

Annexe - Observation en réflexion totale interne

Un système optique permet de varier l'angle d'incidence entre le laser d'excitation et le support en verre. Pour une valeur d'angle d'incidence supérieure à l'angle critique $\theta_c = \arcsin(n_{\text{verre}}/n_{\text{eau}})$, le faisceau est totalement réfléchi dans le verre et il y a création d'un champ évanescent dans le milieu de faible indice de réfraction (l'eau), qui décroît exponentiellement en s'éloignant de l'interface. La profondeur de pénétration du champ dépend de la longueur d'onde, de l'angle du laser et de l'angle θ_c . Elle est généralement voisine de 100-300 nm, ce qui permet de restreindre l'excitation aux molécules proches de la surface, et donc essentiellement aux molécules immobilisées.

Deux configurations permettent d'obtenir la réflexion totale interne sur un microscope classique : le TIRF « au travers de l'objectif » et le TIRF « au travers d'un prisme », et ses variantes. Le TIRF « au travers de l'objectif » est proposé en version commerciale par la plupart des fabricants de microscopes. Cette configuration nécessite un objectif à très grande ouverture numérique ($ON > 1,4$), permettant d'atteindre l'angle critique en décalant le laser d'illumination par rapport à l'axe optique (voir figure, C et D). Le TIRF « au travers d'un prisme » nécessite un montage optique plus complexe, mais il offre l'avantage d'un meilleur contrôle de la position et de la taille du champ évanescent et permet une amélioration du rapport signal sur bruit de fond (notamment grâce au découplage entre le faisceau d'excitation et l'optique de détection, ainsi qu'à l'utilisation d'un prisme et d'une lame en quartz) (figure A et B).

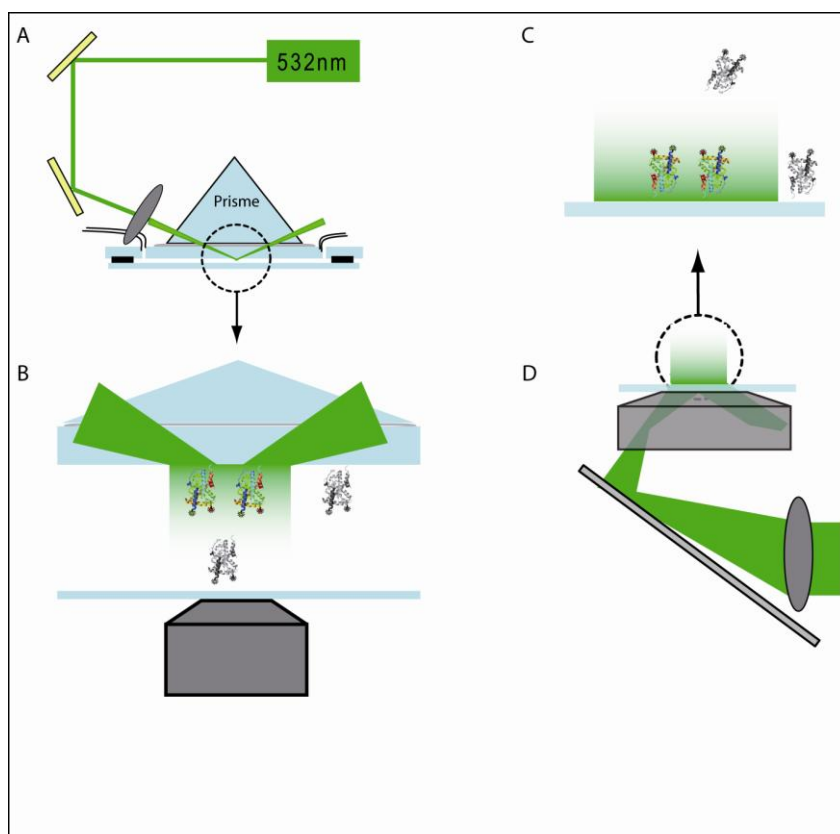


Figure - Montages expérimentaux de microscopes à réflexion totale interne.

A et B : TIRF au travers d'un prisme : la lumière provenant du laser est focalisée par une lentille et traverse un prisme en quartz. Celui-ci est posé sur une lame de microscope en quartz et une fine couche de glycérol permet d'éviter les réflexions parasites. La réflexion totale se produit à l'interface lame/eau (B). La lame et la lamelle de verre sont séparées par une couche de scotch double face (100 μm), qui permet de créer un canal dans lequel le tampon et les réactifs peuvent être injectés. La détection se fait au travers de la lamelle de verre. C et D : TIRF au travers de l'objectif : la lumière provenant du laser est focalisée sur le plan focal image de l'objectif et est réfléchi par un miroir dichroïque (D). En désaxant cette lentille par rapport à l'axe optique, le faisceau émerge de l'objectif avec un angle croissant, jusqu'à atteindre l'angle critique et donc la réflexion totale à l'interface lamelle/eau (C). La détection se fait au travers du même objectif, après avoir traversé le miroir dichroïque.