Classification
Physics abstracts
 8.40 — 22.10

DISPOSITIF DE MESURES OPTIQUES ADAPTÉ A L'ÉTUDE DU MOUVEMENT DE MICRO-ORGANISMES VIVANTS

P. BERGE et M. DUBOIS

Service de Physique du Solide et de Résonance Magnétique
 Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay
 BP n° 2, 91-Gif-sur-Yvette

(Reçu le 17 octobre 1972)

Résumé. — Nous décrivons un dispositif de spectroscopie optique par battements de photons hétérodynes spécialement conçu pour l'étude du mouvement de micro-organismes vivants. Nous donnons à titre d'exemples des résultats expérimentaux se rapportant à la mesure d'un nombre total d'objets en suspension, au pourcentage d'objets mobiles et aux spectres de la lumière diffusée et transmise.

Abstract. — We describe an optical heterodyne spectrometer specially constructed for the study of the movement of living micro-organisms. This apparatus is particularly well adapted for a rapid measurement of the percentage of auto-mobile elements in a biological medium and for an objective study of the dynamics of the movements of these elements. A number of experimental results illustrate clearly the possibilities of the apparatus.

1. Introduction. — L'intérêt grandissant des études du mouvement d'organismes vivants nous a conduits à élaborer un montage de diffusion de la lumière spécialement adapté à des problèmes biologiques. Si on envoie de la lumière sur une suspension d'objets dans un solvant, une partie de cette lumière est absorbée par ces objets et rediffusée dans tout l'espace. La répartition spatiale de l'intensité diffusée peut être reliée à la forme et aux dimensions des organismes diffusants. L'intensité diffusée à un angle donné et l'absorption sont proportionnelles au nombre total d'objets en suspension.

Si ces objets sont en mouvement, les fréquences lumineuses diffusées diffèrent de celle de la lumière incidente. Les caractéristiques de leur spectre dépendent de l'angle de diffusion et du type de mouvement. Par exemple, dans le cas d'un mouvement de translation à la vitesse v , l'effet Doppler donne une variation de fréquence $\Delta\nu$ par rapport à celle de la lumière excitatrice ν_0

$$\Delta\nu = \frac{2v}{c} \nu_0 \cos \alpha \sin \frac{\theta}{2},$$

où α est l'angle entre la direction de la vitesse et celle de la perpendiculaire à la bissectrice de l'angle de diffusion θ ; c est la vitesse de la lumière.

Le spectre peut être détecté, soit par la méthode

homodyne, soit par la méthode hétérodyne. Mais la complexité du mouvement des organismes vivants conduit impérieusement à employer cette dernière méthode. A partir du spectre ainsi obtenu on peut, théoriquement, remonter à la dynamique des objets en mouvement. Par ailleurs, leur nombre peut être déduit de la surface du spectre.

Le principe de l'application de la méthode résumée ci-dessus à l'étude des micro-organismes vivants a été initialement proposé en référence [1] et des applications particulières en ont été décrites en références [2], [3], [4], [5]. Des applications plus générales de la méthode spectroscopique des battements de photons sont présentées en références [6] et [7].

2. Brefs rappels. — 2.1 MÉTHODE SPECTROSCOPIQUE DES BATTEMENTS DE PHOTONS. — La méthode de détection homodyne consiste à envoyer la lumière diffusée sur un photomultiplicateur et à analyser les fluctuations du photocourant produites par les battements de toutes les fréquences lumineuses entre elles. Le spectre des fluctuations du photocourant est alors le produit de composition du spectre lumineux par lui-même. La méthode hétérodyne consiste à ajouter à la lumière diffusée une grande quantité de lumière incidente (oscillateur local). Le spectre des fluctuations du photocourant correspond alors directement au spectre optique, translaté autour de la fréquence nulle.

2.2 AIRE DE COHÉRENCE. INTENSITÉ DU SPECTRE DE BATTEMENTS. — On peut montrer théoriquement et constater expérimentalement que la lumière diffusée par le volume éclairé n'est corrélée spatialement que dans un petit angle solide. Sur la surface du récepteur, cet angle solide correspond à une surface A_{coh} appelée aire de cohérence qui est identique à la figure de diffraction du volume diffusant. Les fluctuations d'intensité dans une aire de cohérence sont parfaitement corrélées entre elles, mais entre aires de cohérence différentes, elles sont totalement aléatoires. Comme l'intensité du photocourant i_d est rapportée à la surface utile A_{PM} du photomultiplicateur et que généralement $A_{PM} \gg A_{coh}$, le carré moyen des fluctuations de l'intensité diffusée (ou intégrale s du spectre homodyne) est égal à :

$$\langle \delta i^2 \rangle_{\text{auto}} \equiv s = i_d^2 \frac{A_{coh}}{A_{PM}}. \quad (1)$$

Dans le cas de la détection hétérodyne, le carré moyen des fluctuations du photocourant (ou surface S du spectre correspondant) devient :

$$\langle \delta i^2 \rangle_{\text{hétéro}} \equiv S = 2 i_d I_1 \frac{A_{coh}}{A_{PM}} \times K \quad (2)$$

où I_1 est l'intensité de l'oscillateur local et K le facteur d'hétérodynage, c'est-à-dire l'efficacité de battement entre I_1 et i_d . En effet, si les plans d'onde de la lumière diffusée par la cellule et ceux de l'oscillateur local ne sont pas exactement confondus, les interférences dynamiques (ou battements) n'auront pas le contraste maximum et K sera inférieur à 1.

3. Dispositif expérimental. — **3.1 MONTAGE OPTIQUE** (Fig. 1). — Le faisceau émis par un laser hélium-néon de puissance 6 mW est divisé en deux parties d'intensité pratiquement égale par une lame séparatrice L_1 . La partie ayant traversé la lame sert de faisceau excitateur pour la cellule contenant la suspension à étudier. La polarisation du faisceau pénétrant dans la cellule est fixée perpendiculairement au

plan de l'angle de diffusion θ à l'aide du polariseur P_2 . Le polariseur P_1 permet d'ajuster sa puissance à toute valeur inférieure ou égale à 1 mW.

Après avoir traversé la cellule, le faisceau excitateur est renvoyé par un petit miroir sur un détecteur photo-électrique CP qui permet de mesurer la puissance incidente ou la puissance transmise par la cellule.

La partie du faisceau réfléchi par la lame L_1 sert à constituer l'oscillateur local. Elle est envoyée sur un miroir cylindrique de très faible rayon constitué par une aiguille A, placée dans l'axe du faisceau excitateur. L'image de cette aiguille donnée par la lame L_2 est rigoureusement confondue avec la position de l'impact D du faisceau excitateur sur la cellule ; de ce fait, pour tout angle de mesure θ , la lumière diffusée par la cellule et celle réfléchi par l'aiguille, puis par la lame L_2 semblent provenir du même point. Un taux d'hétérodynage indépendant de l'angle est ainsi assuré sans modification de réglage.

L'ajustement en intensité de l'oscillateur local se fait par translation de la lame L_1 perpendiculairement à son plan : l'aiguille reçoit ainsi une partie plus ou moins grande du faisceau réfléchi. L'aiguille est fixée sur une tête goniométrique pour faciliter son réglage. En effet un bon rendement d'hétérodynage ne peut être obtenu qu'après un réglage très précis en position et en orientation de l'aiguille par rapport à la cellule.

Le faisceau diffusé par la cellule et celui provenant de l'aiguille sont reçus sur un photomultiplicateur PM. L'ouverture utile du faisceau diffusé est délimitée par un diaphragme pratiquement rectangulaire $4 \times 1,5 \text{ mm}^2$ dont le grand axe est horizontal ; l'angle solide de collection de la lumière est de $2,3 \times 10^{-5}$ stéradian.

Les cellules utilisées sont cylindriques et démontables, leur épaisseur utile peut varier de 0,1 à 1 mm.

La cellule est placée dans un petit four en cuivre dont la température peut être stabilisée entre l'ambiante et quelques dizaines de degrés C. Le four — donc la cellule — peut être translaté perpendiculairement au faisceau excitateur soit manuellement, soit mécaniquement par liaison flexible avec un moteur synchrone démultiplié. La cellule est alors soumise à un mouvement de va-et-vient d'amplitude et de vitesse réglables.

Précautions particulières. — La grande sensibilité de ce montage rend nécessaires certaines précautions :

a) des caches opaques permettent d'effectuer les mesures à la lumière ambiante ;

b) des tubes étanches joignent les différents éléments optiques pour éviter la présence de poussières mobiles sur les faisceaux lumineux ;

c) tous les éléments sont solidement fixés à une table métallique rigide qui repose elle-même sur une table de mesure par l'intermédiaire de tampons en caoutchouc mousse, dans le but d'éliminer l'influence des vibrations.

FIG. 1. — Schéma du montage optique.

3.2 MESURES ÉLECTRONIQUES. — 3.2.1 Relevé du spectre de fréquences. — La mesure du spectre en fréquences est effectuée à l'aide d'un analyseur classique. Mais notons tout de suite une importante particularité concernant l'étude du spectre de la lumière diffusée par les micro-organismes vivants, mobiles et de taille comparable ou supérieure à la longueur d'onde lumineuse. La taille de ces objets entraîne une répartition angulaire de l'intensité lumineuse diffusée intéressant essentiellement les très petits angles de diffusion (pour des objets de diamètre $5\ \mu$, $\theta \leq 10^\circ$). Dans ce domaine angulaire, les décalages de fréquence dus à l'effet Doppler sont faibles (une vitesse de translation de $20\ \mu/s$ donne un $\Delta\nu$ égal à $3\ \text{Hz}$ pour $\theta = 5^\circ$). En conséquence, le domaine spectral de la détection hétérodyne est entièrement compris entre la fréquence nulle et quelques dizaines de hertz. Ce domaine se situe à la limite extrême des possibilités des analyseurs d'onde couramment employés en spectroscopie par battements de photons : nous avons donc dû utiliser un correcteur de fréquences pour adapter notre analyseur d'onde à ce domaine de mesure. Pour les raisons particulières que nous avons évoquées ci-dessus, l'utilisation d'analyseurs de spectres en temps réel représente une amélioration considérable à cause du gain de temps et de résolution spectrale : certains résultats présentés ont été obtenus avec un tel analyseur, de type Hewlett-Packard 8064-8065 A.

Caractéristiques des éléments électroniques (Fig. 2). — L'intensité de la lumière diffusée i_D et de la lumière

FIG. 2. — Schéma du dispositif électronique :

- CP détecteur photoélectrique,
- V₂ mesureur d'intensité incidente ou transmise,
- A₁ amplificateur de gain variable,
- C correcteur de réponse de l'analyseur,
- S élévateur au carré,
- V₁ voltmètre mesurant le photocourant du PM,
- PM photomultiplicateur,
- HT alimentation haute tension,
- R₁, R₂ résistances de charge,
- F filtre passe-bande,
- S' élévateur au carré,
- V₃ voltmètre mesurant l'intégrale du spectre.

réfléchi par l'aiguille I_1 sont mesurées à l'aide du voltmètre électronique V_1 en commutant l'anode du PM sur l'une ou l'autre des deux résistances de charge R_1 ou R_2 . Usuellement $I_1/i_d \approx 30$. Les fluctuations du photocourant sont amplifiées par l'amplificateur A_1 dont le gain peut être choisi par commutation (en pratique 50, 100 ou 200). Le correcteur C sert à compenser la chute de sensibilité de l'analyseur d'onde pour les fréquences inférieures à 10 Hz. Il est constitué par un amplificateur ayant un circuit d'avance de phase en contre-réaction ; on peut voir, figure 3 la courbe de réponse en fréquence de l'analyseur d'onde sans et avec correction. La réponse corrigée est sensiblement indépendante de la fréquence jusqu'à 1,5 Hz avec une chute très rapide au-dessous de 1 Hz. L'analyseur de spectre de type general Radio 1900 A est généralement utilisé avec une bande passante de 3 Hz sur des sensibilités de 100 ou 300 mV. La commande de balayage en fréquences est effectuée par un moteur synchrone ; un potentiomètre, qui lui est couplé mécaniquement, permet de repérer les fréquences. Un élément non linéaire S permet d'élever au carré le spectre détecté par l'analyseur d'onde et une constante de temps généralement prise égale à 2 s, permet une intégration raisonnable des fluctuations du spectre qui est enregistré sur une table traçante XY.

FIG. 3. — Réponse en fréquence de l'analyseur d'onde non corrigée A et corrigée B.

Un commutateur B permet de connecter sur l'entrée de l'amplificateur A_1 , soit la résistance de charge R_2 du PM, soit la tension de sortie de la cellule CP qui mesure l'intensité du faisceau transmis dont les fluctuations sont préalablement amplifiées avec un gain 1 000. Cette dernière disposition permet de mesurer le spectre des fluctuations du faisceau transmis.

3.2.2 Mesure de l'intensité intégrée du spectre de fréquences. — Le nombre des objets en mouvement peut être déterminé de la surface du spectre. Pour obtenir cette surface, on peut intégrer par un procédé mécanique le spectre $S(\nu)$ obtenu, mais on peut aussi obtenir directement cette surface par un procédé électronique : il suffit de construire un filtre de fréquence passe-bande dont la largeur soit supérieure à celle du

spectre à intégrer, et de mesurer la moyenne du carré de la tension efficace à la sortie de ce filtre. En pratique, ce filtre F est constitué de trois amplificateurs de gain 10 en série contre réactionnés par un circuit RC ; les amplificateurs sont couplés entre eux par des capacités. La figure 4 montre la réponse du filtre passe-bande ainsi réalisé dont la pente de coupure est de 18 dB par octave. Il est suivi d'un élévateur au carré S dont la tension moyennée par une constante de temps (20 s) donne directement

$$\int_{v_{\min}}^{v_{\max}} I^2(v) dv.$$

FIG. 4. — Réponse en fréquence du filtre passe-bande F .

La coupure $v_{\min}$ dépend du type de mouvement des objets dont on veut déterminer le nombre : soit par exemple à déterminer le nombre de micro-organismes mobiles dans une population qui comprend aussi des micro-organismes morts, donc seulement animés de leur mouvement brownien ; on ajustera la fréquence $v_{\min}$ de telle façon qu'elle soit légèrement supérieure à l'étendue du spectre correspondant au mouvement brownien. $v_{\max}$ est déterminé de façon à être largement supérieure à l'étendue spectrale correspondant à l'effet Doppler. L'intégrale ainsi mesurée correspond donc au spectre des seuls objets mobiles.

3.2.3 Calibration de l'appareillage. — Pour déterminer le nombre absolu des objets en mouvement il est nécessaire d'avoir une bonne connaissance de la sensibilité de l'appareillage, certains paramètres instrumentaux pouvant varier au cours du temps.

Nous avons vu, formule 2, que la surface du spectre hétérodyne est

$$S = 2 i_d I_1 \frac{A_{\text{coh}}}{A_{\text{PM}}} K.$$

Une fois connus les gains des amplificateurs électroniques permettant la détection des spectres, les seuls paramètres intervenant dans la sensibilité sont $A_{\text{coh}}/A_{\text{PM}}$ et K .

1) $A_{\text{coh}}/A_{\text{PM}}$ ne dépend que des caractéristiques géométriques du montage ; à petit angle de diffusion

$A_{\text{coh}} = \pi(\lambda/\Phi)^2 d^2$, où $\lambda = 0,6328 \mu$, $\Phi \simeq 1 \text{ mm}$ est le diamètre du faisceau excitateur dans la cellule et $d = 51 \text{ cm}$ est la distance cellule-photomultiplicateur. Sachant que $A_{\text{PM}} = 0,06 \text{ cm}^2$ nous pouvons calculer $(A_{\text{PM}}/A_{\text{coh}})_{\text{calc}} = 180$.

La formule 1 permet de déduire une valeur expérimentale de ce même rapport en connaissant l'intégrale du spectre d'autobattelements et l'intensité diffusée i_d correspondante. Nous avons trouvé

$$(A_{\text{PM}}/A_{\text{coh}})_{\text{exp}} = 170.$$

2) Contrairement au rapport $(A_{\text{coh}}/A_{\text{PM}})$ qui est à peu près invariant dans une géométrie donnée, le facteur d'hétérodynage K est extrêmement sensible aux moindres déplacements mécaniques (voir Fig. 5) et sa valeur doit donc être déterminée régulièrement. Cette valeur de K peut être déduite du rapport de la surface du spectre hétérodyne S à celle du spectre d'autobattelements correspondant s , connaissant par ailleurs i_d et I_1

$$K = \frac{S}{s} \frac{i_d}{2 I_1}.$$

A l'optimum des réglages nous avons trouvé une valeur de K voisine de 1.

FIG. 5. — Variation du taux d'hétérodynage en fonction du déplacement de l'aiguille parallèlement au plan de la cellule. $\delta\theta$ représente la désangulation entre le faisceau diffusé et le faisceau de l'oscillateur local.

$A_{\text{coh}}/A_{\text{PM}}$ étant pratiquement une constante de l'appareillage, la calibration ne nécessite que la mesure de la surface S du spectre hétérodyne : pour une intensité i_d donnée, cette surface est directement proportionnelle à K . Ce type de calibration se fait aisément en utilisant une suspension de sphères de latex de $0,1 \mu$ de diamètre par exemple, que l'on filtre soigneusement.

La valeur de S ainsi mesurée sert alors de test pour l'ensemble des réglages et permet de normaliser les surfaces obtenues à partir des objets en mouvement dont on veut mesurer le nombre. Cette méthode, par ailleurs très simple présente cependant un inconvénient dû au fait qu'une partie non négligeable de i_d

peut correspondre à des diffusions élastiques ⁽¹⁾ (poussières, microbulles, diffusion par les parois de la cellule).

Une deuxième méthode permet de s'affranchir de ces difficultés ; en translatant parallèlement à elle-même la cellule contenant un diffusant quelconque, le spectre total (y compris la partie parasite statique) se trouve translaté par effet Doppler à une fréquence $\nu \neq 0$. La surface du spectre, mesurée dans ces conditions, correspond bien alors à la totalité de i_D et sert plus valablement de test.

Par ailleurs, on verra plus loin l'intérêt de cette méthode dans l'estimation du pourcentage d'éléments mobiles.

4. Résultats expérimentaux. — Nous ne donnerons ici que quelques exemples illustrant les diverses possibilités de l'appareillage. Une étude consacrée particulièrement à la détermination des caractéristiques du sperme humain sera discutée en détail dans une prochaine publication.

4.1 INTENSITÉ DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE. — **4.1.1 Relevé de la caractéristique angulaire de diffusion.** — Le montage décrit permet ce type de mesure dans le domaine angulaire 30° - 45° ; ce domaine est particulièrement adapté aux cellules biologiques dont les dimensions sont de l'ordre du micron ou supérieures. La théorie de Mie [8], résumée sous forme de courbes ou de tableaux [9] permet de déduire à partir de ces caractéristiques, des indications sur la taille moyenne des objets diffusants et sur leur forme. Par exemple nous pouvons voir figure 6 les caractéristiques de diffusion de sphères de latex en suspension dans l'eau ainsi que celles de bactéries de type entérocoque.

FIG. 6. — Répartition angulaire de l'intensité diffusée.

- (A) Sphères de latex de diamètre $0,179 \mu$ en suspension dans l'eau.
 (B) Sphères de latex de diamètre $0,5 \mu$ en suspension dans l'eau.
 (C) Culture d'entérocoques constituée essentiellement d'éléments à 2, 3 et 4 chaînons. Longueur moyenne 8μ .

(1) Une diffusion élastique est une diffusion sans aucun changement de fréquence.

4.1.2 Mesure du nombre d'objets à l'aide de l'intensité diffusée. — Ces mesures s'effectuent à angle fixe, choisi d'autant plus faible que la taille des objets dont on veut déterminer le nombre est grande. La puissance incidente, mesurée avec le détecteur photoélectrique est soigneusement repérée et généralement prise égale à $0,5 \text{ mW}$. La figure 7 montre la variation de l'intensité diffusée en fonction de la concentration de spermatozoïdes dans le sperme, cette concentration étant déterminée par une méthode de comptage conventionnelle au microscope. La droite obtenue ne passe pas par l'origine, à cause de la diffusion due au liquide séminal. Une fois la courbe d'étalonnage établie, il est clair que la méthode de mesure de l'intensité diffusée pour déterminer la concentration d'objets en suspension est au moins aussi précise et bien plus rapide que la méthode de comptage au microscope.

FIG. 7. — Variation de l'intensité diffusée en fonction du nombre de spermatozoïdes par cc ; puissance incidente $0,5 \text{ mW}$, sperme non dilué, cellule $l = 0,1 \text{ mm}$ $\theta_{\text{mesuré dans l'air}} = 8^\circ$.

4.2 SPECTRE DE LA LUMIÈRE DIFFUSÉE. — Des informations très intéressantes sur le mouvement des objets peuvent être déduites du spectre de la lumière diffusée.

Rappelons que dans le cas d'objets sphériques en mouvement brownien le spectre de la lumière diffusée est lorentzien de demi-largeur à mi-hauteur

$$\Gamma = k' D \sin^2 \theta / 2 ,$$

k' étant une constante et D , coefficient de diffusion, égal à

$$\frac{kT}{6 \pi \eta r}$$

η = viscosité du solvant,
 r = rayon de la sphère.

Si les sphères sont animées, en plus de leur mouvement brownien, d'un mouvement de translation, le spectre hétérodyne est décalé par rapport à la fréquence

nulle d'une quantité correspondant à l'effet Doppler et égale à

$$\Delta\nu = \frac{2v}{c} \nu_0 \cos \alpha \sin \frac{\theta}{2}$$

(voir introduction).

On peut voir figure 8 les spectres hétérodynes correspondant à la diffusion de la lumière par des sphères de latex. La courbe A a été obtenue la cellule étant immobile, le trait plein correspond à une courbe lorentzienne. Par contre, les spectres B et C ont été

FIG. 8. — Spectres hétérodynes de sphères de latex de $0,179 \mu$ de diamètre en mouvement brownien dans l'eau — angle de diffusion dans l'air $\theta = 18^\circ$.

- (A) Cellule immobile.
- (B) Cellule traduite perpendiculairement au faisceau incident à la vitesse de $42 \mu/s$.
- (C) Cellule traduite perpendiculairement au faisceau incident à la vitesse de $83 \mu/s$.

obtenus en donnant à la cellule un mouvement de translation uniforme à deux vitesses différentes. L'élargissement entre B et C est un effet instrumental lié au fait que la bande passante de l'analyseur utilisé dans cette expérience est d'autant plus grande que la fréquence de mesure est élevée. La différence de hauteur entre le spectre A et les deux autres spectres est due au fait que dans le premier, l'intensité spectrale qui correspondrait aux fréquences négatives est repliée du côté des fréquences positives.

La variation angulaire de l'effet Doppler pour une

vitesse de translation donnée est représentée figure 9 ; elle a été obtenue en mesurant le décalage de la raie Rayleigh donnée par un diffusant élastique traduit à une vitesse de $42 \mu/s$. Ce décalage est porté en fonction de $\sin \theta$, la translation s'effectuant perpendiculairement au faisceau exciteur, d'où $\alpha = \theta/2$.

FIG. 9. — Décalage Doppler de la raie Rayleigh par translation d'un diffuseur élastique à vitesse constante de $42 \mu/s$. Les angles sont mesurés dans l'air. La droite correspond à l'effet Doppler calculé en prenant $\lambda_0 = 6328 \text{ \AA}$ et $C = 3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$.

Ces exemples d'effets Doppler provoqués par translation montrent les possibilités de l'appareillage dans l'étude du mouvement. La figure 10 montre par ailleurs les spectres de la lumière diffusée par deux spermatozoïdes humains A et B de vitalité différente. Le spectre A' a été obtenu à partir du sperme A dont les

FIG. 10. — Spectres de l'intensité diffusée par deux spermatozoïdes de vitalité différente. La courbe A' correspond au même sperme et à la même sensibilité que la courbe A mais les spermatozoïdes ont été tués.

spermatozoïdes ont été tués. Cet exemple illustre bien la sensibilité de cette technique à déceler, d'une part l'existence, d'autre part la qualité du mouvement de micro-organismes vivants.

4.3 MESURE DU POURCENTAGE D'OBJETS MOBILES (2).

— Il est très utile de connaître, en plus des caractéristiques du mouvement, le pourcentage des objets mobiles par rapport au nombre total d'objets présents dans la solution.

Pour ce faire, il suffit de mesurer l'intégrale du spectre de la lumière diffusée par les objets contenus dans la cellule, cette dernière étant d'une part immobile, d'autre part animée d'un mouvement de translation à vitesse constante. Ces mesures d'intégrales de spectre sont rendues quasi instantanées par l'usage du filtre passe-bande F. La fréquence de coupure inférieure de ce filtre étant choisie légèrement supérieure à l'étendue du spectre dû au mouvement brownien des objets, l'intégrale du spectre mesuré quand la cellule est immobile est alors uniquement due aux objets mobiles. Par contre l'intégrale mesurée lorsque la cellule est traduite correspond à la totalité des objets mobiles et immobiles (voir Fig. 11). Le rapport des deux mesures donne immédiatement le pourcentage d'objets mobiles indépendamment de la qualité des réglages optiques et des gains électroniques. Le tableau I donne quelques résultats ainsi obtenus sur différents échantillons de sperme humain (angle de mesure 8° dans l'air). L'estimation du pourcentage de spermatozoïdes mobiles est faite par ailleurs semi-quantitativement au microscope.

4.4 MESURE DE L'ABSORPTION OPTIQUE. — Le rapport entre l'intensité lumineuse transmise par la cellule I_{tr} et l'intensité incidente I_0 est directement lié au nombre et à la nature des objets en suspension dans la cellule. Si ceux-ci sont tous identiques la mesure de I_{tr}/I_0 est alors une mesure du nombre total de ces objets ; elle est d'autant plus intéressante qu'elle est très rapide et ne demande aucun dispositif compliqué.

La figure 12 montre la variation du rapport I_{tr}/I_0 en fonction de la concentration en spermatozoïdes contenus dans différents échantillons de sperme.

FIG. 11. — Schéma explicatif de la méthode de détermination du pourcentage d'objets mobiles ;

I. Spectres « hétérodyne » donnés par un ensemble d'objets mobiles et immobiles :

- (A) → cellule immobile,
(B) → cellule traduite à vitesse constante.

II. Réponse en puissance du filtre passe-bande.

III. Spectres après passage dans le filtre passe-bande. La surface ① correspond aux objets mobiles et la surface ② correspond à la totalité des objets mobiles et immobiles.

$\frac{S_{statique}}{S_{translaté}}$	0	3,7	24	40	45	62	65	77	95
Estimation microscopique (3)	morts	5	20 + 10	35 + 10	20 + 20	70 + 10	60 + 10	70 + 10	80 + 5

L'avantage de cette technique par rapport à celle consistant à mesurer l'intensité diffusée est qu'elle s'affranchit totalement des variations de réglages

optiques ; par contre elle présente une moindre sensibilité aux très faibles concentrations et ne permet pas la discrimination de taille que l'on peut obtenir par le choix de l'angle de diffusion.

(2) Nous entendons par « mobiles » les objets animés d'un mouvement biologique propre autre que leur mouvement brownien.

(3) L'estimation qualitative au microscope donne deux chiffres caractéristiques le premier représente le pourcentage de spermatozoïdes à mobilité normale (par exemple 35 % pour le cas représenté dans la 4^e colonne) ; le deuxième donne le pourcentage à mobilité diminuée (10 % pour le même cas). L'erreur relative sur ces deux chiffres est de 10 à 20 % et peut même être supérieure suivant la qualité de la mobilité. La précision de la mesure objective effectuée par diffusion de la lumière est de 5 % environ.

FIG. 12. — Variation du rapport de l'intensité transmise à l'intensité incidente en fonction de la concentration de spermatozoïdes ; mesure faite sur du sperme non dilué, $l = 0,1$ mm.

dynamique des objets en mouvement. Pour mesurer ces fluctuations d'absorption, il suffit d'analyser les fluctuations de l'intensité lumineuse transmise par la cellule.

FIG. 13. — Spectre des fluctuations de l'intensité transmise par une cellule contenant un sperme :

- (A) $45 \times 10^6/\text{cc}$ de spermatozoïdes mobiles.
- (B) $57 \times 10^6/\text{cc}$ de spermatozoïdes mobiles,
- (C) $89 \times 10^6/\text{cc}$ de spermatozoïdes mobiles.

On peut voir figure 13 le spectre des fluctuations de l'intensité transmise par 3 spermes de richesses différentes. L'ordre de grandeur des fluctuations relatives de l'intensité transmise est (en valeur efficace) 10^3 fois plus faible que celui des fluctuations relatives de la lumière diffusée.

Bien que le spectre de l'intensité transmise soit un reflet moins direct du mouvement d'objets mobiles que ne l'est le spectre de l'intensité diffusée, ce type de mesure est intéressant par son extrême facilité de mise en œuvre et par l'absence totale de spectre supplémentaire dû à un mouvement brownien de particules étrangères quelles qu'en soient la taille et la concentration.

5. Conclusion. — Ce montage hétérodyne à faisceaux séparés et entièrement indépendants permet une étude rapide depuis $\theta \sim 0^\circ$ jusqu'à $\theta = 45^\circ$ de toutes les caractéristiques du faisceau diffusé (ou transmis) par la solution à étudier. De ce fait, il est particulièrement adapté à l'étude des micro-organismes vivants, permettant en un temps très bref la mesure quasi simultanée du nombre, du pourcentage d'éléments mobiles et de caractéristiques dynamiques des éléments diffusants. Ces mesures objectives sont par ailleurs relativement précises en comparaison de celles effectuées jusqu'alors au microscope.

Remerciements. — L'application de l'appareillage décrit à l'étude du sperme humain, a pu être réalisée grâce à la collaboration du personnel du Laboratoire d'Histologie-Embryologie du Centre Hospitalier de Bicêtre, dirigé par le Professeur David.

Nous tenons à remercier plus particulièrement M. le Professeur David, le Docteur Jouannet et M^{lles} Baron et Feneu pour leurs précieux conseils et l'aide effective qu'ils nous ont apportés.

Nos remerciements s'adressent également à M. Ozena, de notre laboratoire, qui nous a apporté constamment une aide très efficace dans l'élaboration et la mise au point de nombreux éléments électroniques.

Bibliographie

- [1] BERGE P., VOLOCHINE B., BILLARD R., HAMELIN A., *Compte rendus* **265** (1967) 889.
- [2] ADAM M., HAMELIN A., BERGE P., GOFFAUX M., *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **9** (1959) 651.
- [3] NOSSAL R., CHEN S. H., LAI C. C., *Opt. Commun.* **4** (1971) 35.
- NOSSAL R., CHEN S. H., *Opt. Commun.* **5** (1972) 117.
- [4] MANN I. A. et coll., Communication au « Symposium on the Occasion of the Centennial of Rayleigh Scattering » Washington, septembre 1971.
- [5] ASCOLI C., BARBI M., FREDIANI C., PETRACCHI D., TRIMARCO C. (CNR Pisa), à paraître.
- [6] BENEDEK G. B., *Polarisation Matière et Rayonnement*, Presses Universitaires de France, Paris (1969), p. 49.
- [7] CUMMINS H. Z., SWINNEY H. L., *Progress in Optics*, Vol. VIII, edited by Wolf (North-Holland, Amsterdam, 1970).
- [8] MIE G., *Ann. Physik.* **25** (1908) 377.
- [9] STACEY K. A., *Light-scattering in Physical Chemistry*, Butterworths scientific publications, London (1956).