'image A1B1 est plus grande que l'objet AB si celui-ci est situé à une distance inférieure au double de la distance focale de l'objectif.

La deuxième lentille est l'oculaire : elle est positionnée de sorte que l'image A1B1 soit dans son plan focal*, entre le foyer F2 et O2. Ainsi, l'œil observe une image « à l'infini », ce qui représente un meilleur confort visuel.

Préparer, observer, sauvegarder

Les différents types de préparation

Il existe différents milieux d'observation, c'est à dire le milieu dans lesquels on monte la coupe pour une observation. Le plus répandu est l'eau, mais d'autres produits comme l'ammoniaque ou la potasse sont aussi utilisés pour leurs propriétés de réhydratation ou au contraire de dissociation.

Le microscope optique permet d'observer des choses très variées : du naturel ou de l'artefact (créées par les êtres vivants, donc non naturels), du naturel inerte comme les minéraux ou du biologiquement mort. Dans ce cas, les cellules des végétaux ou des animaux sont "fixées" avec des mélanges qui tuent les cellules mais en stabilisant leurs structures afin qu'elles conservent l'aspect qu'elles présentaient à l'état vivant.



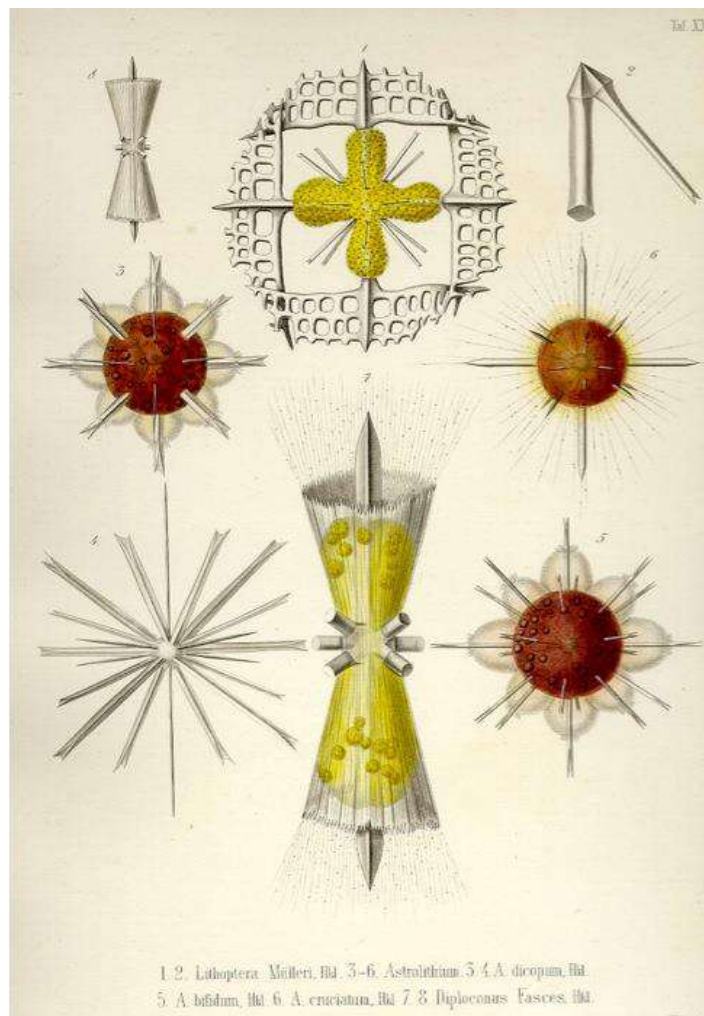
Mais il est également possible d'observer du vivant car les rayons lumineux du microscope optique chauffent la préparation légèrement mais sans être destructeurs; on peut donc observer de petits êtres vivants entiers (bactéries, unicellulaires) ou des fragments vivants de plus grands organismes (végétaux ou animaux).

La plupart des objets biologiques ne sont pas colorés ou sont faiblement colorés. D'où la nécessité de colorer la plupart des échantillons. Par exemple, on utilise de bleu de méthylène pour colorer le noyau des cellules. Bien que la plupart des colorants soient utilisés pour des observations de cellules mortes, il existe des colorants dits "vitaux" qui permettent de mettre en évidence une structure cellulaire sans provoquer la mort de la cellule.

Représenter ce que l'on observe

Dans toute démarche scientifique, la sauvegarde de l'information pour l'analyser ensuite et la partager est essentielle. En microscopie, il est nécessaire de trouver des modes de représentation de ce que l'on observe.

Par le passé, le dessin était la seule façon de sauvegarder l'observation. Les planches de Haeckel notamment illustrent le plancton récolté au cours du XIXe siècle. Aujourd'hui, la plupart des microscopes sont équipés d'appareils photo ou de webcams qui permettent d'enregistrer en continu les observations réalisées. (Cf dossier objet "appareil photo")



Représentations de plancton par Haeckel
Crédit: Google



A propos des limites et sources d'erreur de l'instrument

La résolution maximale

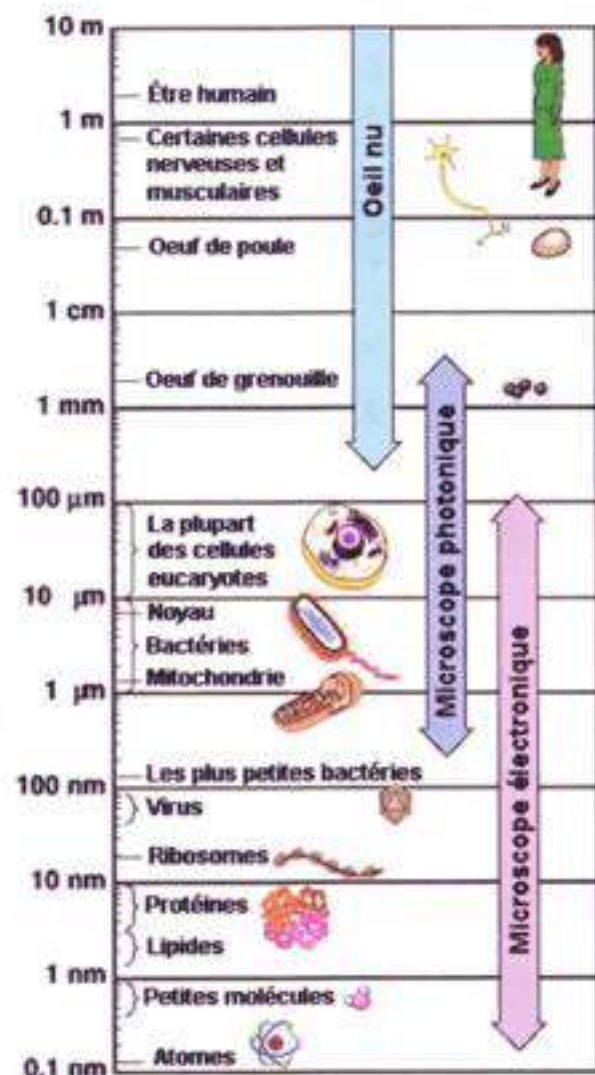
La résolution* d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très voisins. Elle est limitée par la diffraction* de la lumière chez un microscope optique. En effet, du fait de la diffraction, l'image d'un point n'est pas un point, mais une tache. Ainsi, deux points distincts mais voisins auront pour images deux taches dont le recouvrement peut empêcher de distinguer les deux points images : les détails ne sont alors plus résolus. Tout type de microscope a une résolution limite. Celle des microscopes optiques est de 0,2 micromètre. Ceci signifie qu'une image produite par un microscope optique permet de différencier distinctement 2 points séparés de 0,2 micromètre au moins. Des techniques permettent de s'approcher de cette limite : l'utilisation d'un objectif à immersion (dans l'huile), ou en diminuant la longueur d'onde de la lumière (toutefois limitée au visible). Ce que l'on appelle pouvoir séparateur du microscope est l'inverse de la limite de résolution, car plus la limite de résolution est petite plus le pouvoir séparateur de l'appareil est grand.

Le grossissement maximal

Tout type microscope est également caractérisé par un grossissement maximal. Le microscope optique ne peut pas grossir au-delà de 2000 fois, tandis que d'autres microscopes, plus complexes, comme le microscope électronique peuvent grossir jusqu'à 2 millions de fois !!

Le microscope dans nos vies :

Le fonctionnement du microscope repose sur l'utilisation de lentilles optiques que nous rencontrons quotidiennement : elles sont sur notre nez si l'on porte des lunettes ou directement sur notre cornée si l'on porte des lentilles de contact. Les lentilles optiques sont également présentes sur notre porte d'entrée, via l'oeilleton de porte, ou dans nos appareils photo.



Représentation des échelles de grossissement en fonction du microscope Crédit: Google



Informations complémentaires :

Notions d'optique géométrique

http://media4.obspm.fr/public/AMC/pages_optique-geometrique/og-introduction.html

Fonctionnement et limites du microscope optique

<http://www.stem.lps.u-psud.fr/book/export/html/197>

Description du microscope et mode d'emploi

<http://www.microscopies.com/DOSSIERS/MICROSCOPE/LE%20MICROSCOPE.htm>

Les planches de Haeckel

<http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/haeckel/radiolarien/>

Séminaire sur les images en biologie à différentes échelles

<http://accres.ens-lyon.fr/accres/formation/formations/formavie/formavie-2010/>

Notions et exercices sur les échelles, les grossissements et les agrandissements

<http://www.snv.jussieu.fr/vie/documents/echelles/echelles.htm>

Les différents types de produit chimique utilisés en microscopie

<http://www2.ac-lille.fr/myconord/micro/produits03.htm>

La représentation historique et moderne du plancton

<http://www.planktonchronicles.org/fr>

Quelques conseils pour adapter une webcam sur un microscope

<http://www.microbehunter.com/connecting-a-camera-to-a-microscope/>



Le microscope au service de la Science

La microscopie couvre de vastes champs d'applications. Depuis la botanique à l'étude des gènes humains, en passant par la physique des matériaux et la géologie, différents microscopes et différentes techniques sont mis en œuvre depuis plusieurs décennies.

L'utilisation de la microscopie en biologie marine, quant à elle, est relativement récente... En effet, le microscope optique permettant d'observer avec précision dans le vivant tout ce qui est à l'échelle de la cellule, il est possible d'observer des organismes unicellulaires ou constitués d'un petit nombre de cellules, très généralement aquatiques abondant en particulier dans le plancton (algues, protistes...).

Ne pas confondre : le microscope et la loupe binoculaire:

La loupe binoculaire, aussi appelée "stéréomicroscope", est un type particulier de microscope. Elle fournit une image 3D de faible grossissement grâce à deux objectifs qui permettent à chaque œil de recevoir une image différente de l'objet.

L'adjectif "binoculaire" signifie simplement qu'il y a deux oculaires. On peut rencontrer des microscopes binoculaires avec un seul objectif qui ne sont donc pas

Le microscope et TARA

Au cœur de l'action

Juillet 2013 : Tara est en Arctique, sur la côte Sibérienne, entre Mourmansk et Doudinka. Comme pour l'expédition précédente, cette nouvelle mission en Arctique a pour objectif de réaliser un inventaire du plancton présent. Les yeux rivés sur le microscope, Joannie Ferland, biologiste au Québec, regarde les copépodes prélevés dans la journée.



Crédit : A.Deniaud

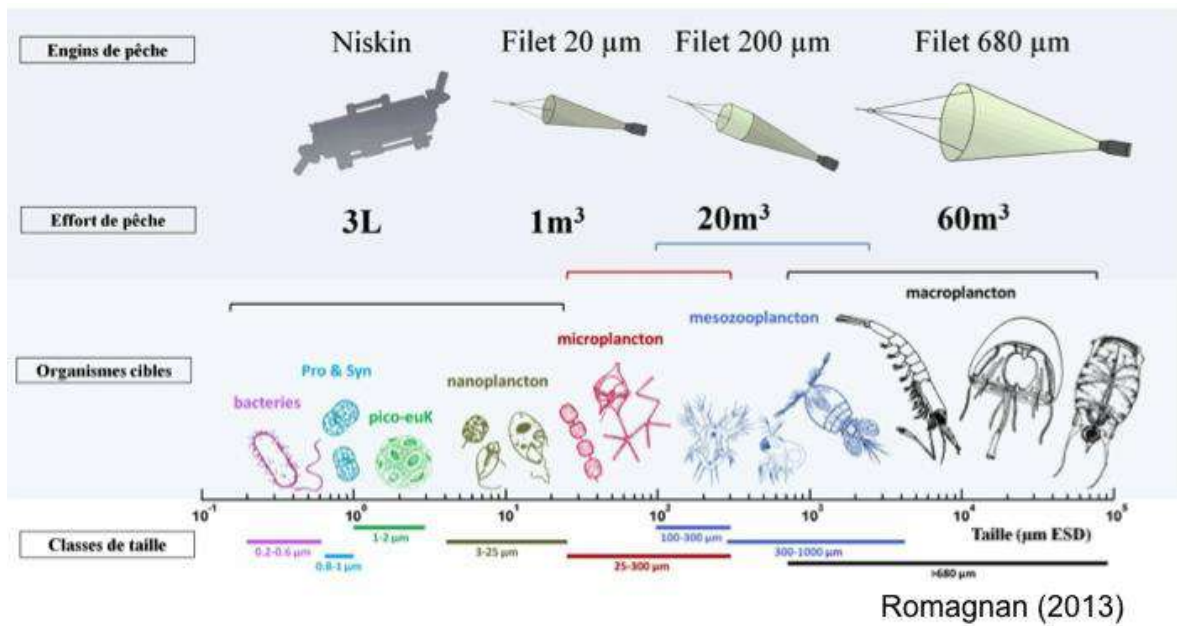
L'étude du plancton et la mission Tara Océans

Le plancton est omniprésent dans les océans, des mers polaires à l'équateur, des profondeurs jusqu'en surface, des zones côtières aux centres des régions océaniques. Bien qu'invisible à l'œil nu ou presque, l'impact du plancton sur les cycles géochimiques globaux et le climat est extrêmement important. Il représente en effet un des maillons essentiels de la chaîne alimentaire, le phytoplancton absorbe la moitié de notre production en CO₂ et dégage 50 % de l'oxygène de la planète. Malgré cela, son extraordinaire biodiversité reste encore à découvrir...

En septembre 2009, la goélette Tara a entamé une expédition scientifique de deux ans et demi appelée Tara Océans dans le but d'explorer la diversité du plancton. Durant son périple autour du globe, plus de 130 stations de prélèvements ont été effectuées pour échantillonner le plancton et étudier les récifs coralliens. L'inventaire effectué est

considérable : 27000 échantillons ont été collectés pour tenter de comprendre le fonctionnement et la diversité de la vie marine mais également, prévoir la réponse des écosystèmes marins aux changements climatiques.

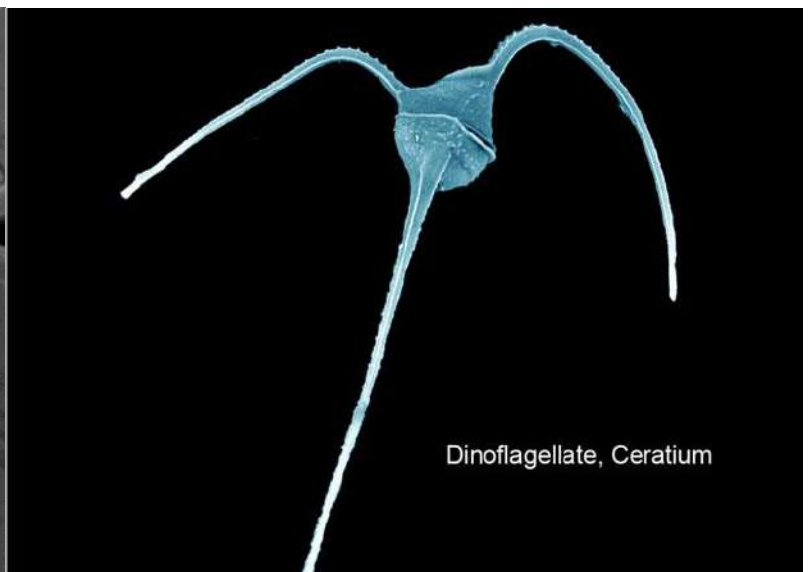
L'étude du plancton, avec des dimensions allant de quelques micromètres à un centimètre, place la microscopie au cœur des recherches menées dans le cadre de TARA Océans.



Echelles des tailles de plancton
Crédit : Romagnan, 2013



Coccolithophoridés
Crédit: Google



Le ceratium
Crédit : A. McKeon



Le microscope à bord de Tara, dans le laboratoire sec

La plateforme d'imagerie de Tara est baptisée T.A.O.M.I. (Tara Oceans Marine biology Imaging platform). Elle est dédiée à la biologie marine et l'observation des organismes du plancton. Elle permet de faire trois grands types d'analyse :

- l'analyse de flux, qui mesure de façon continue les variations des propriétés de l'eau de surface et de son plancton, et prend des photos sous-marines des échantillons collectés sur leur lieu de vie.
- la macrophotographie
- la microscopie.

Sur Tara, trois types de microscope sont utilisés : le stéréomicroscope ou loupe binoculaire, le microscope à fluorescence et le microscope de fluorescence à feuille de lumière. Ces différents microscopes permettent d'observer le plancton à différentes résolutions avec des marquages spécifiques et d'effectuer des reconstructions tridimensionnelles de certains organismes. Plus précisément,

le stéréomicroscope est utilisé pour observer, trier, disséquer et préparer le plancton à faible grossissement. Le microscope à fluorescence permet d'obtenir une image de haute définition et de réaliser la vidéomicrographie. Enfin, le microscope de fluorescence à feuille de lumière, prototype du laboratoire de Microscopie Optique du laboratoire Européen de Biologie Moléculaire, est utilisé pour l'image tridimensionnelle.

Afin d'accueillir la plateforme d'imagerie qui permet entre autre de faire de la microscopie, Tara a dû être modifiée. Une des cabines a été entièrement vidée et transformée. Des paillasses y ont été montées pour supporter les différents appareils et permettre la préparation des échantillons. En outre, le carré avant a été aussi modifié pour accueillir la deuxième salle de microscopie. On y a notamment installé un poste d'observation qui peut accueillir les deux stéréomicroscopes.



*Installation de microscope dans le petit carré
Crédit : Patrick Theers*



*Le laboratoire sec
Crédit : Y.Chavance*

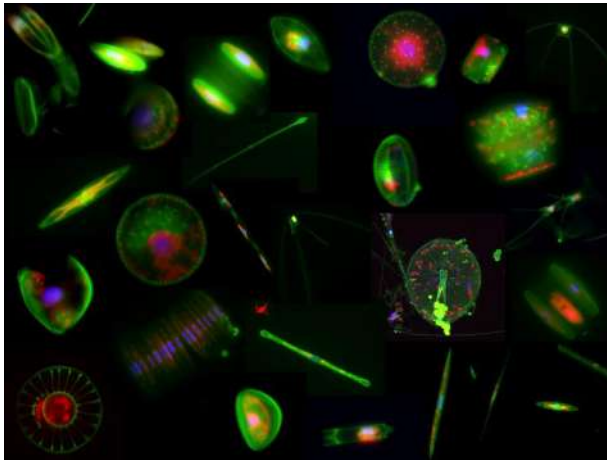
*Céline Dimier au microscope
Crédit : A.Deniaud*

Le microscope à terre, dans les laboratoires de recherche

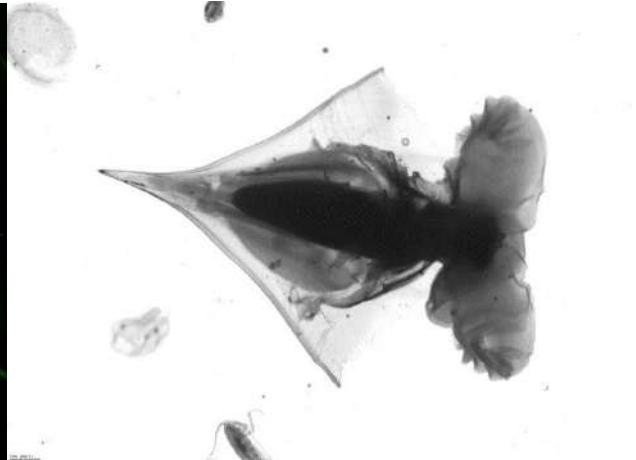
La plateforme d'imagerie ne se limite pas au laboratoire sec qui est à bord de Tara car de nombreuses observations à bord sont tout simplement impossibles à réaliser, certains types de microscopie nécessitant une meilleure stabilité optique, une forte consommation électrique ou des préparations d'échantillons trop complexes ou toxiques. TAOMI sur terre se partage entre la maison-mère à l'University College Dublin à Dublin (Irlande) et les stations de biologie marine d'Allemagne, de France et d'Italie. A terre, TAOMI permet aussi bien la microscopie confocale à haut débit que la microtomographie aux rayons X qui sont deux techniques d'obtention d'une image en trois dimensions.



*Chris Bowler dans son laboratoire à Paris
Crédit : P.Bourgain*



Coloration de diatomées pour observation au microscope - Crédit : C.Bowler



*Zooplankton vu au zooscan
Crédit : Observatoire de Villefranche,
L.Stemman*

Exemple de résultats

Les images obtenues via le microscope révèlent un monde planctonique d'une grande beauté. Mais au-delà du plaisir des yeux, ces images sont surtout précieuses pour visualiser les nouvelles espèces et leurs structures internes. Si les premiers résultats se confirment, plus de 85 % des séquences d'ADN dans les échantillons de protistes* sont inconnues. Pour les identifier, de nombreux experts seront nécessaires.

Ces nouveaux noms et ces belles images seront confrontés aux séquences génétiques, qu'attendent avec impatience les chercheurs. C'est une véritable approche intégrée pour laquelle différentes disciplines scientifiques, imagerie, biologie, taxonomie... doivent travailler ensemble dans le but de mieux comprendre le milieu planctonique. Les résultats préliminaires des efforts conjoints des scientifiques suggèrent qu'il existerait plus d'un million d'espèces de protistes*, alors que les estimations, avant Tara Oceans, tournaient autour de 100 000.

Informations complémentaires

Plus de détails sur la plateforme d'imagerie de Tara

<http://oceans.taraexpeditions.org/m/science/les-actualites/imagerie-pendant-le-expedition-tara-oceans/>

Découvrir le plancton, et comparaison avec les dessins de Haeckel :

<http://www.planktonchronicles.org/fr>

<http://www.plancton-du-monde.org/module-formation/index.html>

Premiers bilans de l'expédition TARA Océans

<http://oceans.taraexpeditions.org/m/science/les-resultats/>



Glossaire

Aberration chromatique : une aberration correspond à un écart entre l'objet et son image. Dans le cas d'une aberration chromatique, la lumière blanche est décomposée par la lentille sur ses bords et apparaît donc comme une multitude de couleurs.

Chambre claire : dispositif optique utilisé comme aide au dessin par les artistes et breveté en 1806. La chambre claire effectue une superposition optique du sujet à dessiner et de la surface où doit être reporté le dessin. L'artiste utilise cette superposition pour placer des points clés du sujet à reproduire, ou même ses grandes lignes.

Convexe/concave : une forme concave est une forme creuse (l'intérieur d'un bol par exemple) tandis qu'une forme convexe est une forme bombée (un bol à l'envers par exemple)

Diaphragme : dispositif mécanique mince et opaque comportant une ouverture centrale généralement réglable. Il permet de régler la quantité de lumière qui arrive sur le capteur.

Diffraction : phénomène par lequel une onde issue d'une source ponctuelle est déviée de sa trajectoire rectiligne lorsqu'elle rase les bords d'un obstacle opaque. Ce phénomène se produit pour le son, la lumière, les vagues....

Distance focale : la distance focale f , caractéristique d'une lentille, est la distance entre le foyer et le centre de la lentille.

Fluorescence : émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule. La fluorescence permet d'observer les UV qui sont réémis sous forme de lumière visible.

Foyer : deux rayons lumineux parallèles à l'axe optique avant la traversée de la lentille se coupent en un point appelé foyer.

Lentille optique : les lentilles sont fabriquées dans un matériau transparent (verre ou plastique). L'épaisseur au centre est différente de celle des bords. Elles ont des formes très diverses et sont destinées à faire converger ou diverger la lumière.

Plan focal : plan perpendiculaire à l'axe optique et passant par le foyer de la lentille.

Polarisation : propriété de la lumière liée à son orientation dans un plan.

Pouvoir de résolution : terme qui désigne la capacité à séparer des détails très voisins.

Protiste : être vivant constitué d'une seule cellule à noyau, dit "unicellulaire".

Protozoaire : une sorte de protiste, un animal unicellulaire.

UV (ultraviolet) : également appelé lumière noire parce qu'il n'est pas visible à l'œil nu, la lumière en ultraviolet ou UV est caractérisée par une longueur d'onde plus courte que celle de la lumière visible. La lumière UV ne peut être observée qu'indirectement, soit par fluorescence, soit à l'aide de détecteurs spécialisés.

μ Micron : unité de longueur, le micromètre ou micron de symbole μ est 1000 fois plus petit que le millimètre ($=10^{-6}$ m).

