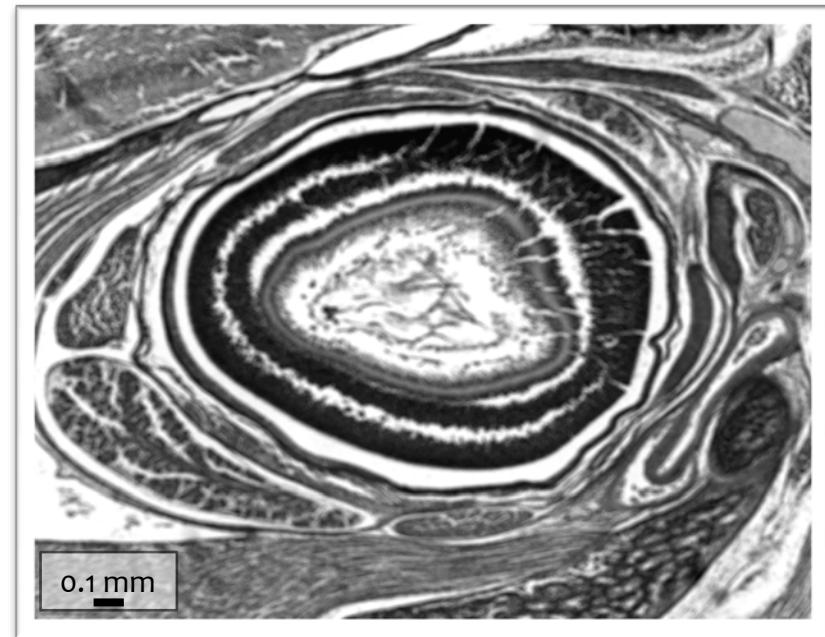
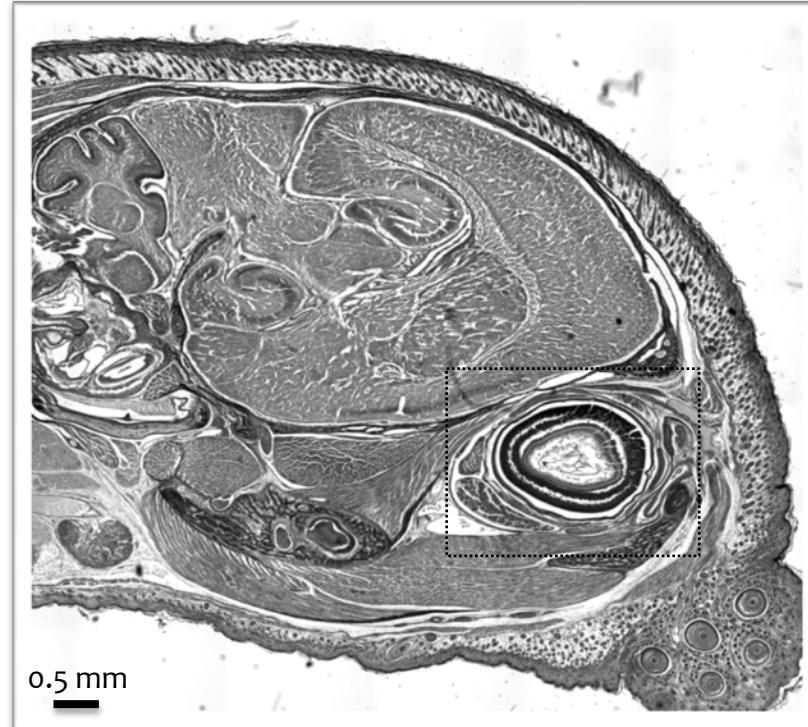
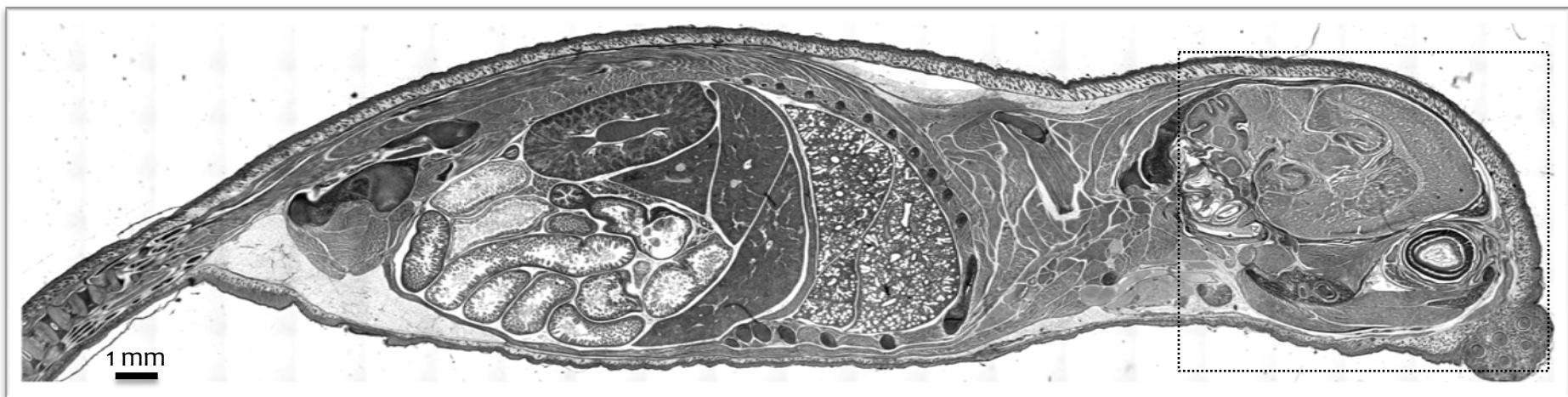


Microscopie en transmission (Plein champs) et éléments d'optique

François MICHEL PhD

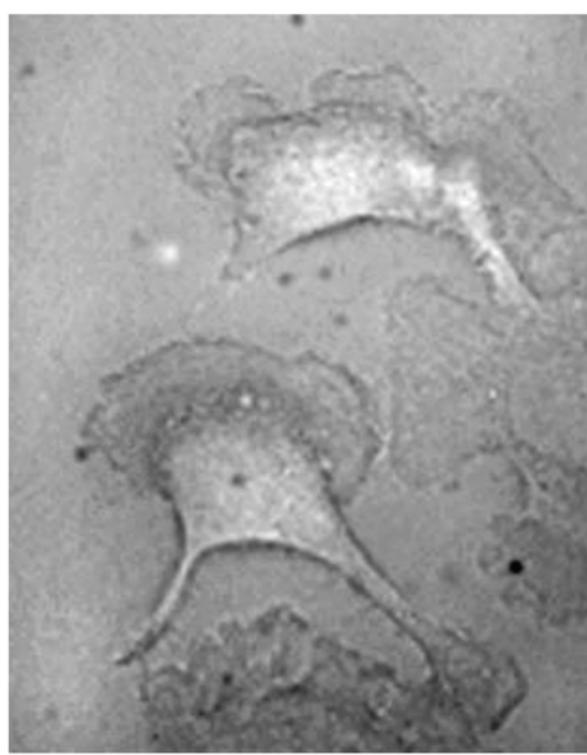
La microscopie pour débutants (ou pas)
Partie 1

Quelques images de microscopie



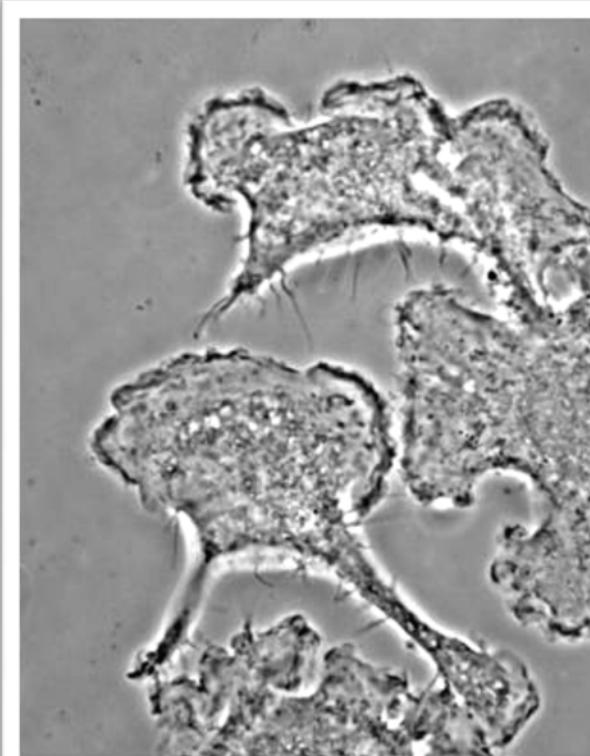
Quelques images de microscopie

Illumination standard



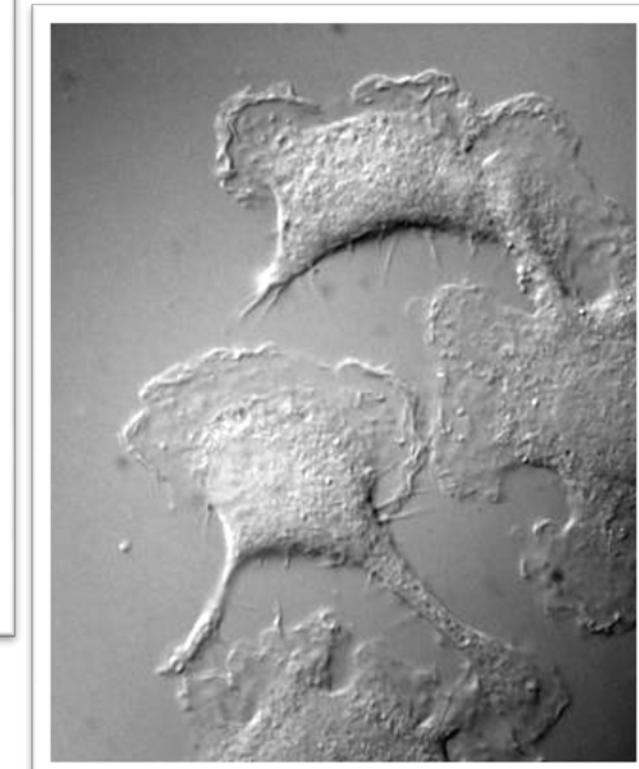
Bright field

Contraste de phase



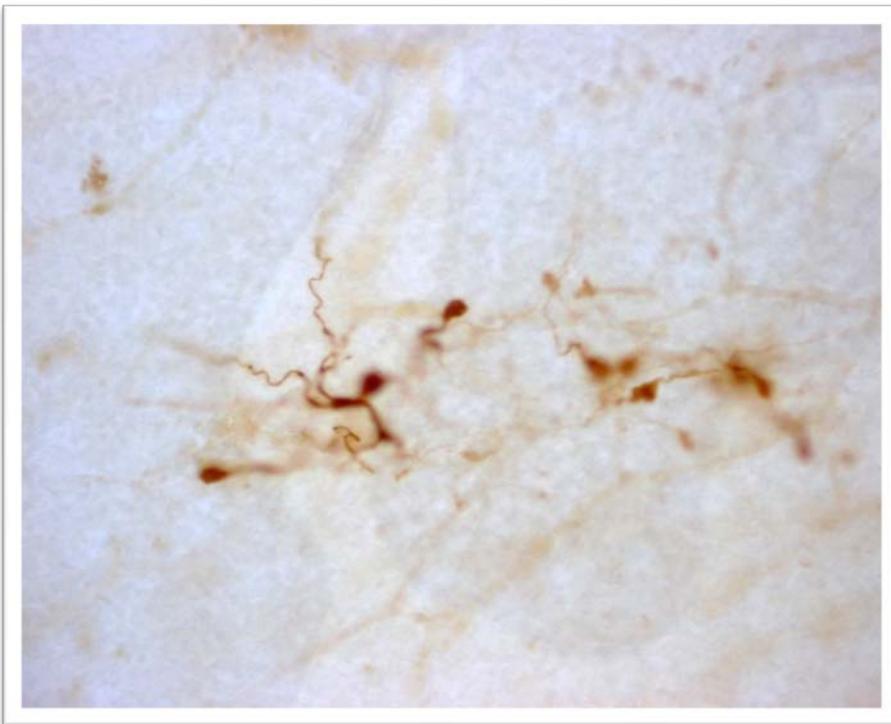
Phase contrast

Contraste interférentiel
différentiel



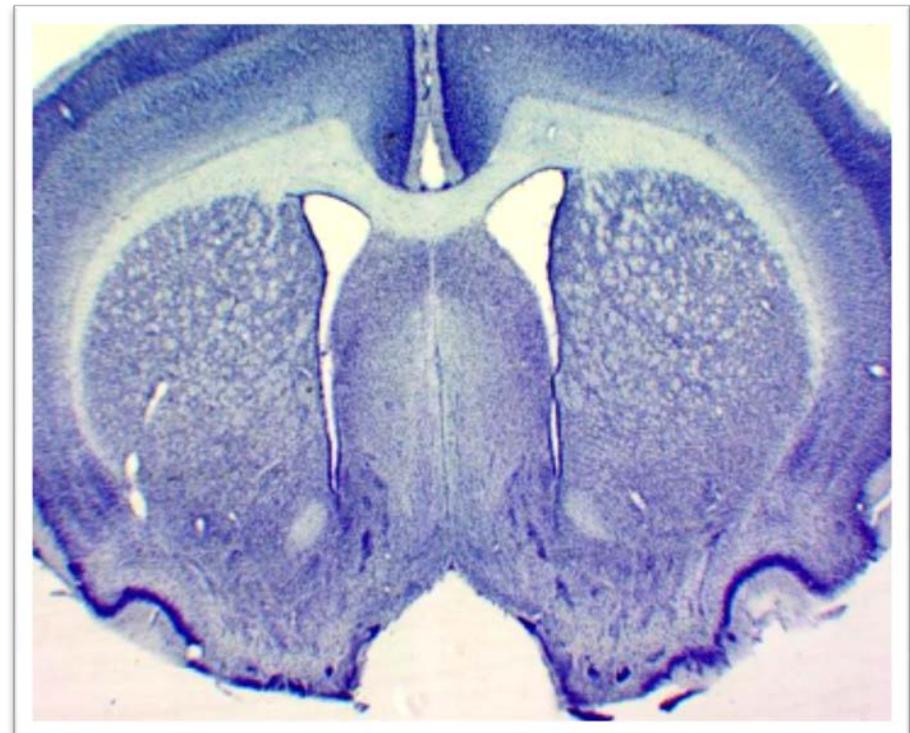
Nomarski contrast
- DIC

Quelques images de microscopie



D.A.B

Cresyl



Ce qui vous attend

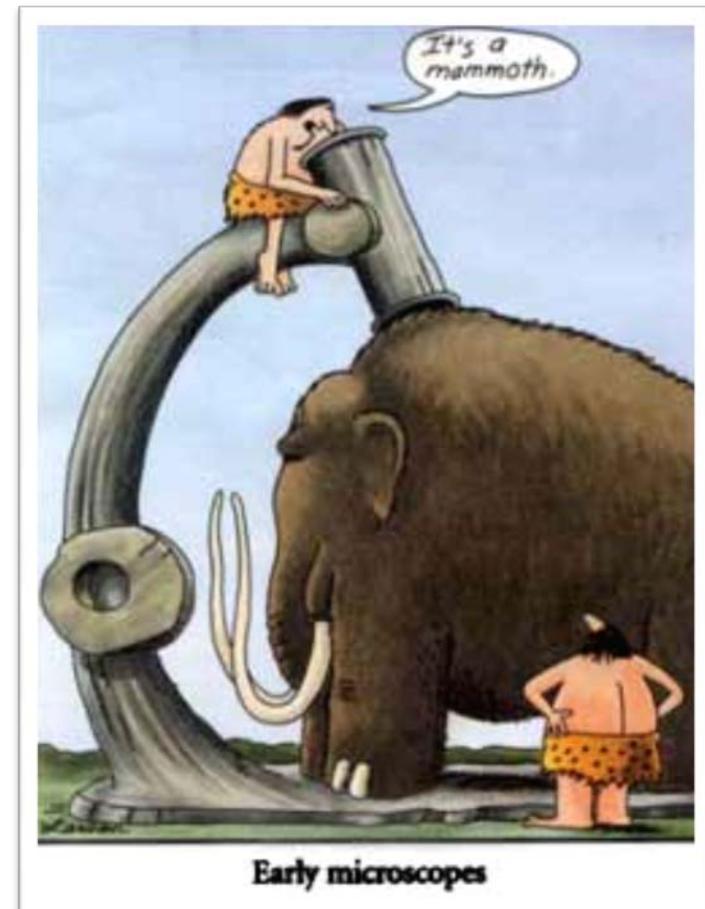
- Généralités
- Illumination
- Détection
- Aberrations et détérioration de l'image
- Résolution et acquisition d'image
- Amélioration des contrastes

Généralités

Buts multiples de la microscopie :

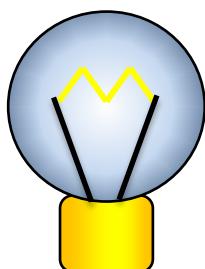
- rendre les détails visibles à l'œil humain ou par caméra
- séparer les détails dans l'image,
- Mesurer/déetecter un signal lumineux,
- produire une image agrandie de l'objet observé.

Souvent, l'observation s'effectue en fin de chaîne après l'expérience et la préparation des échantillons : Il faut tenir compte du type d'observation prévu dès le début du protocole.

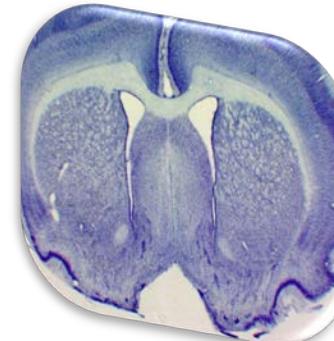


Généralités

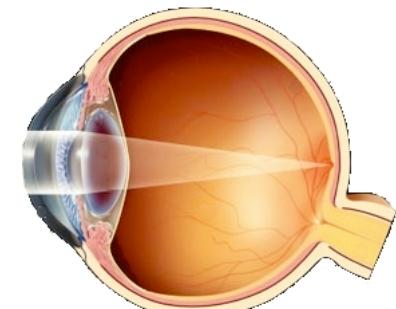
- Un objet n'est observable que par la lumière qui en émane.
- Cette lumière est générée :
 - Par transmission, elle traverse l'échantillon
 - Par émission (source secondaire : fluorescence) après excitation (par une source lumineuse primaire ou autres sources d'énergie).
- Un microscope se décompose donc en deux parties :
 - L'illumination
 - La détection



Illumination

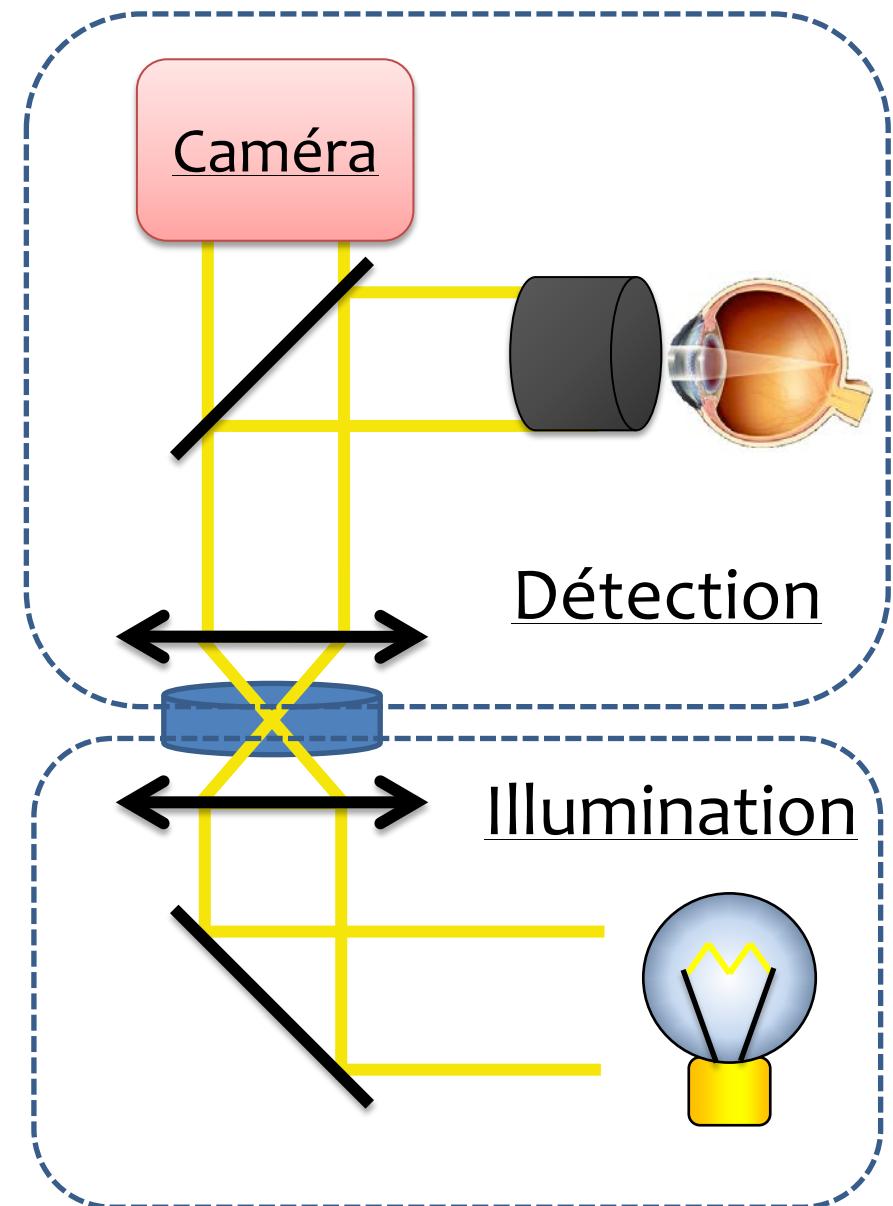
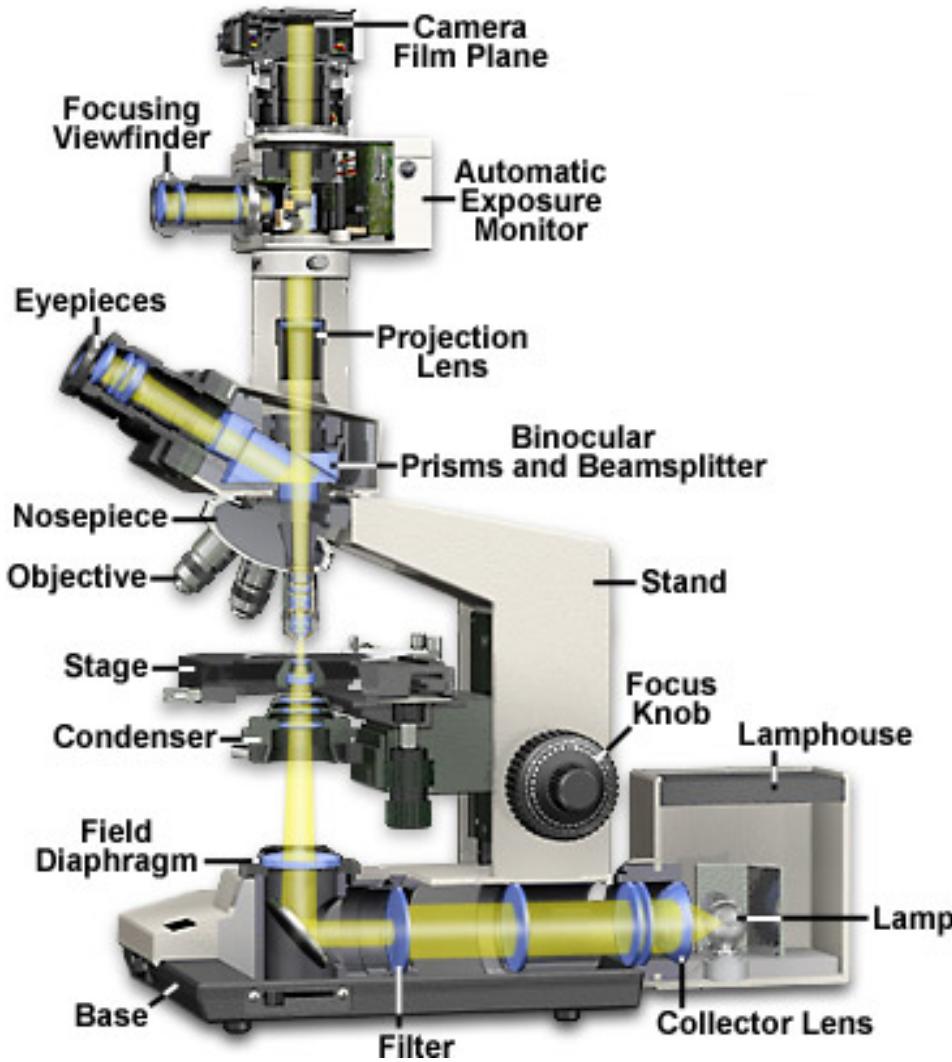


Détection



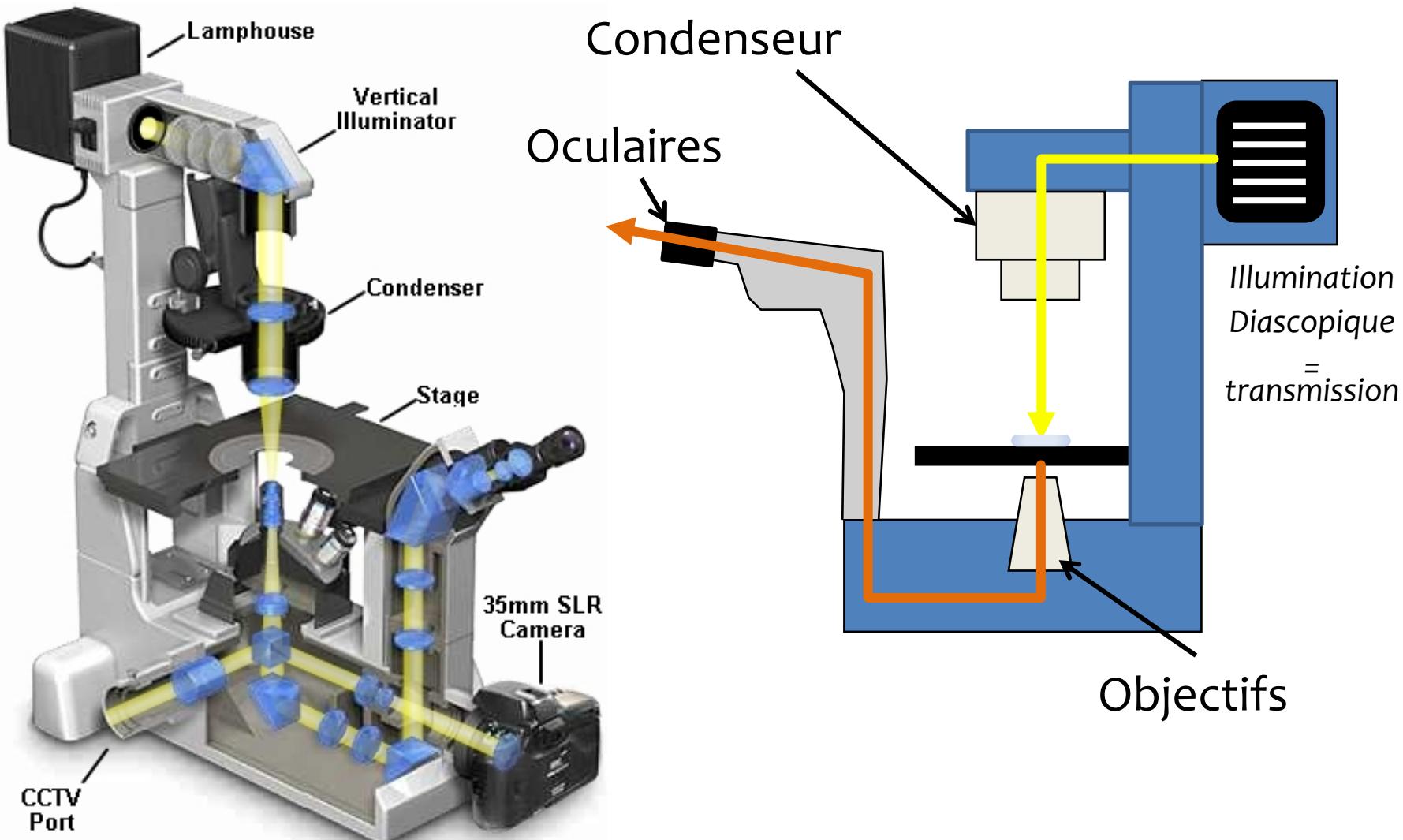
Généralités

Microscopes droits



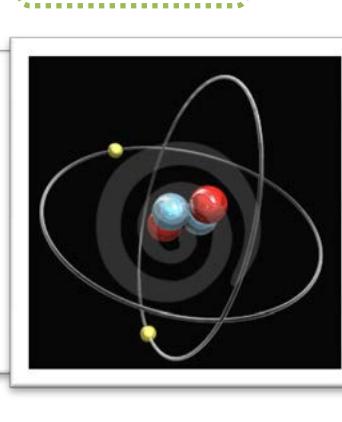
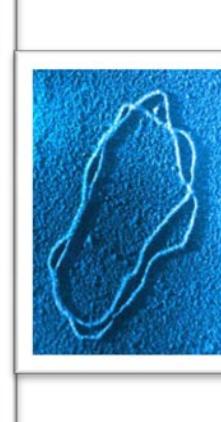
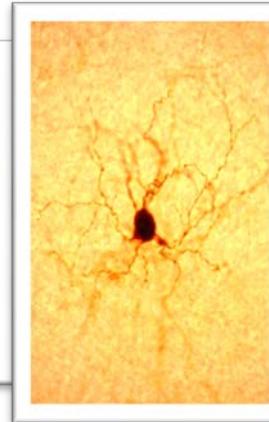
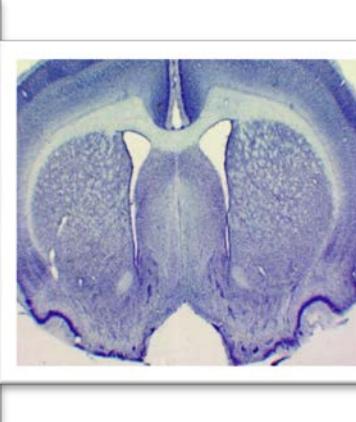
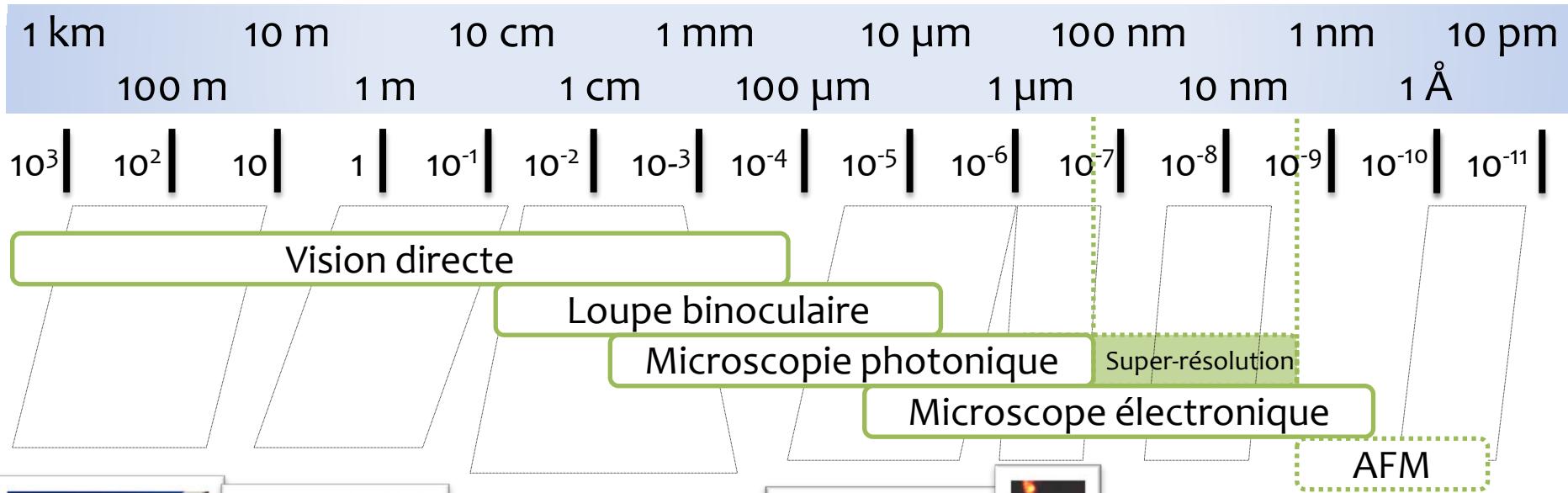
Généralités

Microscope inversé



Généralités

Ordres de grandeur



Généralités

Nature de la lumière et optique

L'optique est la branche de la physique qui traite de la lumière, de ses relations avec la matière et avec la vision.

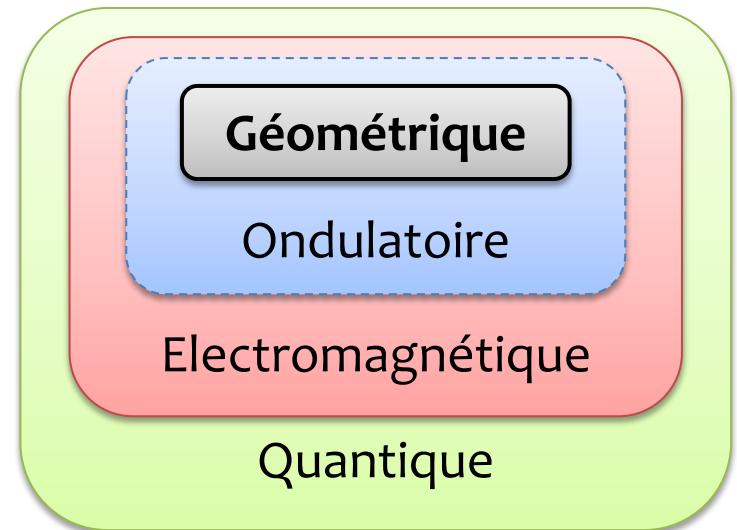
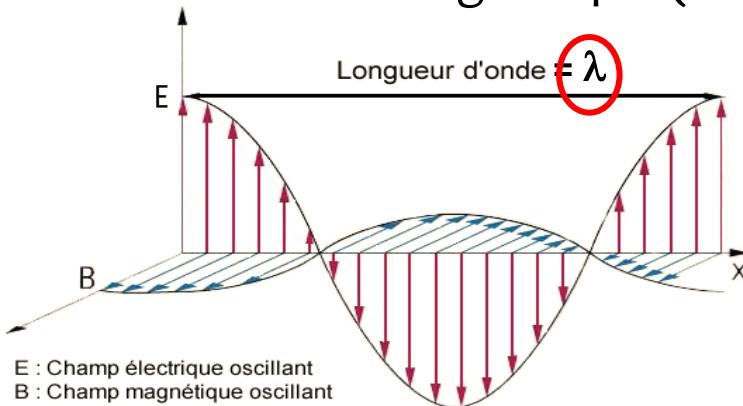
Discipline ancienne datant de l'antiquité (Grèce, Egypte...)

- Dans un premier temps basée sur **l'optique géométrique** : propagation rectiligne des rayons lumineux, elle explique réflexions et réfractions (Al-Hazem - Kepler - Snell - Descartes).
- Fin XVII^{ème}, début des hostilités sur la nature de la lumière entre :
 - La vision corpusculaire qui aboutira à **l'optique quantique** au XX^{ème} siècle (Aristote - Euclide - Newton – Planck – Einstein ; couleur, énergie)
 - **L'optique ondulatoire** à partir du XVIII^{ème} (Huygens - Young - Fresnel – Maxwell ; diffraction, interférence, polarité) .
- La dualité onde/corpuscule est reconnue en 1927 par N. Bohr et clos le débat donnant naissance à **l'électrodynamique quantique**.

Généralités

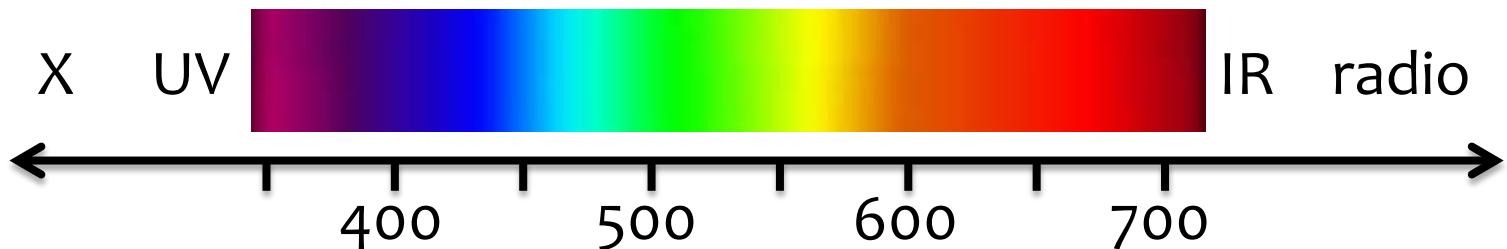
Nature de la lumière et optique

La lumière est donc composée de photons (γ) qui se propagent de façon rectiligne comme une onde électromagnétique (Maxwell, 1870).



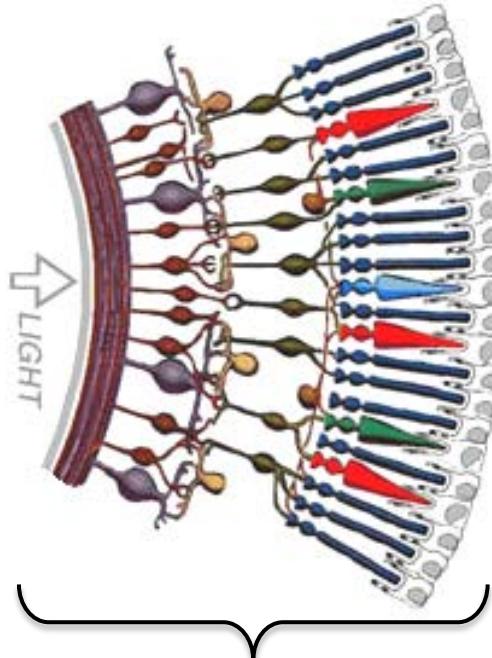
La longueur d'onde donnant la couleur du rayonnement.

Longueur d'onde λ (en nm)



Généralités

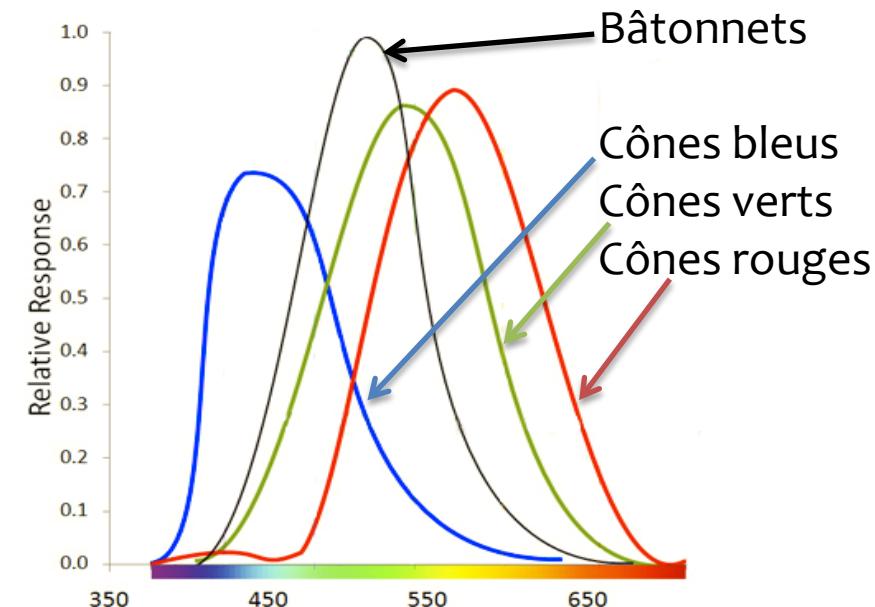
Physiologie visuelle (rappels ?!?)



Rétine +/- 300 µm

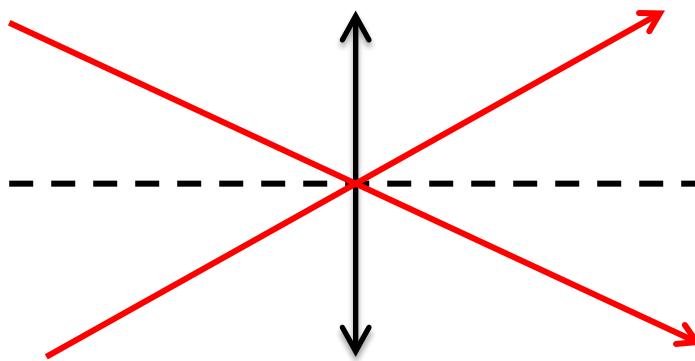
Le fond de l'œil ou rétine est tapissé de deux types de cellules photosensibles. Les cônes détectent les couleurs (faible sensibilité) et les bâtonnets à forte sensibilité (niveaux de gris).

La limite de résolution de l'œil est due à la structure de la rétine : Les images de deux points doivent se former sur deux récepteurs distincts pour ne pas être confondues. L'écartement minimal de deux récepteurs étant de $2,2 \mu\text{m}$, la limite de résolution dépend d'un grand nombre de facteurs, en conditions normales, elle est d'environ $3 \cdot 10^{-4} \text{ radian} = 1' \text{ d'arc}$ soit $< 150 \mu\text{m}$ à une distance de 25 cm.

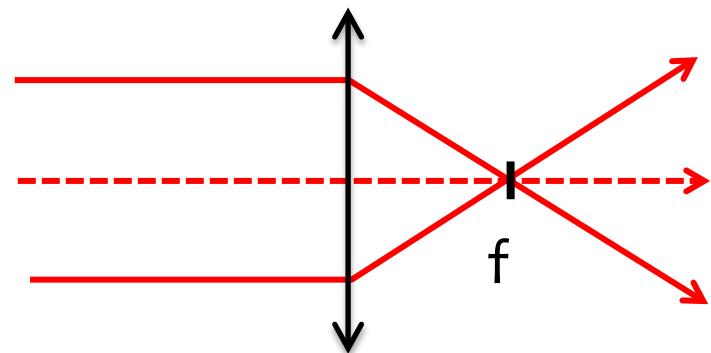


Généralités

Trajet optique : lentille (convergente)



Les rayons passant par le centre ne sont pas déviés.

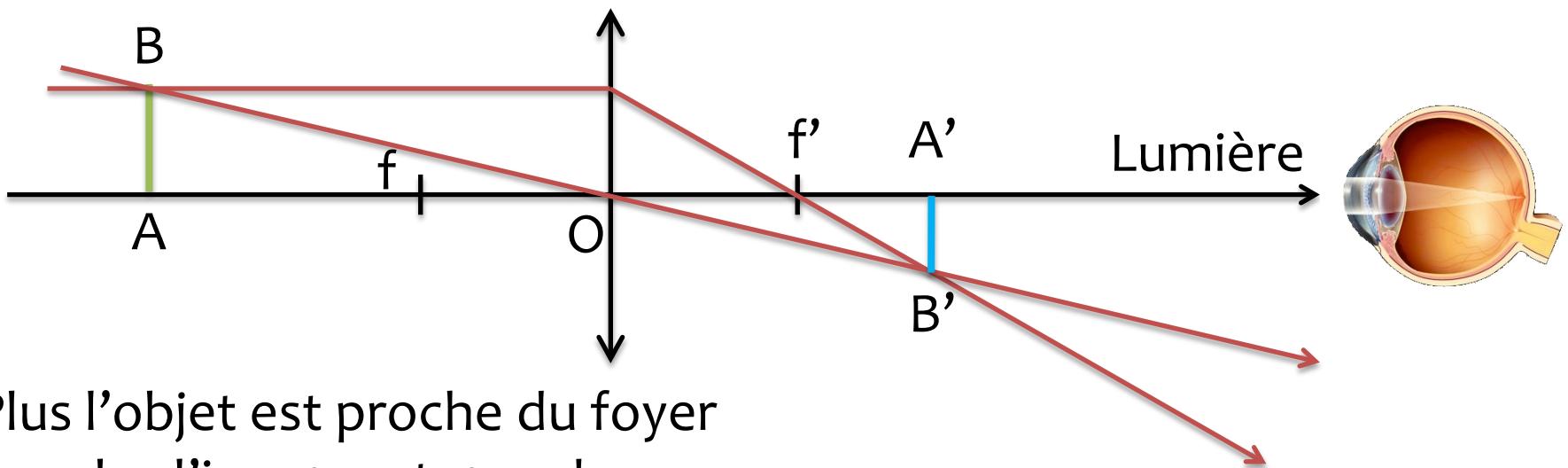


Les rayons parallèles à l'axe optique passent par le foyer image.

Conditions de Gauss : Les rayons traversent le système, sont peu inclinés sur l'axe du système (rayons paraxiaux) et proche du centre optique.

Généralités

Optique géométrique (rappels ?!?)



Plus l'objet est proche du foyer
plus l'image est grande.

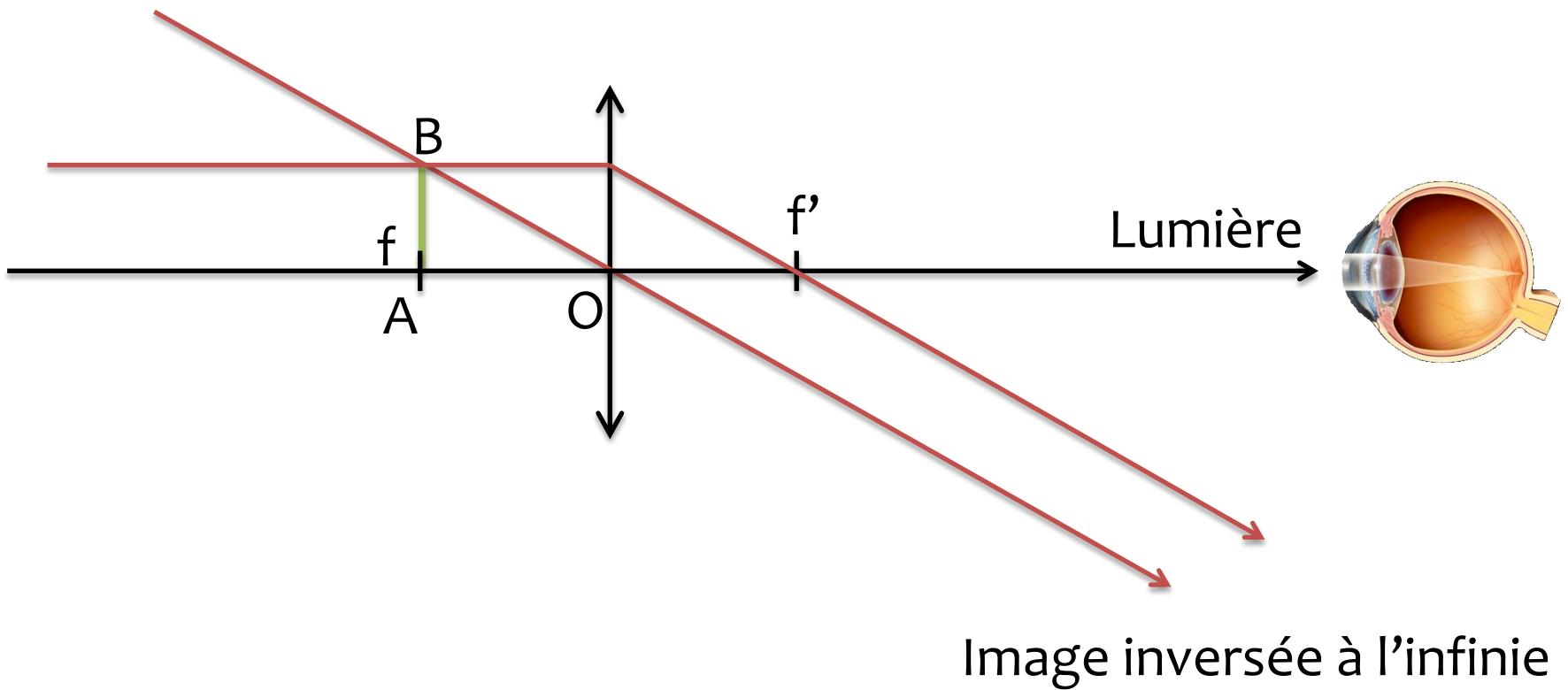
Si l'objet est avant le foyer,
l'image est inversée

$$\text{Grandissement de la lentille : } \gamma = \frac{\overline{OA'}}{\overline{OA}} = \frac{\overline{A'B'}}{\overline{AB}}$$

Généralités

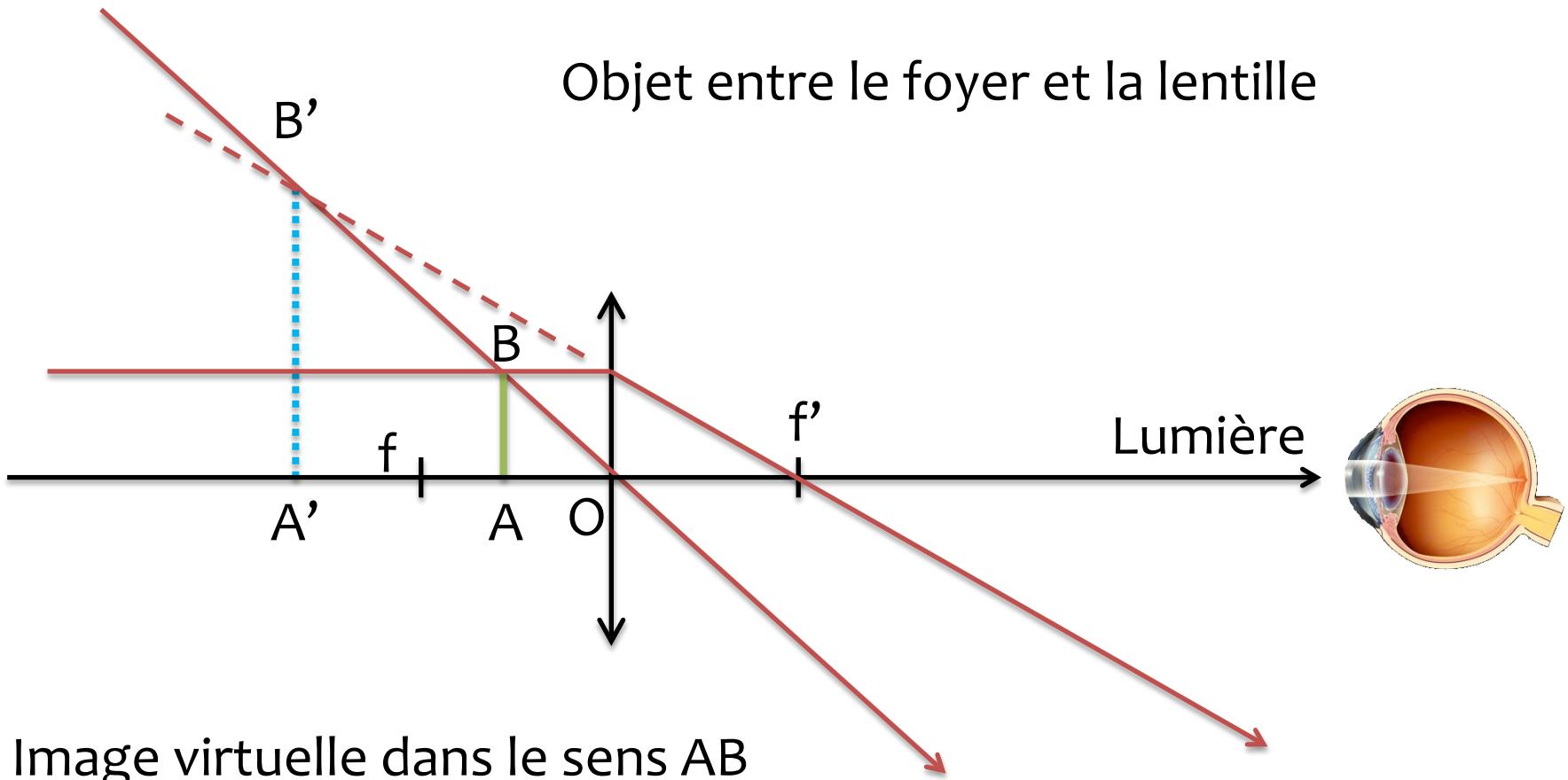
Optique géométrique (rappels ?!?)

Objet au foyer



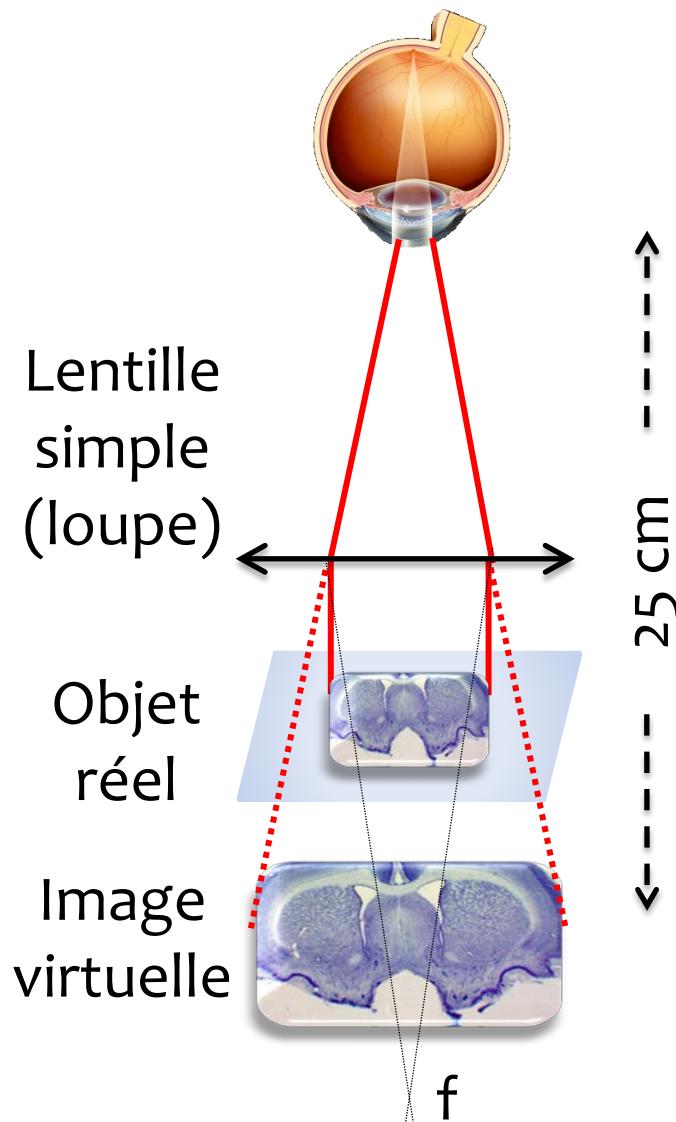
Généralités

Optique géométrique (rappels ?!?)



Généralités

Combinaison lentille & œil



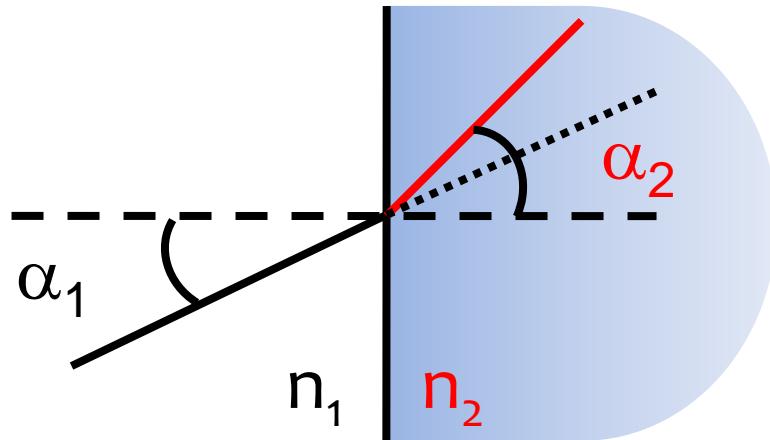
Microscope simple (loupe) : image perçue par l'œil comme si elle était à une distance de 25 centimètres

L'image apparaît du même côté de l'objectif que l'objet, et ne peut pas être projetée sur un écran : **image virtuelle** (droite, non inversée).

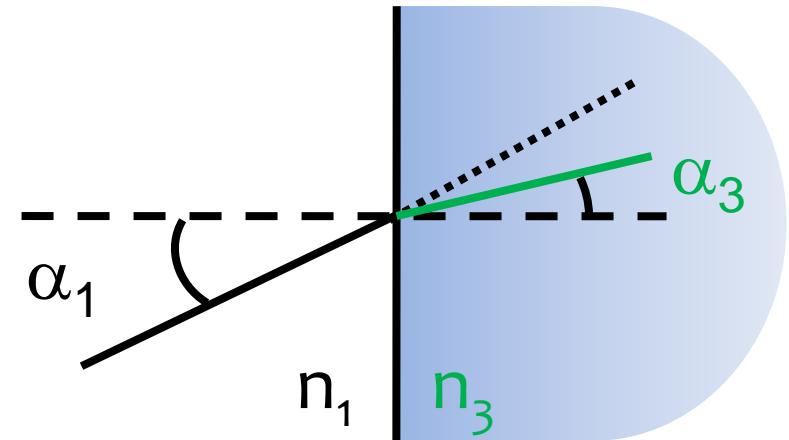
La lumière transmise à travers la tranche entre dans la lentille pour être réfractée et focalisée et produire l'image perçue par la rétine.

Généralités

Interfaces et réfraction



$$n_1 > n_2$$



$$n_1 < n_3$$



$$n_1 \sin\alpha_1 = n_2 \sin\alpha_2$$

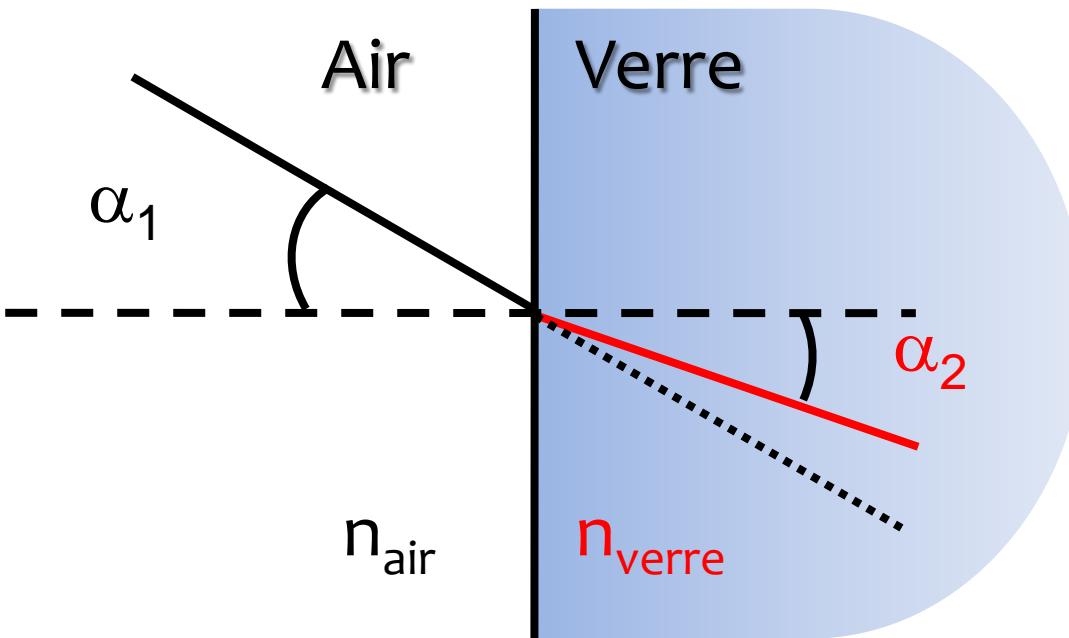
Loi de Snell-Descartes

Généralités

Interfaces et réfraction

$$\sin \alpha_1 = n_2/n_1 (\sin \alpha_2)$$

Exemple : $\alpha_1 = 30^\circ$ $n_{\text{air}}/n_{\text{verre}} = 1/1,52$
 $\alpha_2 = 19,2^\circ$



Valeurs approchées de n , l'indice optique, pour quelques substances

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Air | 1,00029 |
| Glace | 1,31 |
| Eau | 1,333 |
| Alcool éthylique ($C_2 H_5 OH$) | 1,36 |
| Quartz fondu ($Si O_2$) | 1,4584 |
| Tétrachlorure de carbone ($C Cl_4$) | 1,46 |
| Térébenthine | 1,472 |
| Benzène ($C_6 H_6$) | 1,501 |
| Plexiglas | 1,51 |
| Verre crown | 1,52 |
| Chlorure de sodium ($NaCl$) | 1,544 |
| Verre flint léger | 1,58 |
| Polystyrène | 1,59 |
| Disulfure de carbone (CS_2) | 1,628 |
| Verre flint dense | 1,66 |
| Verre flint au lanthane | 1,80 |
| Zircon ($ZrO_2.SiO_2$) | 1,923 |
| Fabulite ($SrTiO_3$) | 2,409 |
| Diamant (C) | 2,417 |
| Rutile (TiO_2) | 2,907 |
| Phosphure de gallium | 3,50 |

Généralités

Interfaces et réfraction n : indice optique

$$n = c/v \text{ donc } n \geq 1$$

c : vitesse de la lumière dans le vide

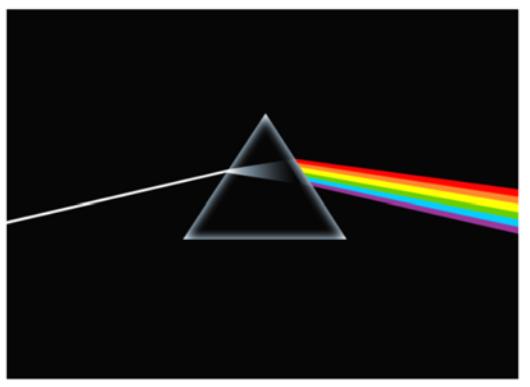
v : la vitesse de propagation de l'onde dans le milieu traversé

$$v_{\text{vide}} = c = 299\,792\,458 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1} \approx v_{\text{Air}} = 299\,704\,764 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$$

Donc $n_{\text{vide}} = 1$ et $n_{\text{air}} = 1.0002926$

$$v_{\text{Eau}} = 224\,841\,533 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1} \quad \text{donc } n_{\text{eau}} = 1.33335 \quad \alpha_2 = 22.02^\circ$$

$$v_{\text{Verre}} = 197\,603\,687 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1} \quad \text{donc } n_{\text{verre}} = 1.51714 \quad \alpha_2 = 19,24^\circ$$



$$v = f(\epsilon, \mu) = f(\lambda, P, T, \dots)$$

$$\epsilon \mu v^2 = 1$$

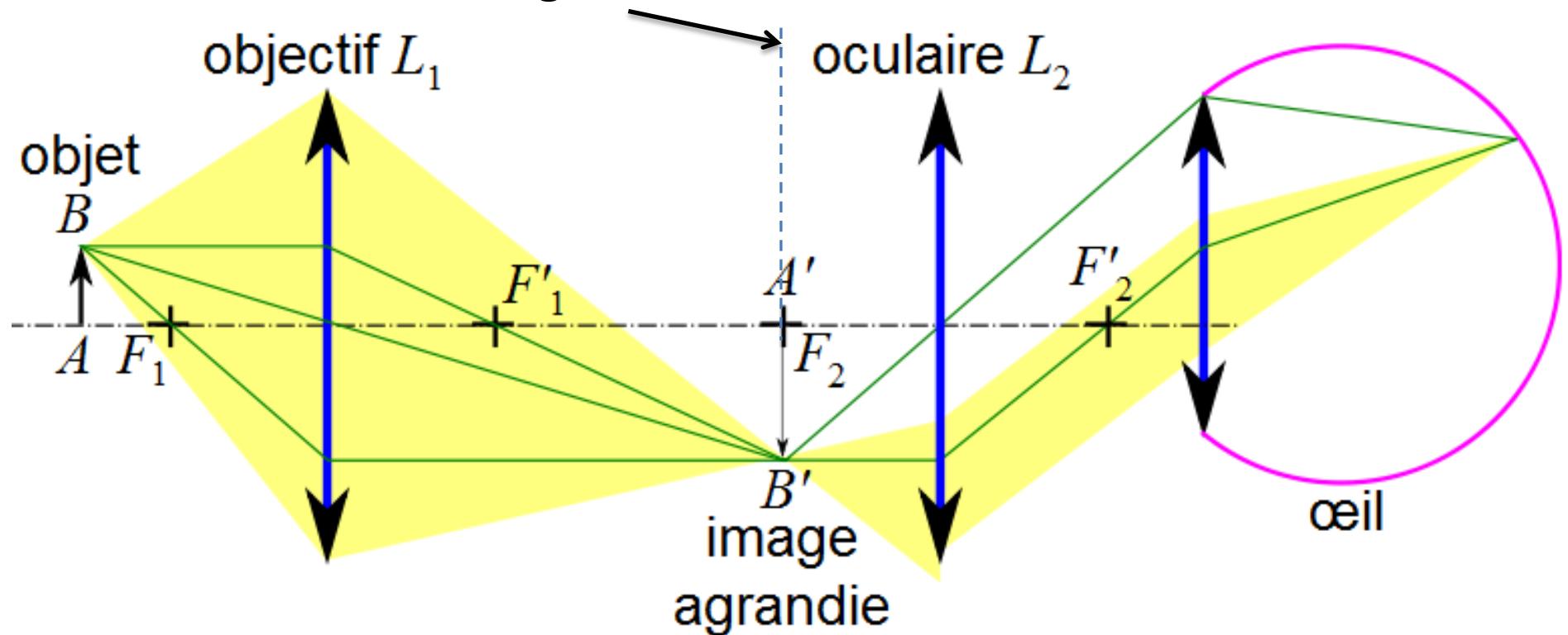
ϵ : permittivité diélectrique

μ : perméabilité magnétique

Généralités

Principe du microscope optique

Plan image intermédiaire



L'objectif (L_1) donne de l'objet AB observé une image réelle $A'B'$ renversée et très agrandie qui joue pour l'oculaire (L_2) le rôle d'objet réel. L'oculaire donne de cet objet une image virtuelle agrandie, vue par l'observateur à l'infinie car $A'B'$ est au foyer F_2 de l'oculaire.

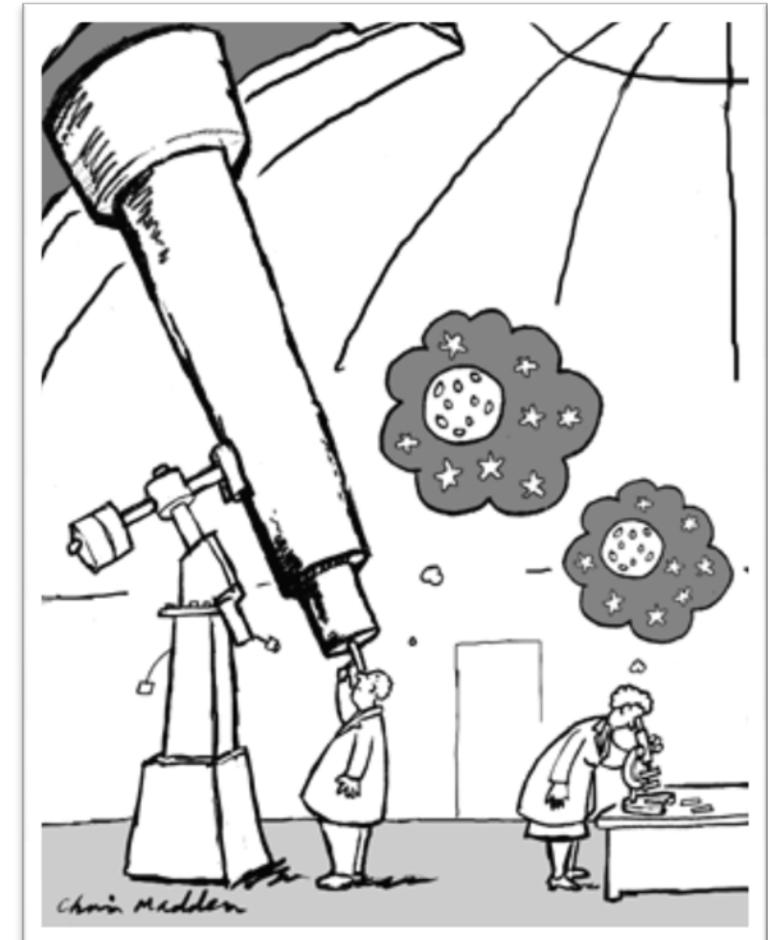
Généralités

Composants du microscope

- Statif
- Condenseur
- Objectifs
- Oculaires /caméra

Concepts importants

- Ouverture numérique
- Résolution
- Aberrations



Ce qui vous attend

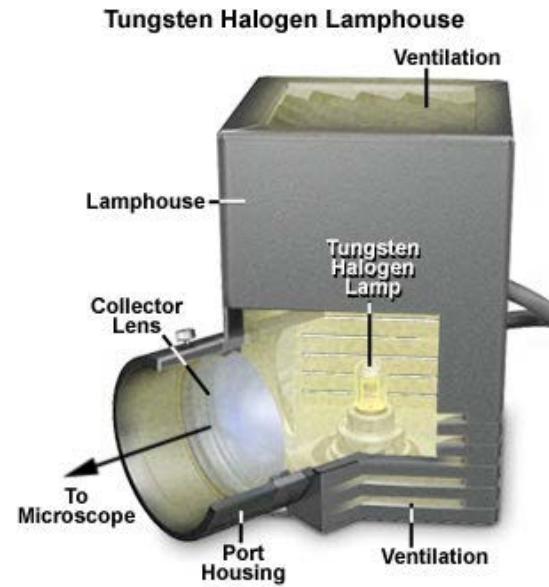
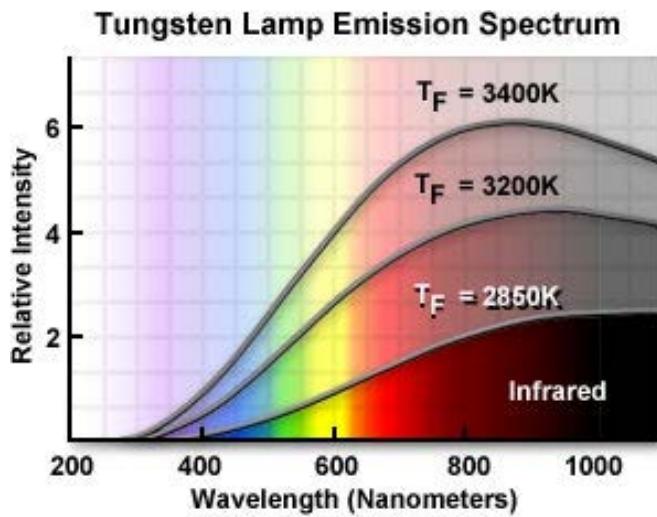
- ✓ Généralités
- Illumination
- Détection
- Aberrations et détérioration de l'image
- Résolution et acquisition d'image
- Amélioration des contrastes

Illumination

Sources de lumière



La source de lumière en microscopie de transmission a longtemps été le soleil ou une bougie. Elle est maintenant constitué d'une lampe halogène à filament de tungstène 12 V. L'illumination par LED blanches devient de plus en plus courante.



Illumination

Condenseur

La fonction du condenseur est de concentrer la lumière sur l'objet.

Les microscopes d'initiation sont le plus souvent dépourvus de condenseur, auquel est substitué un miroir concave ou des LEDs blanches.

Le champ éclairé par le condenseur doit être uniforme.

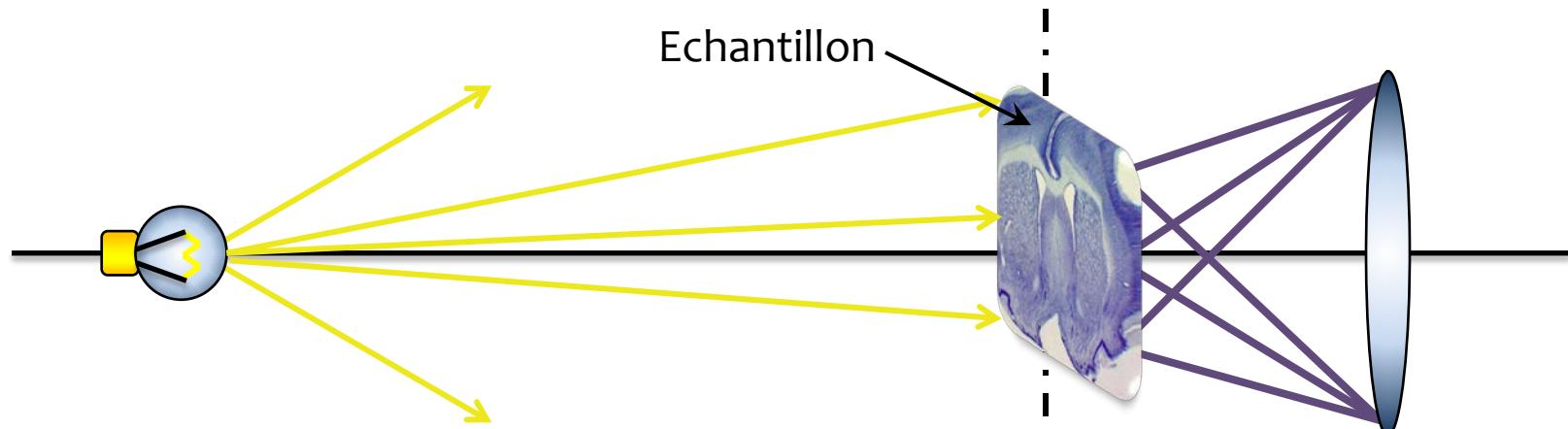
L'ouverture numérique du condenseur joue sur la qualité de l'illumination de l'objet.

Idéalement, elle devrait correspondre à celle de l'objectif (il existe des condenseurs à immersion pour les objectifs d'ON >1)



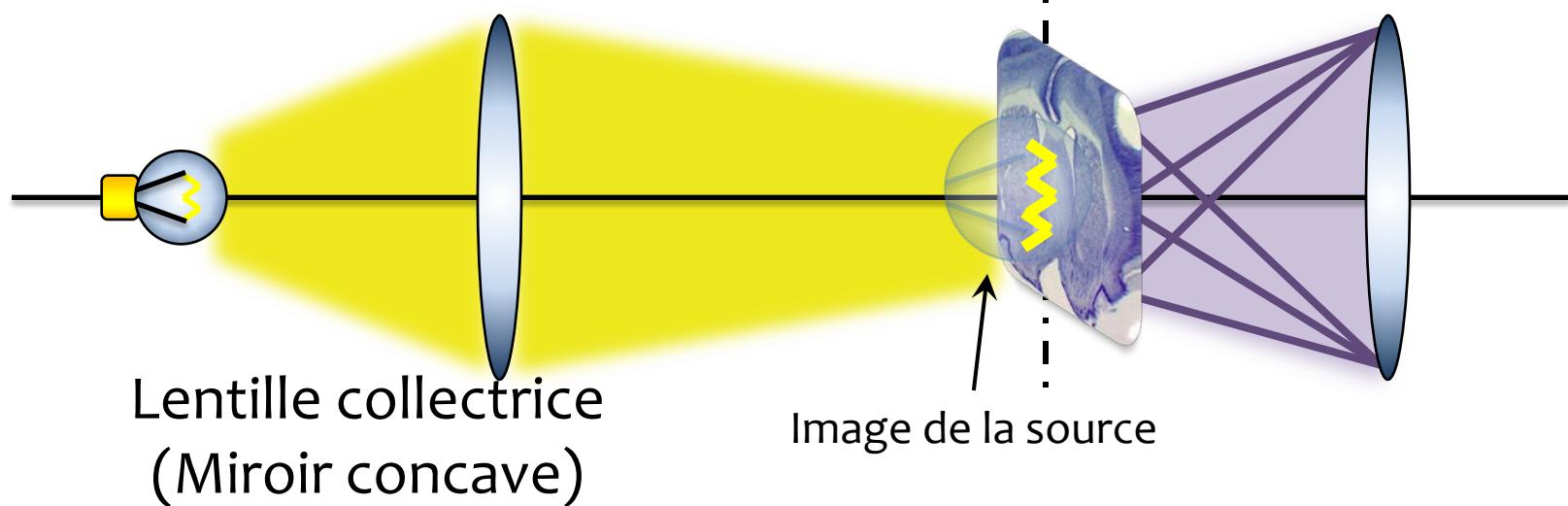
Illumination

Illumination critique



Source
lumineuse

Plan objet Objectif



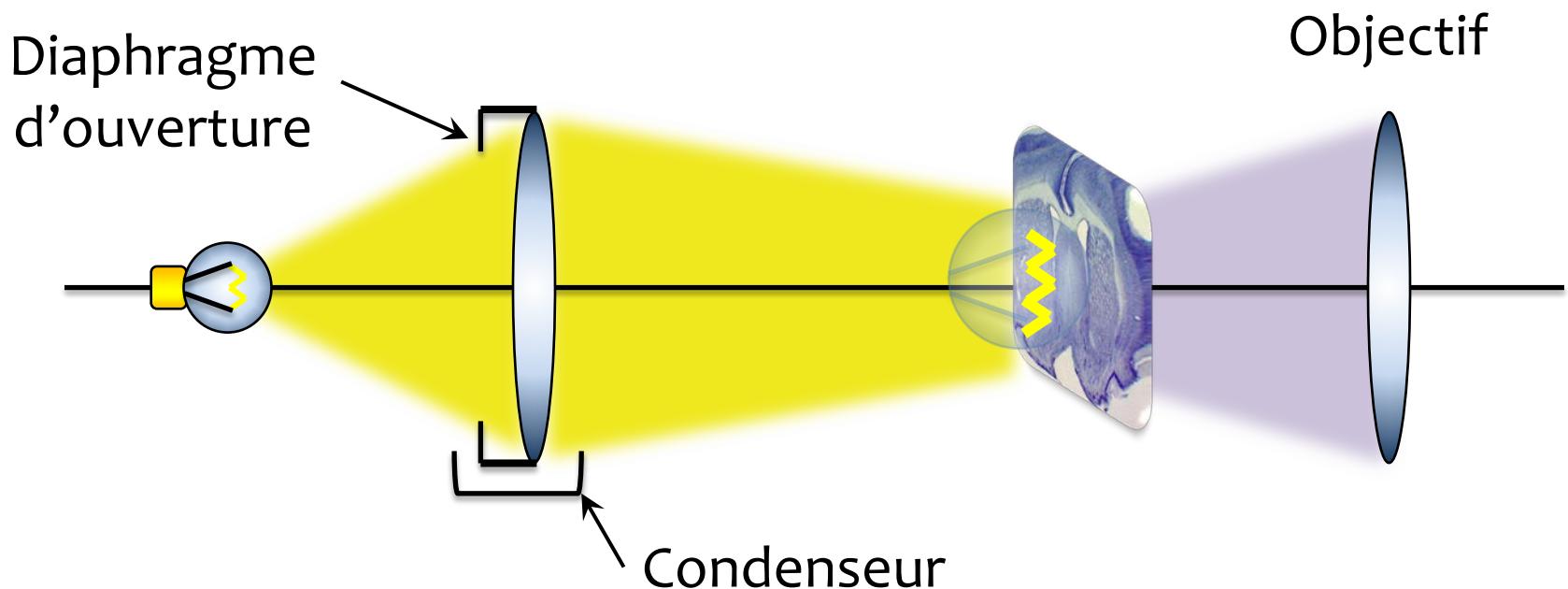
Lentille collectrice
(Miroir concave)

Image de la source

Illumination

Illumination critique

C'est la méthode la plus simple. Elle consiste à focaliser la lumière de la source sur l'objet. L'inconvénient majeur est que la source n'est généralement pas homogène et par conséquent, l'échantillon ne sera pas éclairé uniformément ce qui induit des aberrations tels que des effets de bords (bords sombres). C'est la méthode de choix pour les faibles éclairements (flamme, soleil, lampe).

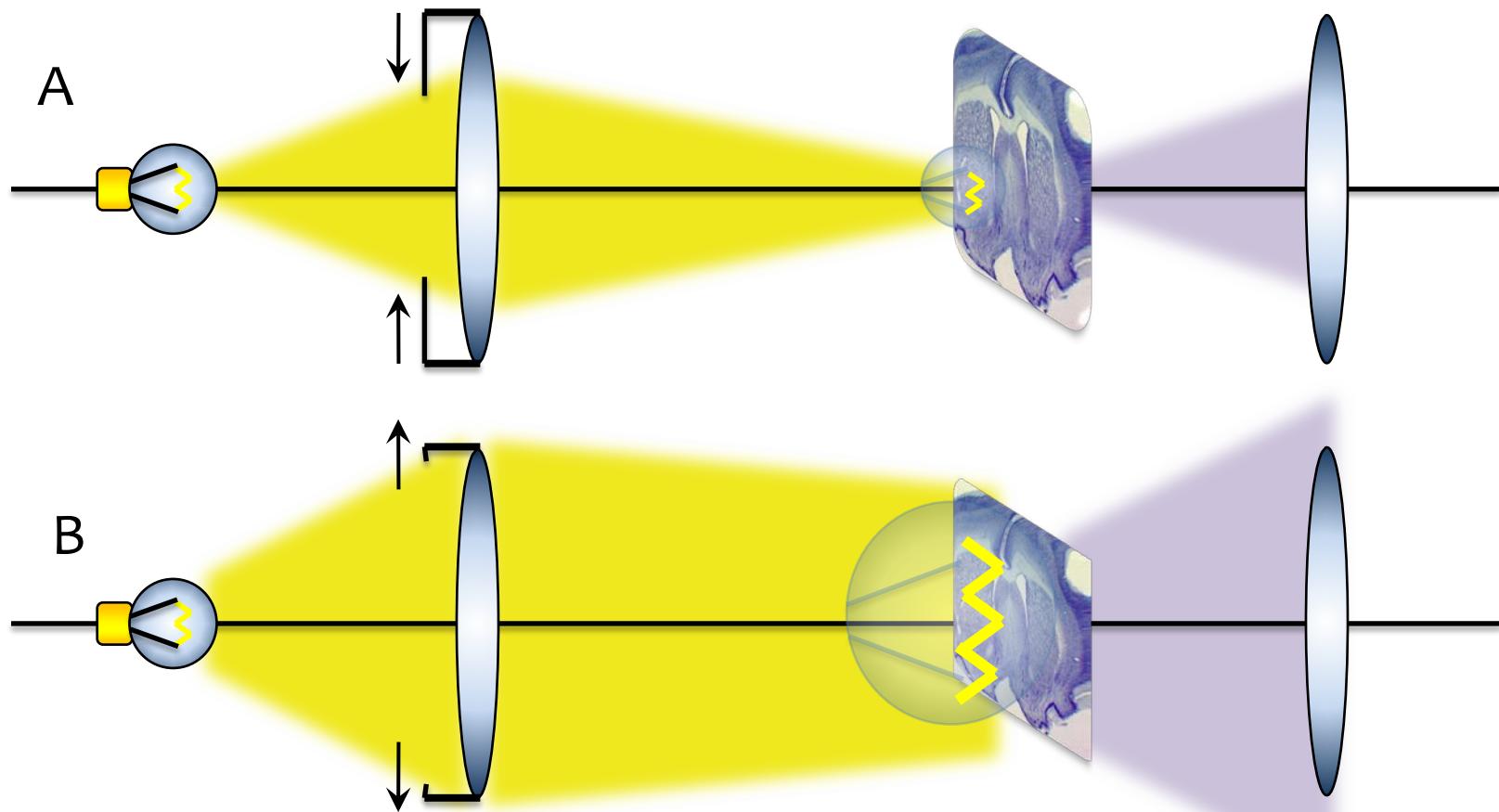


Illumination

Illumination critique

Mauvais réglages du diaphragme d'ouverture du condenseur :

- A) la pupille d'entrée de l'objectif n'est pas entièrement couverte (perte de résolution) ou B) toute la lumière n'entre pas (perte de luminosité et de contraste).



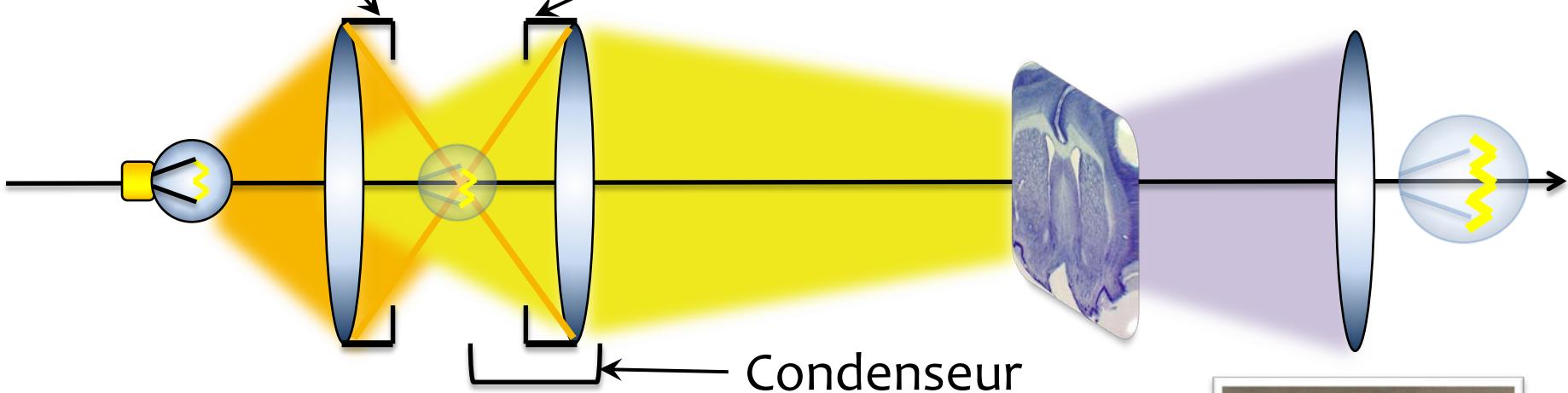
Illumination

Illumination de Köhler

Diaphragme de champs

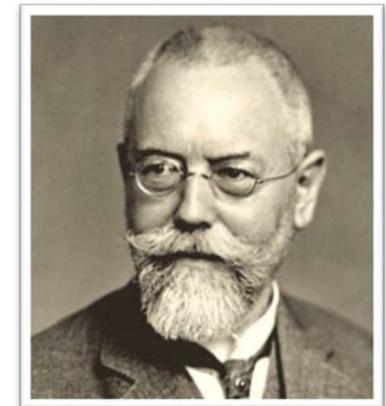
Diaphragme d'ouverture

Objectif



Réglage essentiel:

- assure un éclairage homogène de la préparation
- contribue à l'obtention de la meilleure résolution latérale
- intervient sur la profondeur de champ et le contraste de l'image



August Köhler
(1866-1948)

Illumination

Disposition des diaphragmes

Boîtier lumière
transmise à
lampe halogène

Diaphragme de
champ

Vis de centrage
du condenseur

Diaphragme
d'ouverture

Condenseur

Filtres gris
(densités
neutres) et/ou
colorés

Mise au point
axiale du
condenseur

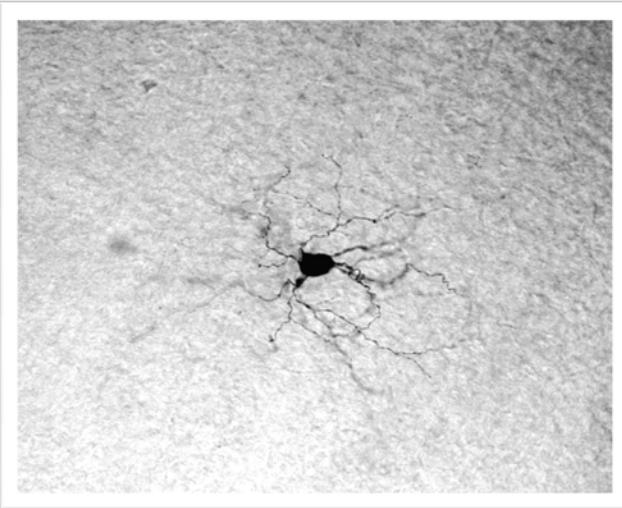


Microscope
inversé

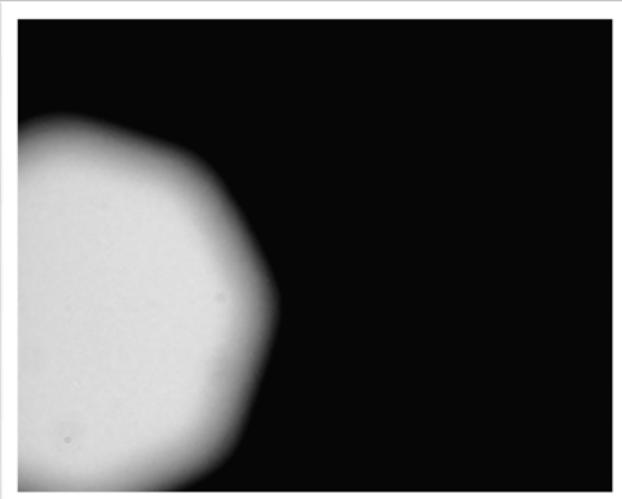
Illumination

Réglages de Köhler (à faire pour chaque objectif)

1) Mettre au point sur une préparation à faible grossissement, les deux diaphragmes grands ouverts.



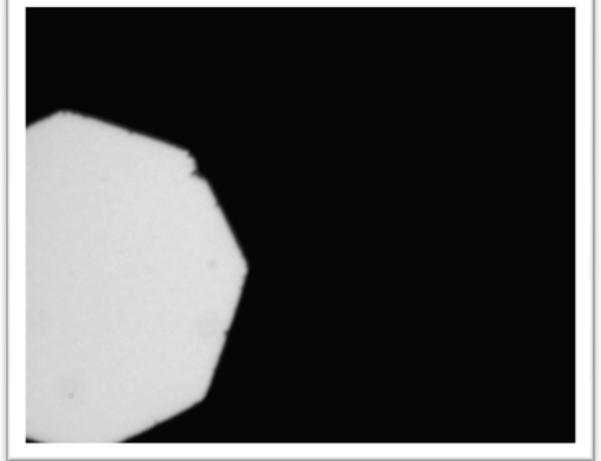
2) En dehors de l'échantillon, fermer le diaphragme de champ pour visualiser une tache lumineuse polygonale, floue et non centrée.



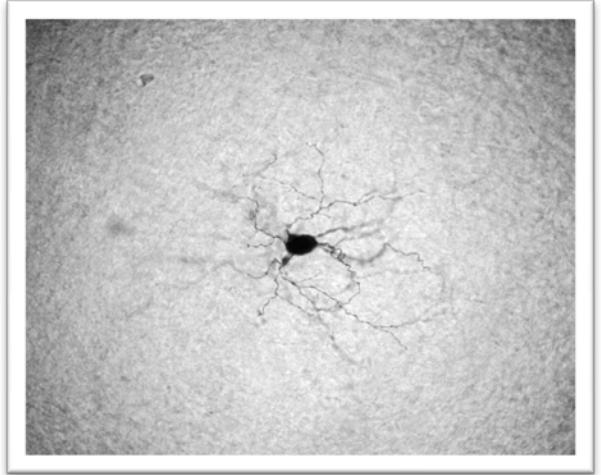
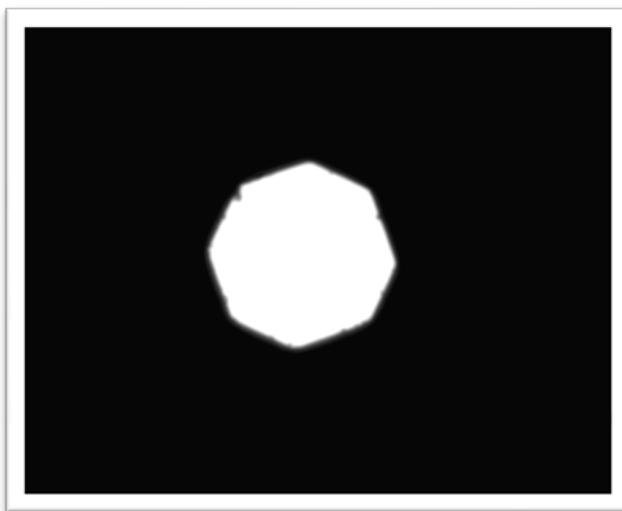
Illumination

Réglages de Köhler

3) Rendre nette cette tâche en jouant sur la hauteur du condenseur (bords polygonaux)



4) Centrer ce polygone dans le champ à l'aide des vis de centrage du condenseur



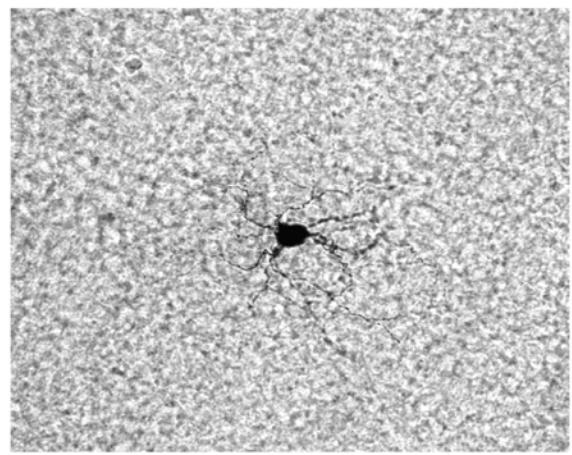
Illumination

Réglages de Köhler

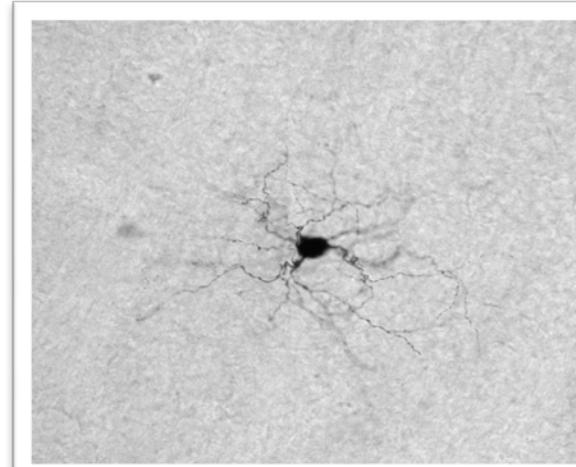
- 5) Ouvrir le **diaphragme de champ** jusqu'à la limite de perception dans l'oculaire (tangential) pour vérifier le centrage puis l'ouvrir un peu plus.
- 6) Fermer légèrement le **diaphragme d'ouverture** si besoin est, pour contraster.



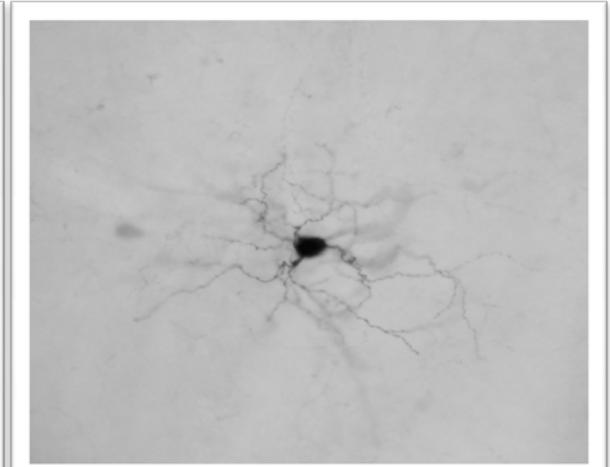
fermé



médian

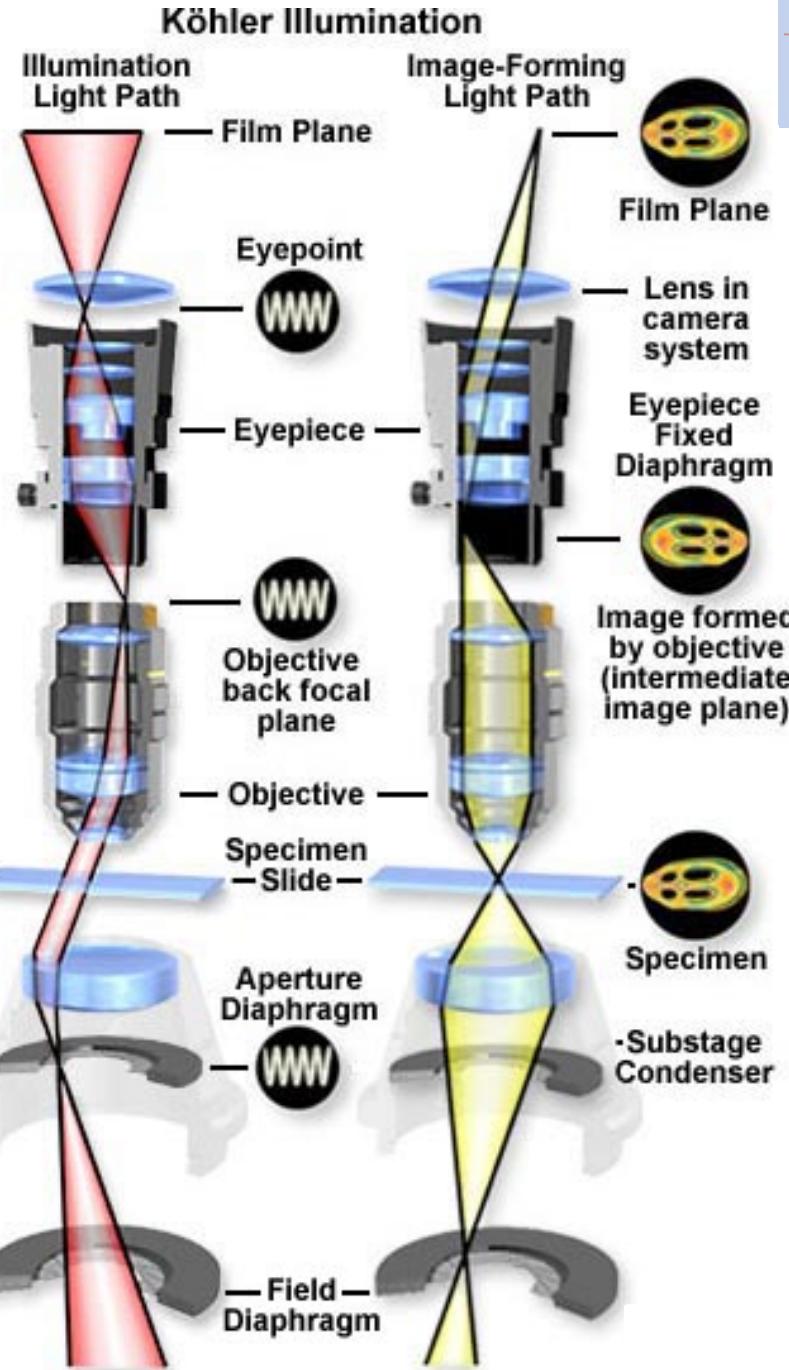


ouvert



Illumination

illumination { détection }



Trajet optique

Réglage optimal de

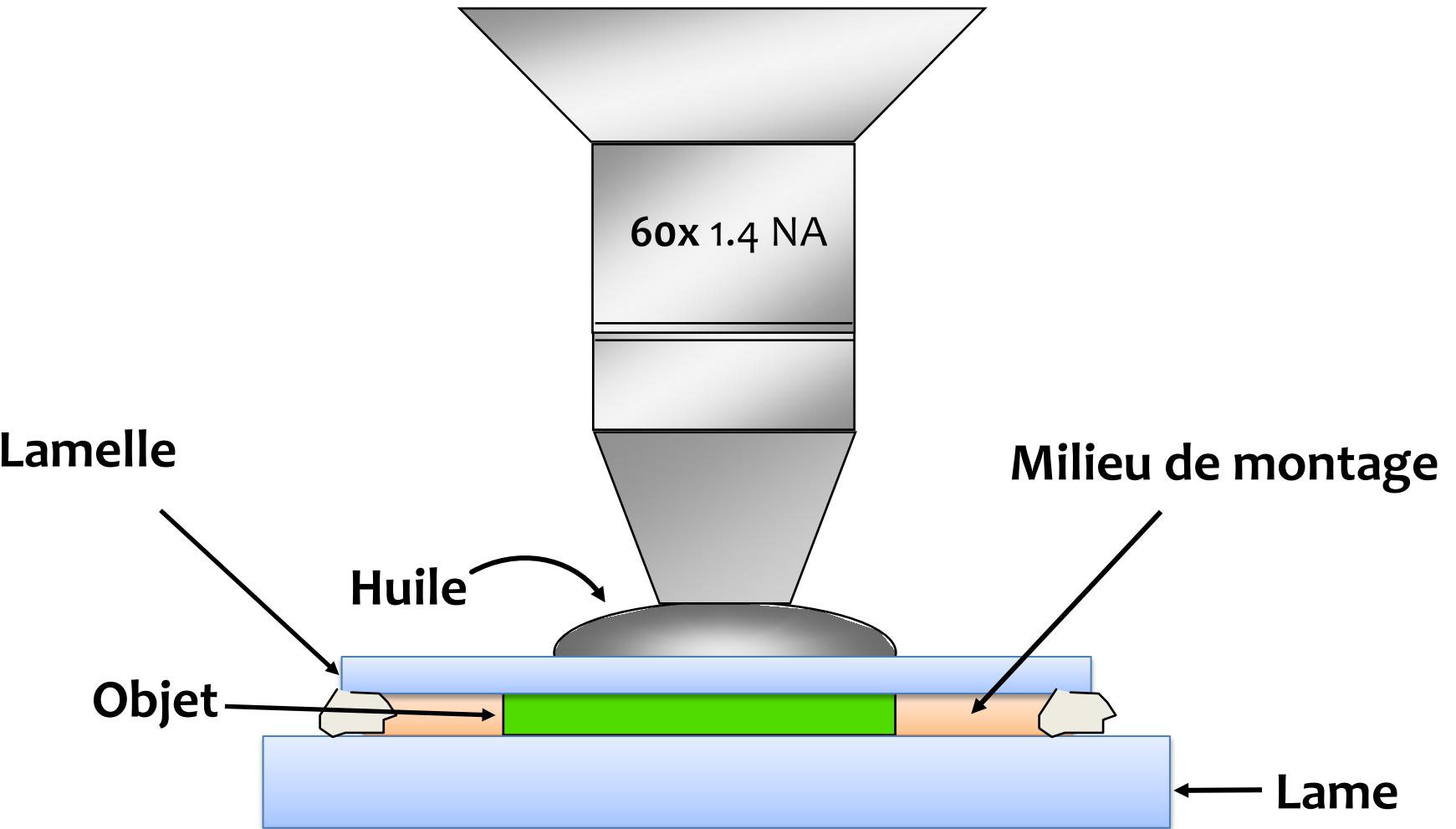
- lampe + collecteur
- diaphragmes
- condenseur
- objectif
- oculaires

Ce qui vous attend

- ✓ Généralités
- ✓ Illumination
- Détection
- Aberrations et détérioration de l'image
- Résolution et acquisition d'image
- Amélioration des contrastes

Détection

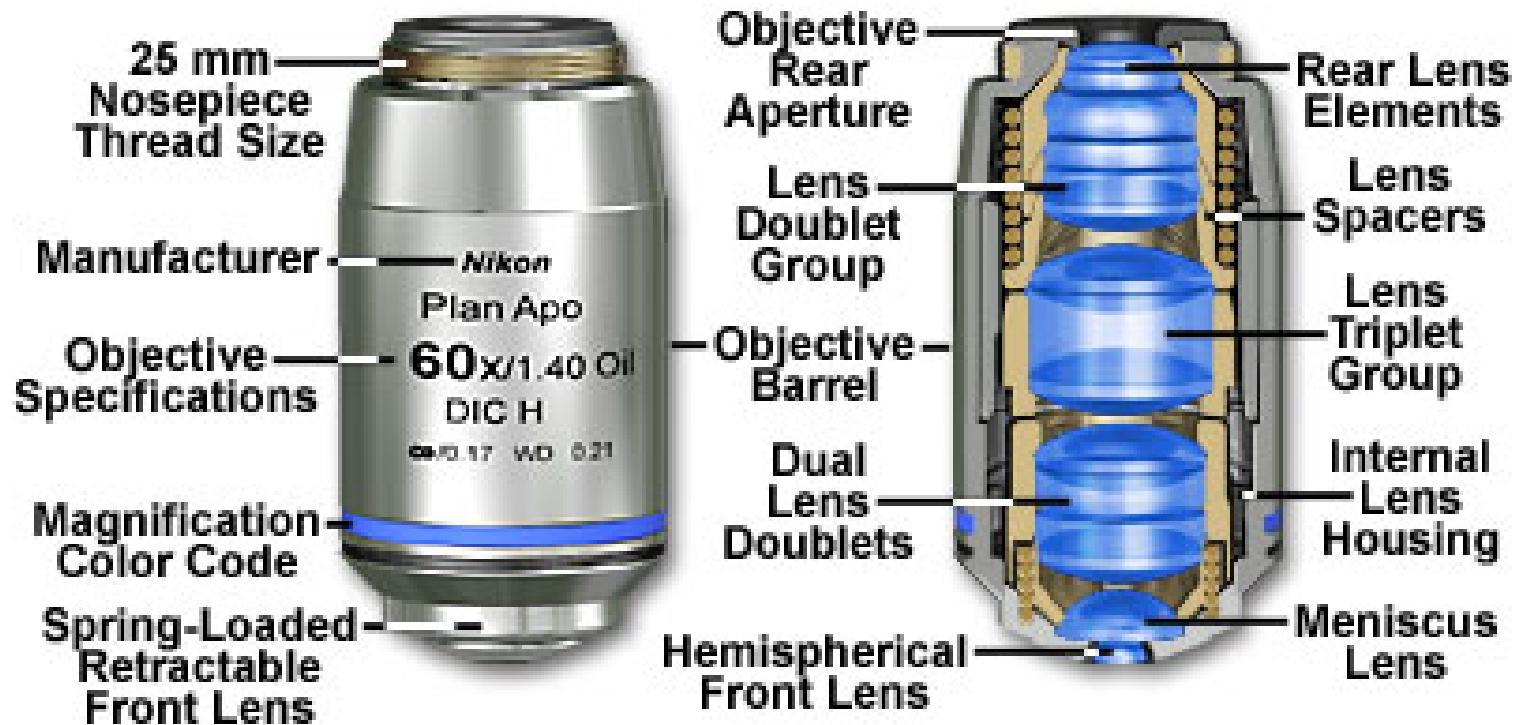
Objectifs



Détection

Objectifs

Objet complexe, fragile et couteux (de 500 à plus de 20 000 €), central dans la chaîne optique, sa qualité (sa propreté) et ses caractéristiques influent directement sur l'image obtenue.



Détection

Caractéristiques techniques des objectifs

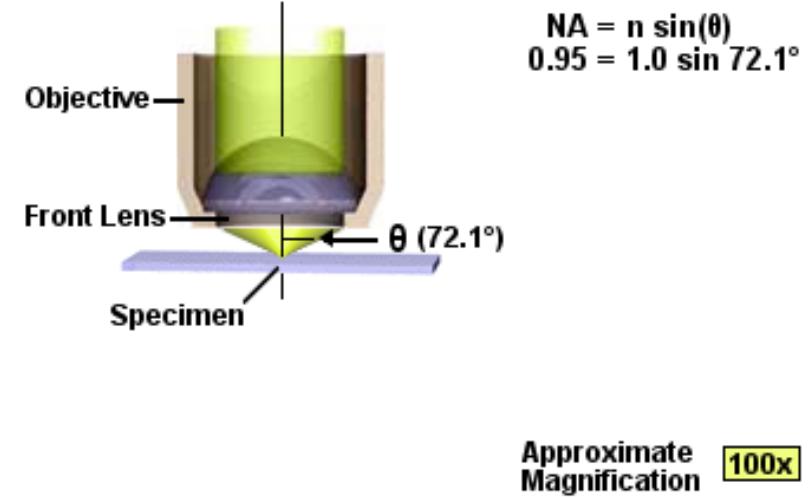
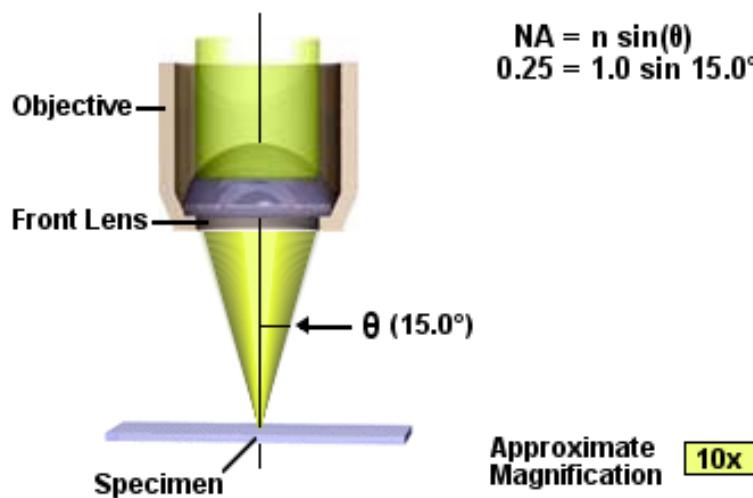
- Marques : incompatibles entre elles (vissage, optiques, corrections...)
- Grandissement : de 2.5 à 150X faites votre choix (code couleur, zoom...)
- Ouverture numérique : résolution, luminosité...
- Milieu(x) d'immersion : sec, eau, huile (ON_{max} respective : 0.95 – 1.2– 1.47)
- Type (corrections des aberrations) : planéité, chromaticité...
- Propriétés optiques spéciales : contraste de phase, DIC...
- Épaisseur de lamelle : normalement 170 µm (réglable quelquefois, attention aux microscopes inversés (pétri = plastique épais))
- Distance de travail : de la lentille d'entrée de l'objectif au point focal (de 150 µm à plusieurs millimètres) *
- Profondeur de champs : épaisseur de la "coupe optique", dépend de l' ON^*

* Non indiqué sur l'objectif

Détection

Ouverture numérique

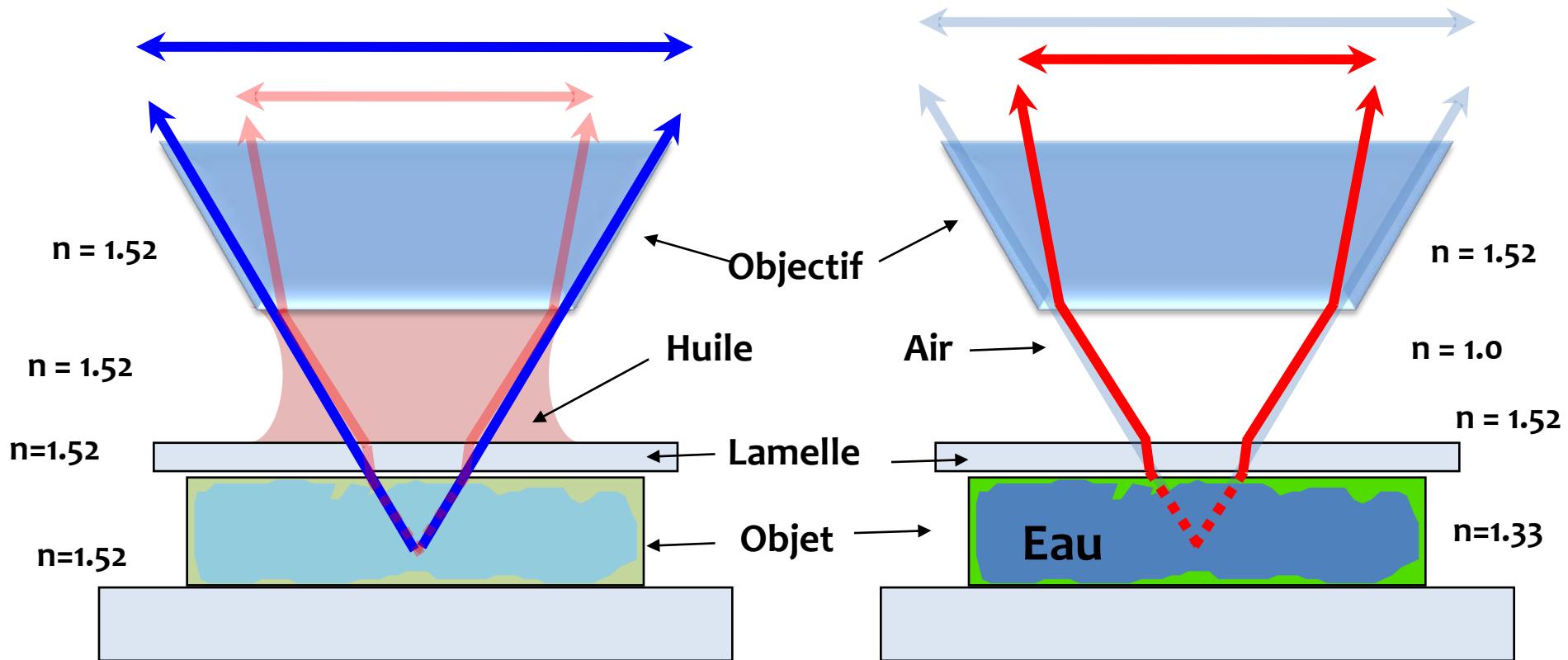
- L’Ouverture Numérique : $ON=n.\sin(\theta)$ où n est l’indice optique et θ le demi-angle du cône de détection (Numerical Aperture : NA).
- L’ON n’est pas liée au grossissement, il y a des ON fortes à faible grossissement comme le 20X sec Zeiss de 0,8 ou des 20X immersion eau Olympus 0,95 et plus récemment Zeiss et Leica de 1,05 d’ON.
- Plus l’ON est grande, meilleure est la résolution ($Res_{(nm)} = 0.61 \lambda/ON$)
- Une mauvaise illumination induit une ON dégradée.



Détection

Milieux d'immersions : n dans la pratique

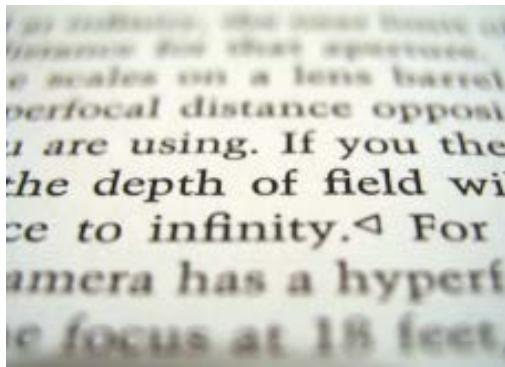
L'inhomogénéité des indices réduit le pouvoir résolutif du microscope et peu induire des aberrations chromatiques ou autres ($n=f(\lambda\dots)$)



Détection

Profondeur de Champ

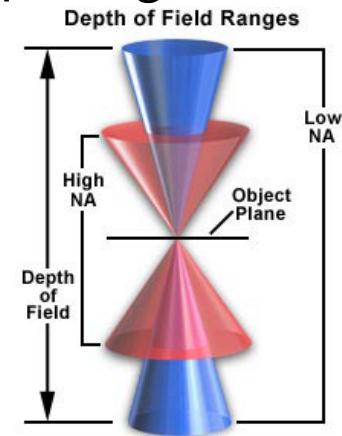
Distance entre le point le plus haut et le point le plus bas de la préparation qui donne une image nette (épaisseur de la tranche optique).



Dépend de l'ouverture numérique : la profondeur de champ diminue lorsque l'ouverture numérique augmente.

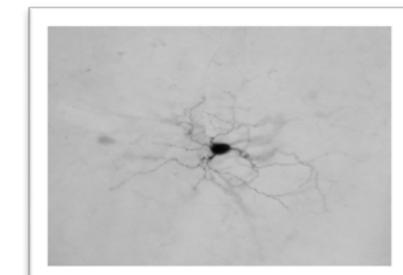
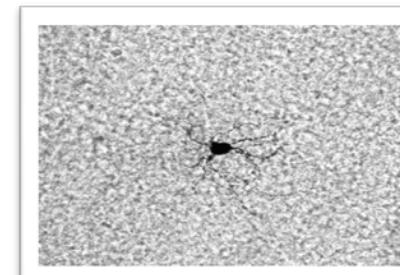
$$PdC = \frac{n\lambda}{ON^2}$$

Ex. à 488 nm : **5,4 µm** pour un objectif **sec x10 (ON 0,3)**
0,378 µm à l'objectif x63 à immersion **huile (ON 1,4)**



L'ON d'un microscope en transmission dépend des ON de l'objectif mais aussi du condenseur : le diaphragme d'ouverture limite le cône d'illumination et donc l'ON.

Fermé (fort contraste) Ouvert (forte résolution)



Ce qui vous attend

- ✓ Généralités
- ✓ Illumination
- ✓ Détection
- Aberrations et détérioration de l'image
- Résolution et acquisition d'image
- Amélioration des contrastes

Aberrations et détérioration de l'image

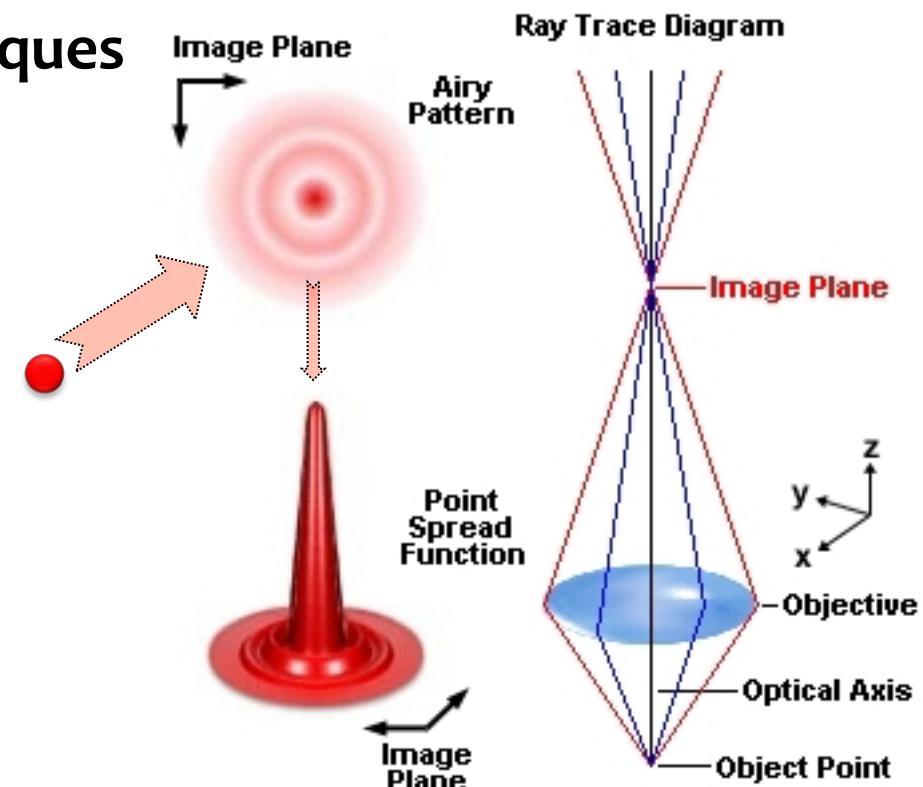
Les aberrations optiques sont des écarts aux conditions de Gauss

- **Aberrations monochromatiques**

- Sphérique
- Coma
- Astigmatisme
- Courbure de champs
- Distorsion

- **Aberrations chromatique**

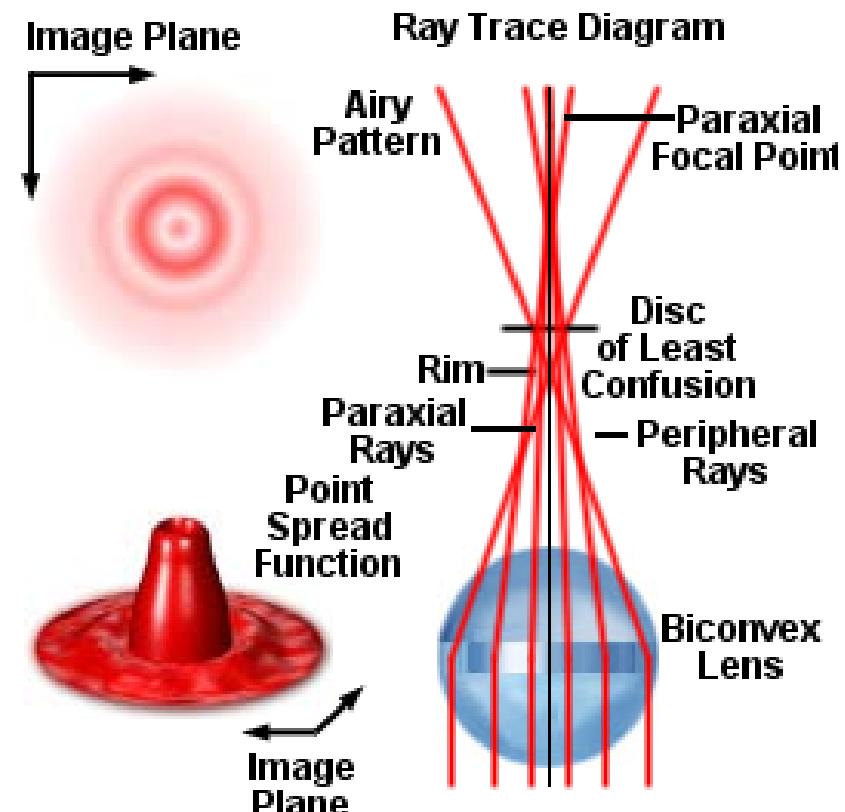
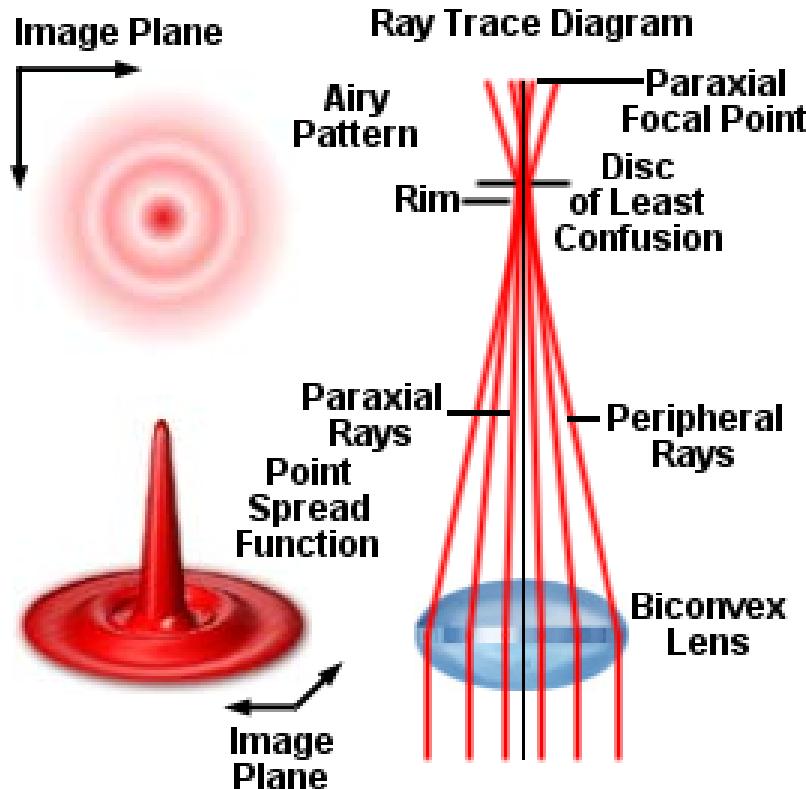
- Longitudinale
- Latérale



L'image d'un point n'est pas un point !
On y reviendra plus tard...

Aberrations et détérioration de l'image

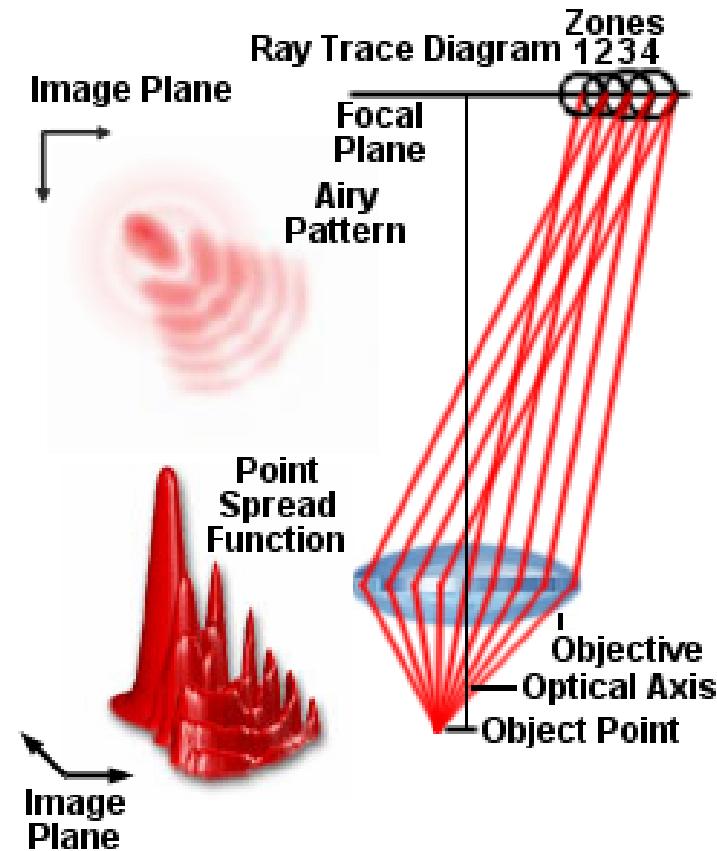
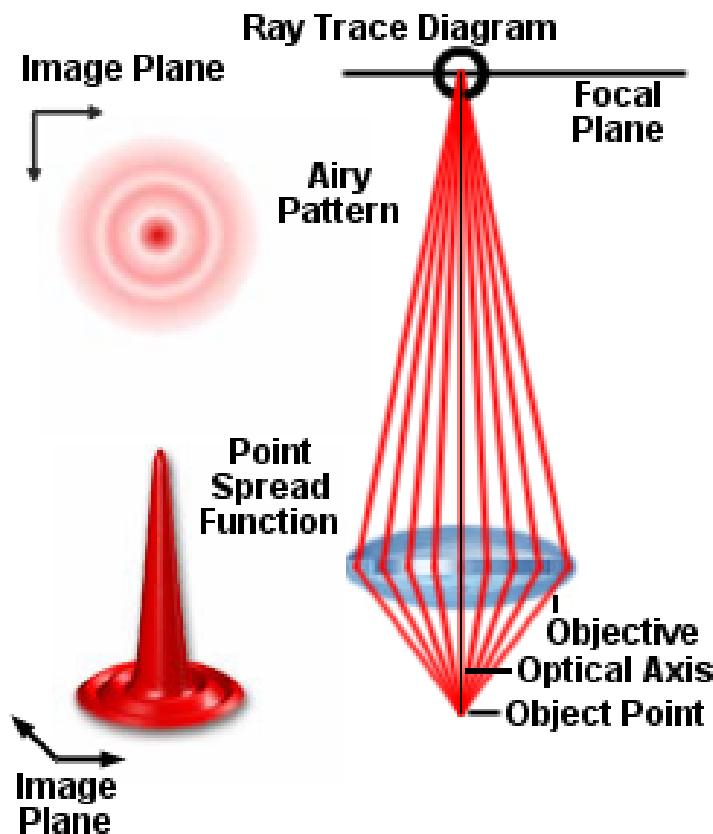
Sphériques



Les rayons lumineux qui passent à la périphérie ne convergent pas au même endroit que les rayons qui passent au voisinage de l'axe.

Aberrations et détérioration de l'image

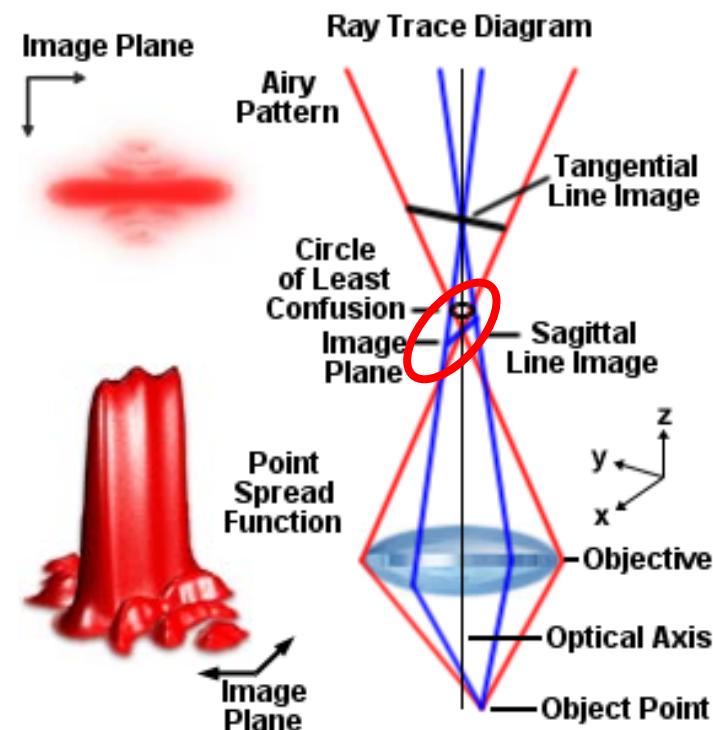
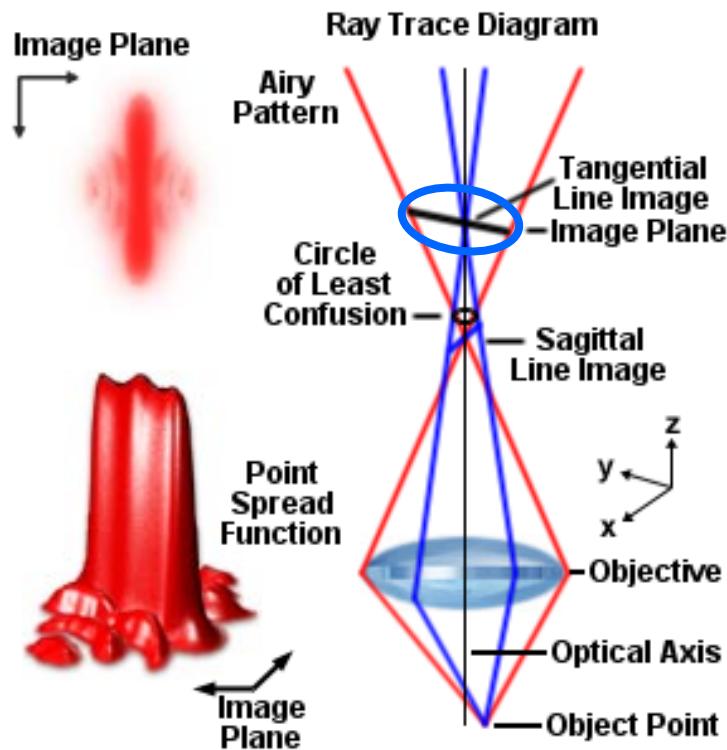
Coma



L'image d'un point lorsque la lentille n'est pas perpendiculaire à l'axe optique (tilt) apparaît comme une comète.

Aberrations et détérioration de l'image

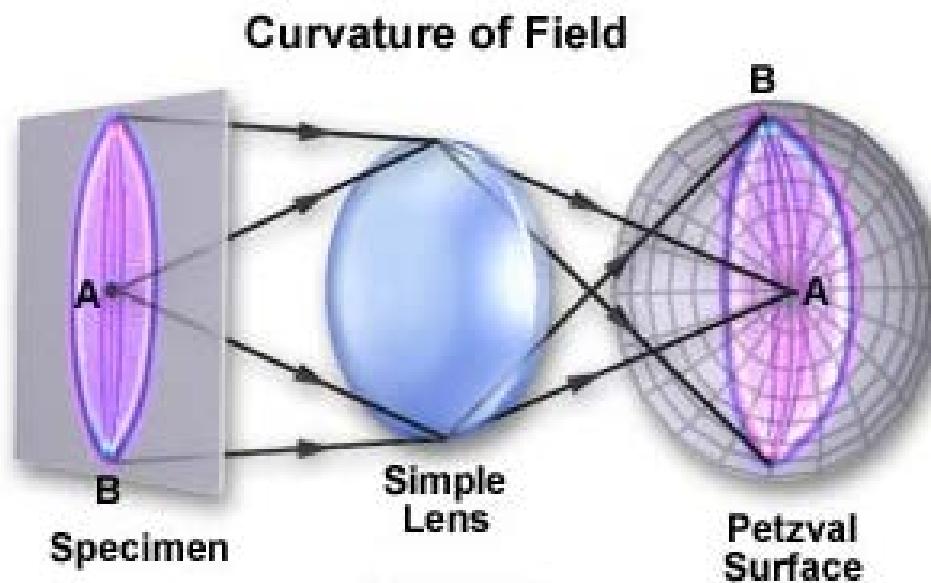
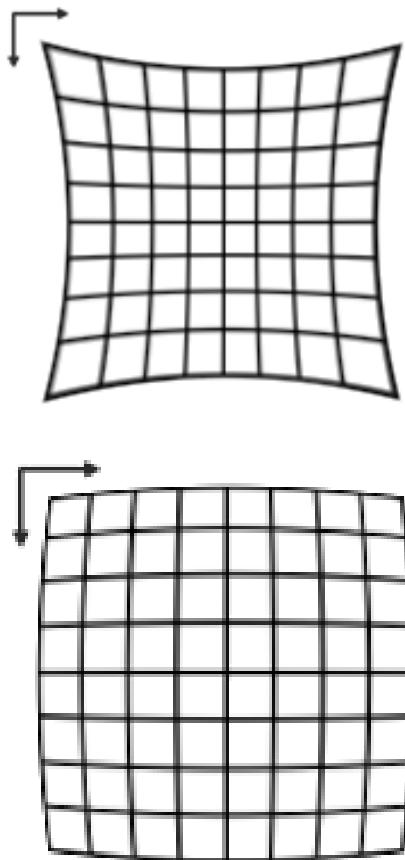
Astigmatisme



L'image d'un point hors axe apparaît comme un bâtonnet;
Il y a deux foyers dus à l'asymétrie du montage.

Aberrations et détérioration de l'image

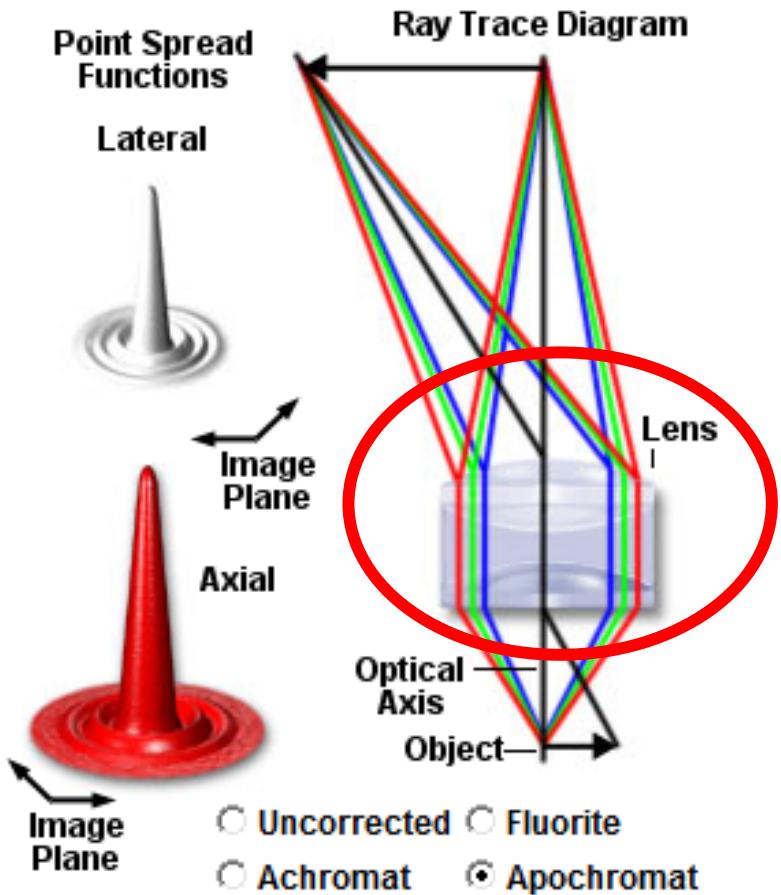
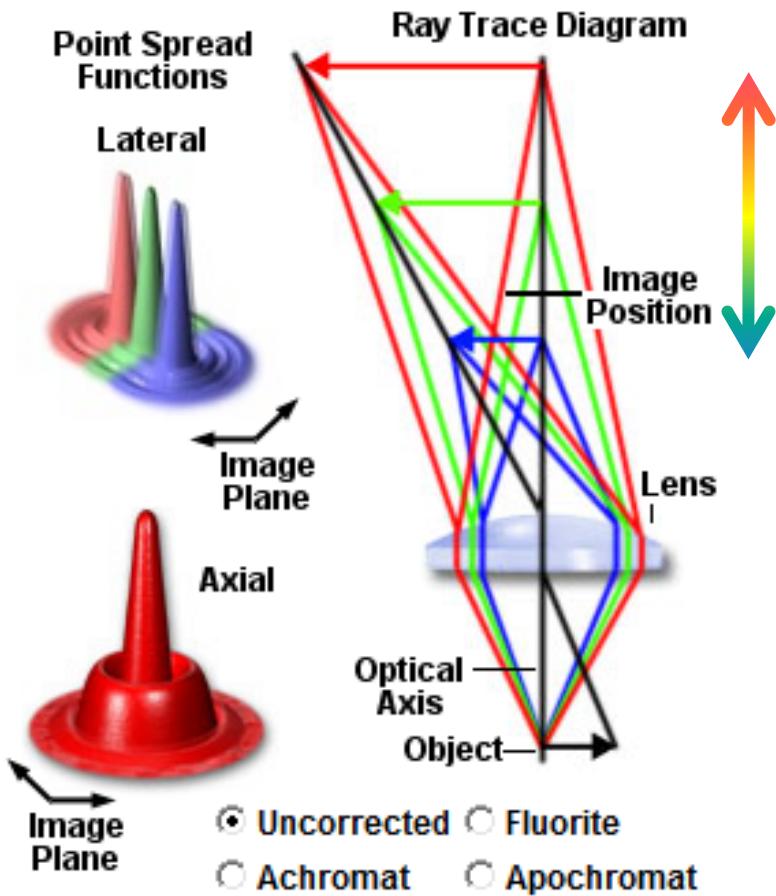
Géométriques / courbure de champs



L'image d'un plan n'est pas un plan, mais une surface sphérique concave (lentille convergente) ou convexe (lentille divergente).

Aberrations et détérioration de l'image

Chromatiques (axiales et latérales)

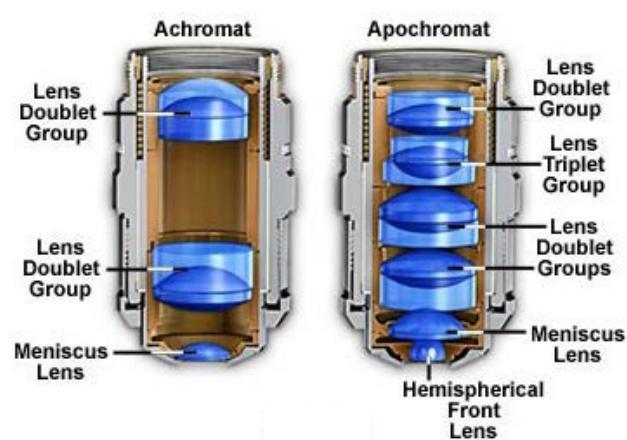


La distance focale d'une lentille dépend l'indice optique n et donc de λ .

Aberrations et détérioration de l'image

Correction des aberrations :

- limitation des bords des lentilles (diaphragme de champs, Gauss)
- lentilles non sphériques (difficiles à usiner, optique adaptative)
- association de lentilles de courbures différentes (doublet, triplet...).



| Type d'objectifs | Aberrations Sphériques | Aberrations Chromatique | Courbure de champs |
|------------------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| Achromat | 1 Couleur | 2 Couleurs | Non |
| Plan Achromat | 1 Couleur | 2 Couleurs | Oui |
| Fluorite | 2-3 Couleurs | 2-3 Couleurs | Non |
| Plan Fluorite | 3-4 Couleurs | 2-4 Couleurs | Oui |
| Plan Apochromat | 3-4 Couleurs | 4-5 Couleurs | Oui |

Toutes ces aberrations peuvent être corrigées par associations de lentilles et/ou traitement des surfaces :

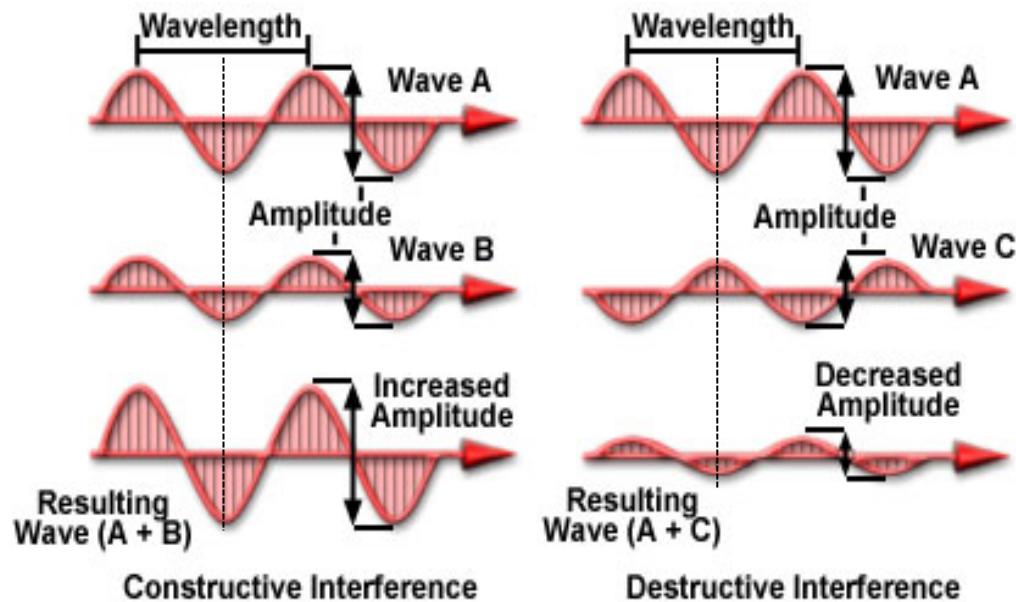
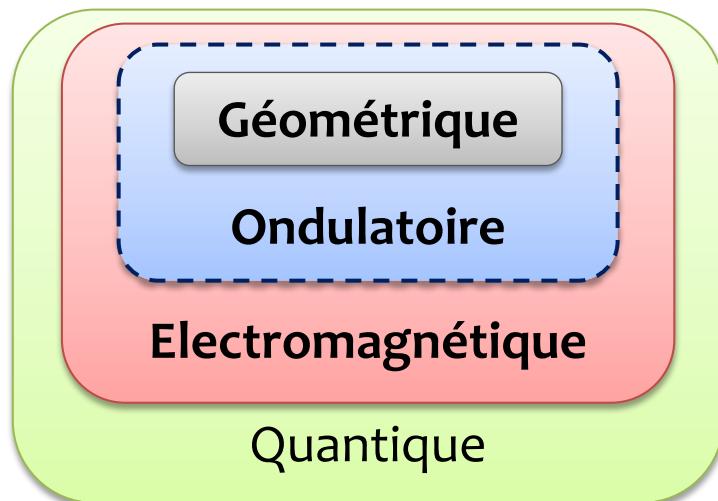
Les objectifs de microscope sont compliqués, fragiles et coûteux.

Ce qui vous attend

- ✓ Généralités
- ✓ Illumination
- ✓ Détection
- ✓ Aberrations et détérioration de l'image
- Résolution et acquisition d'image
- Amélioration des contrastes

Résolution et acquisition d'image

Interférences

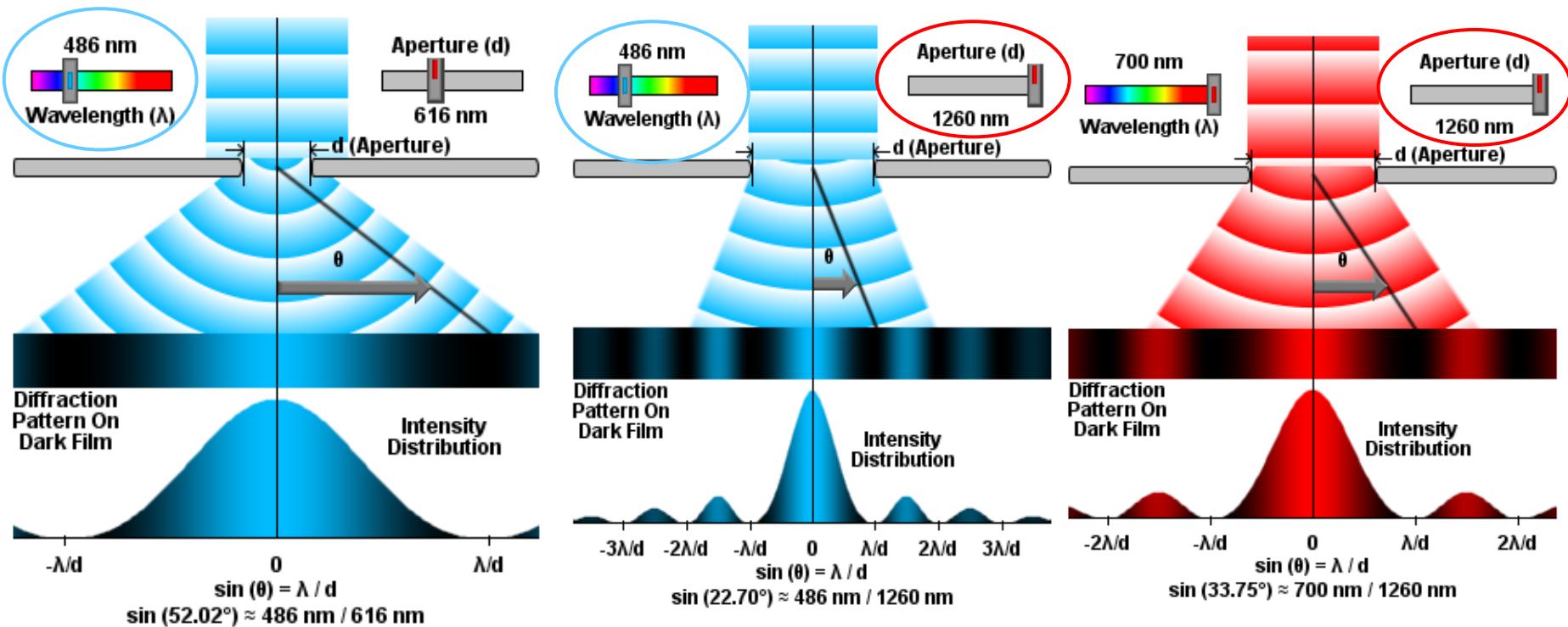


Chaque onde est caractérisée par une phase et une amplitude. Deux ondes peuvent se superposer si elles ont la même direction de propagation et le même plan de vibration, elles vont créer des interférences.

Résolution et acquisition d'image

Diffraction

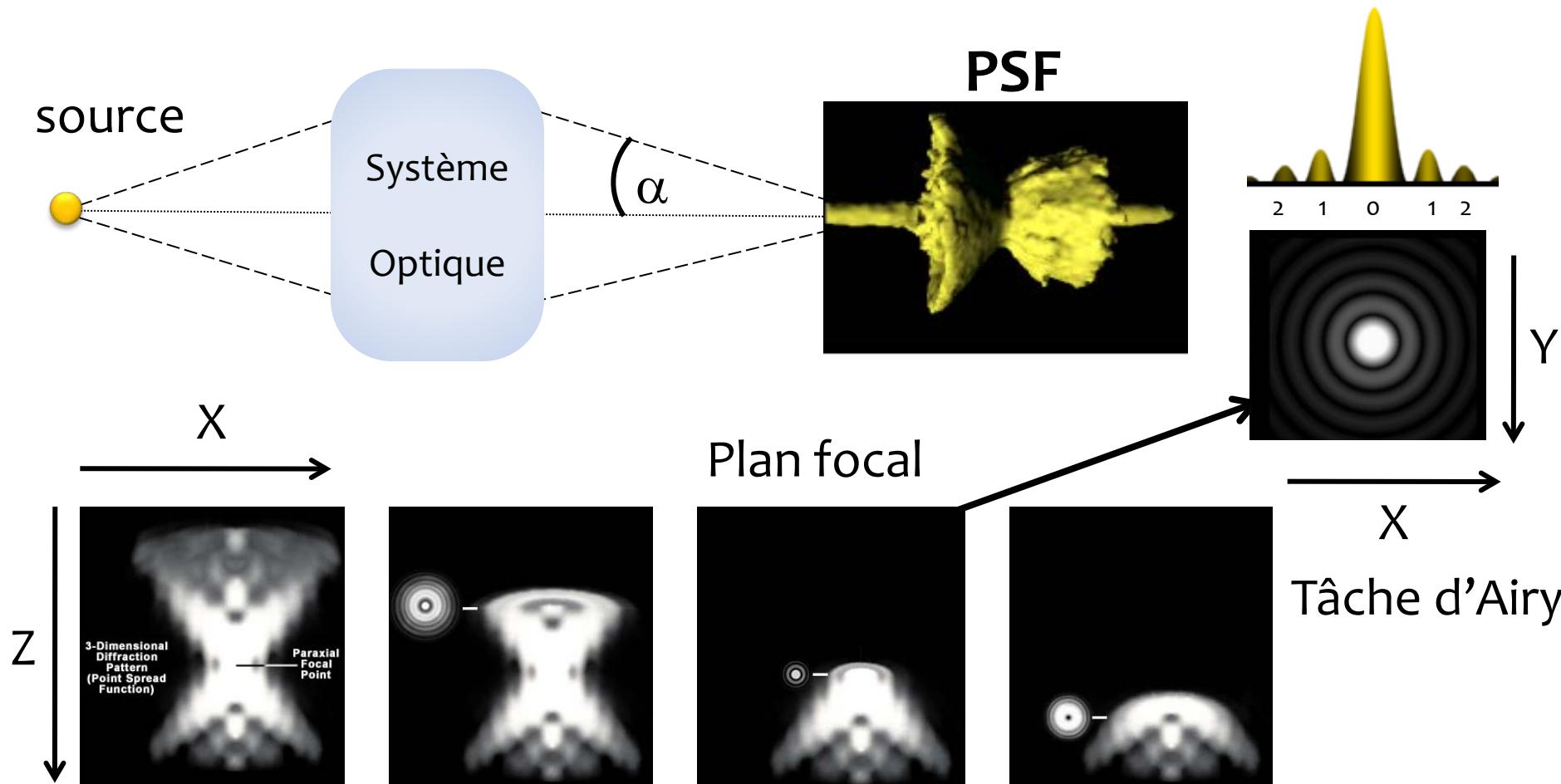
La lumière est diffractée quand elle rencontre un obstacle à sa propagation (exemple une ouverture), cela va changer sa phase et/ou son amplitude.



La diffraction de la lumière est variable en fonction de la taille de l'ouverture et de la longueur d'onde.

Résolution et acquisition d'image

Tout système optique dégrade l'image source à travers une Fonction de Dispersion d'un Point (PSF)



L'image d'un point n'est pas un point !

Résolution et acquisition d'image

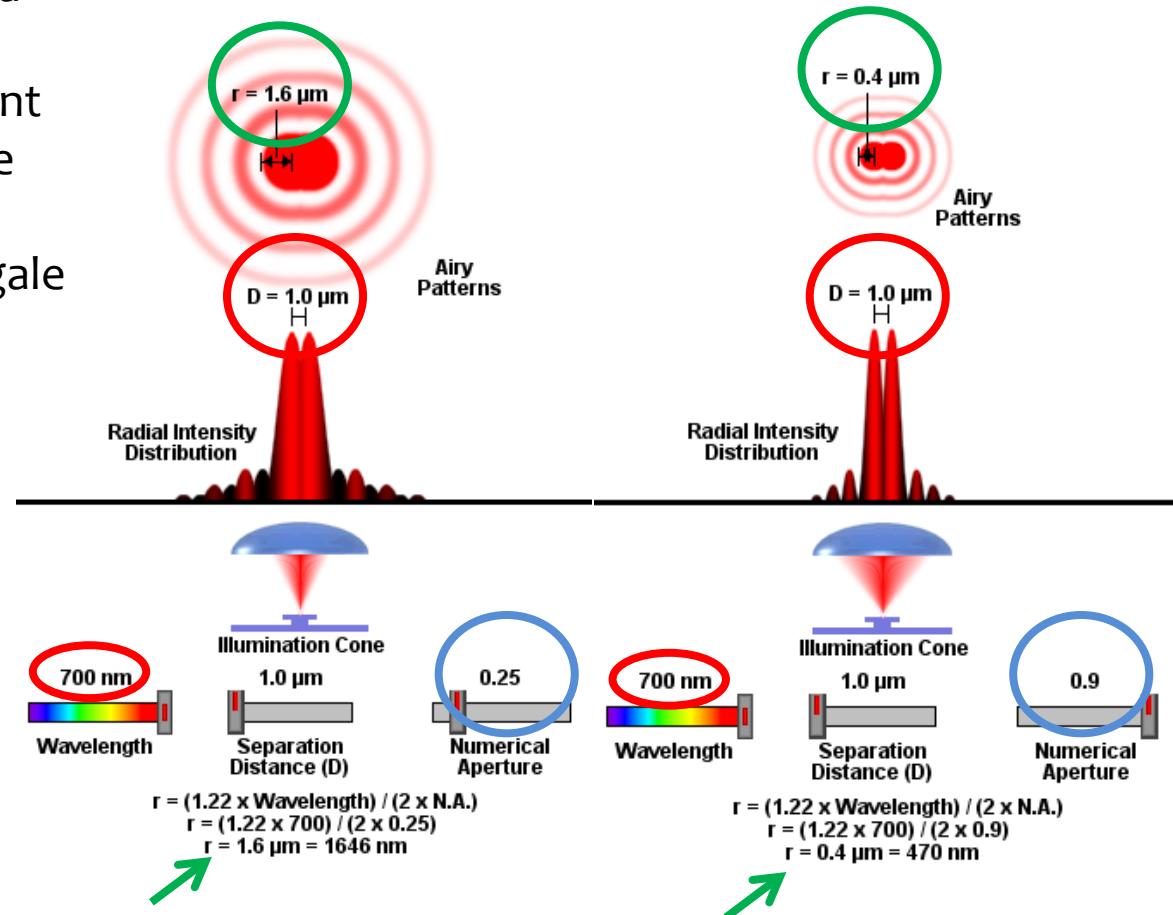
La **résolution optique** est la capacité d'obtenir l'image de deux points distincts en deux objets (PSF) individualisables.

Les deux tâches de Airy apparaîtront comme séparées uniquement si la différence de niveau entre leurs courbes d'énergie est suffisamment grande pour être discernée par le détecteur (œil, caméra...) donc séparés d'une distance au moins égale au rayon du disque d'Airy :

Critères de Rayleigh

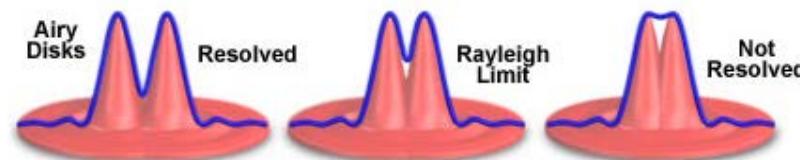
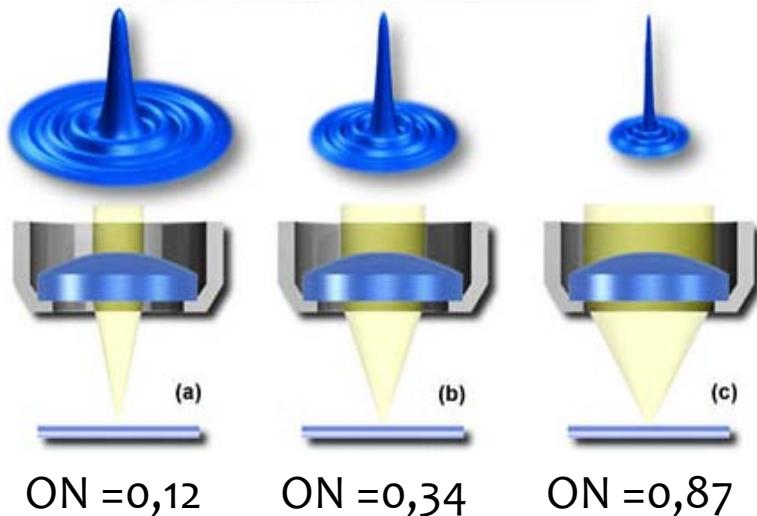
$$d \geq \frac{1,22\lambda}{ON(obj) + ON(cond)}$$

$$R_{fluo} = \frac{1,22\lambda}{2ON} = \frac{0,61\lambda}{ON}$$

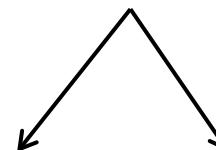


Résolution et acquisition d'image

La PSF et la résolution sont fonction de l'ON



La résolution dépend de l'ON
et non du grossissement

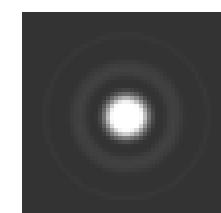
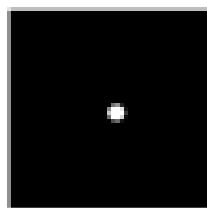


| A 488nm | 5X sec ON= 0.15 | 10X sec ON= 0.3 | 20X sec ON=0.8 | 40X huile ON=1.3 | 60X eau ON=1.2 | 60X huile ON=1.4 |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Résolution XY en μm | 1.984 | 0.992 | 0.372 | <u>0.229</u> | <u>0.248</u> | 0.212 |

Résolution et acquisition d'image

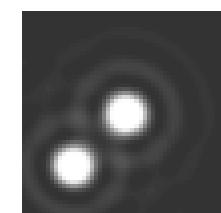
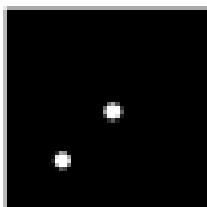
Construction de l'image

1 point

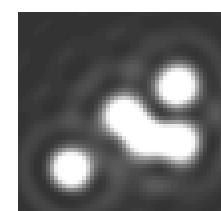
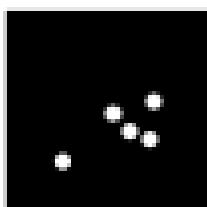


N points

2 points



5 points



Source

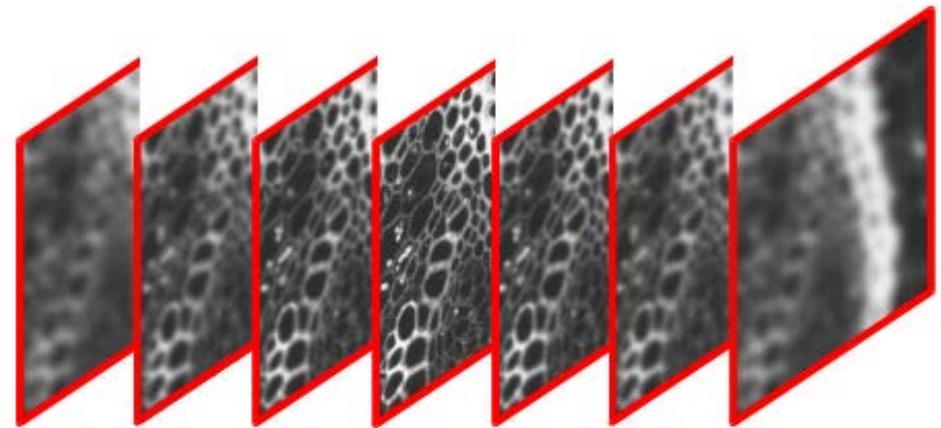
PSF



Résolution et acquisition d'image

Résolution axiale (théorique)

$$R_{xz} = \frac{2\lambda}{ON \sin \alpha} = \frac{n2\lambda}{ON^2}$$

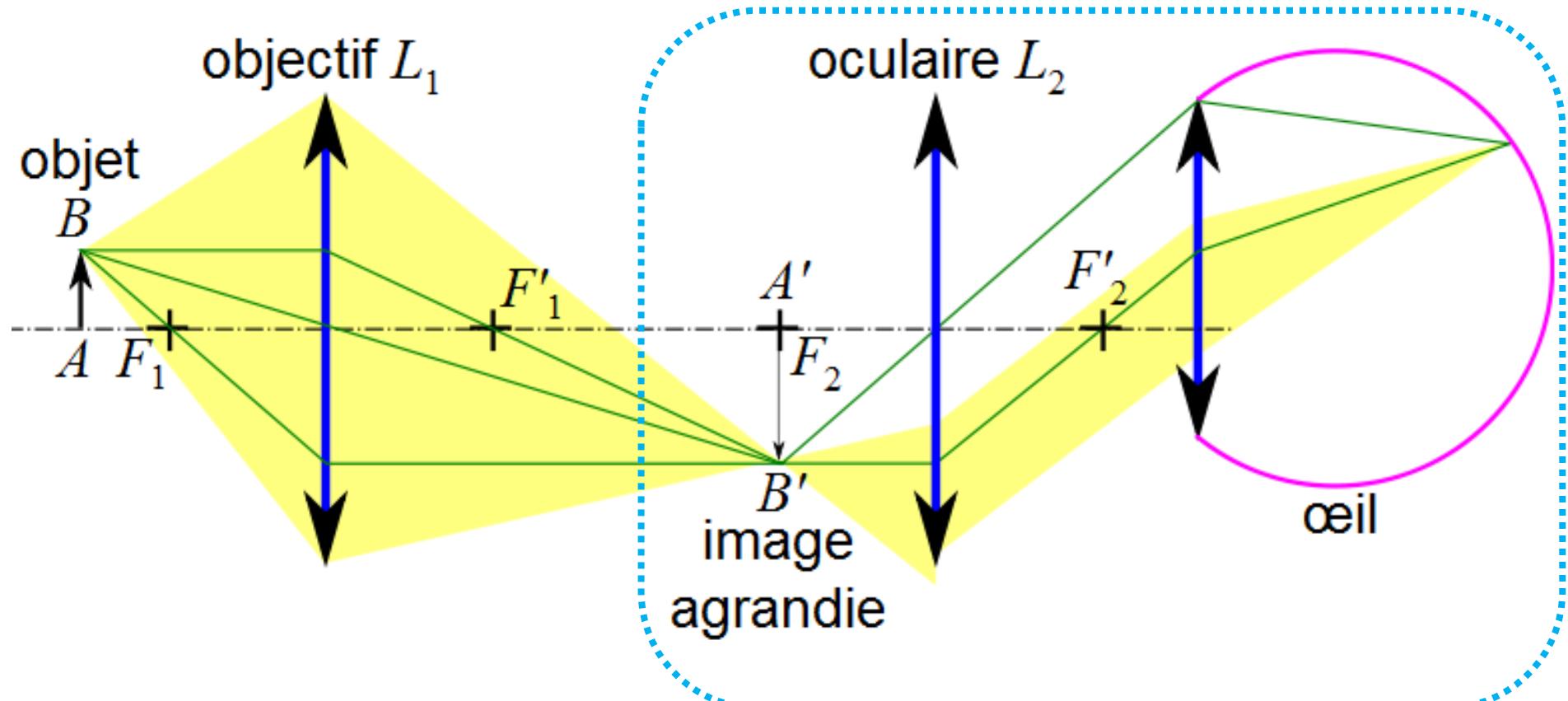


| Pour 488 nm | 5X sec ON= 0.15 | 10X sec ON= 0.3 | 20X sec ON=0.8 | 40X huile ON=1.3 | 60X eau ON=1.2 | 60X huile ON=1.4 |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Résolution XZ en μm | 43.378 | 10.844 | 1.525 | 0.878 | 0.901 | 0.757 |
| α | 8.6° | 17.5° | 53.1° | 58.8° | 64.5° | 67.1° |

Pour mémoire $\alpha = \sin^{-1}\left(\frac{ON}{n}\right)$

Résolution et acquisition d'image

Détection



Dans un microscope l'image que l'on observe est un agrandissement de l'image virtuelle issue de l'objectif (2 étapes).

Résolution et acquisition d'image

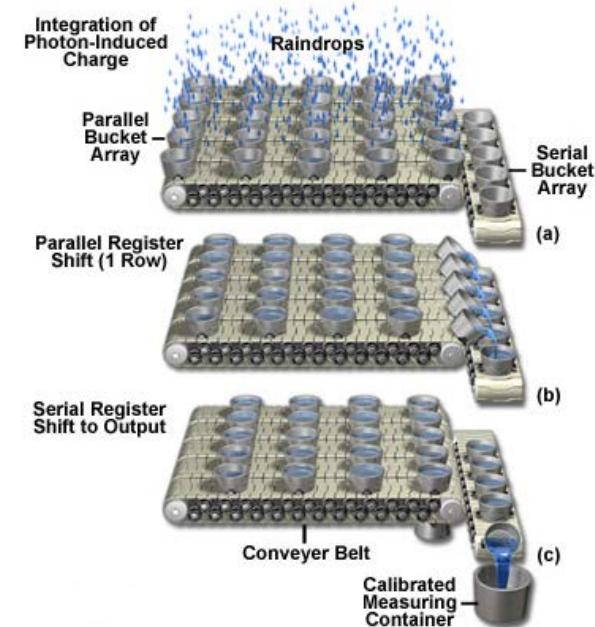
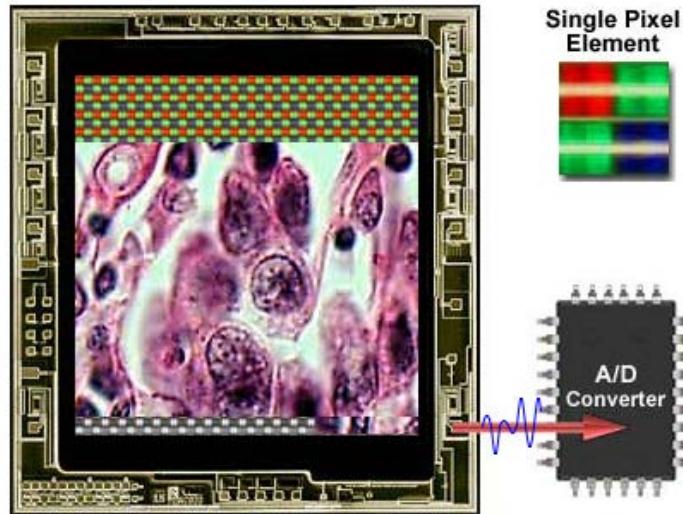
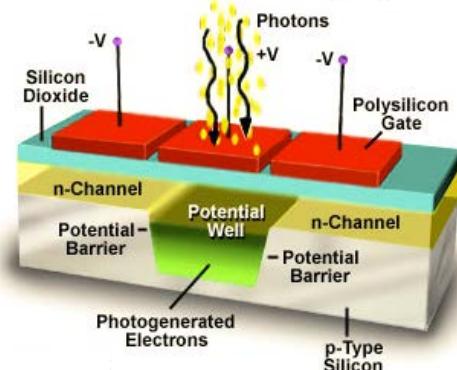
Oculaires

- Essentiellement une fonction de lentille de projection avec un grossissement de 5x à 20x.
- On ajuste la distance inter-pupillaire à sa morphologie, de même chaque oculaire doit être réglé à sa propre vue.
- L'image est nette à +/- 1 cm de la lentille de sortie (les œilletons en caoutchoucs servent à créer cet espace et éviter de salir la lentille).
- On peut ajouter dans le trajet optique des filtres ou des grilles de positionnement ou de comptage.



Résolution et acquisition d'image

Caméras CCD (Charged Coupled Device)

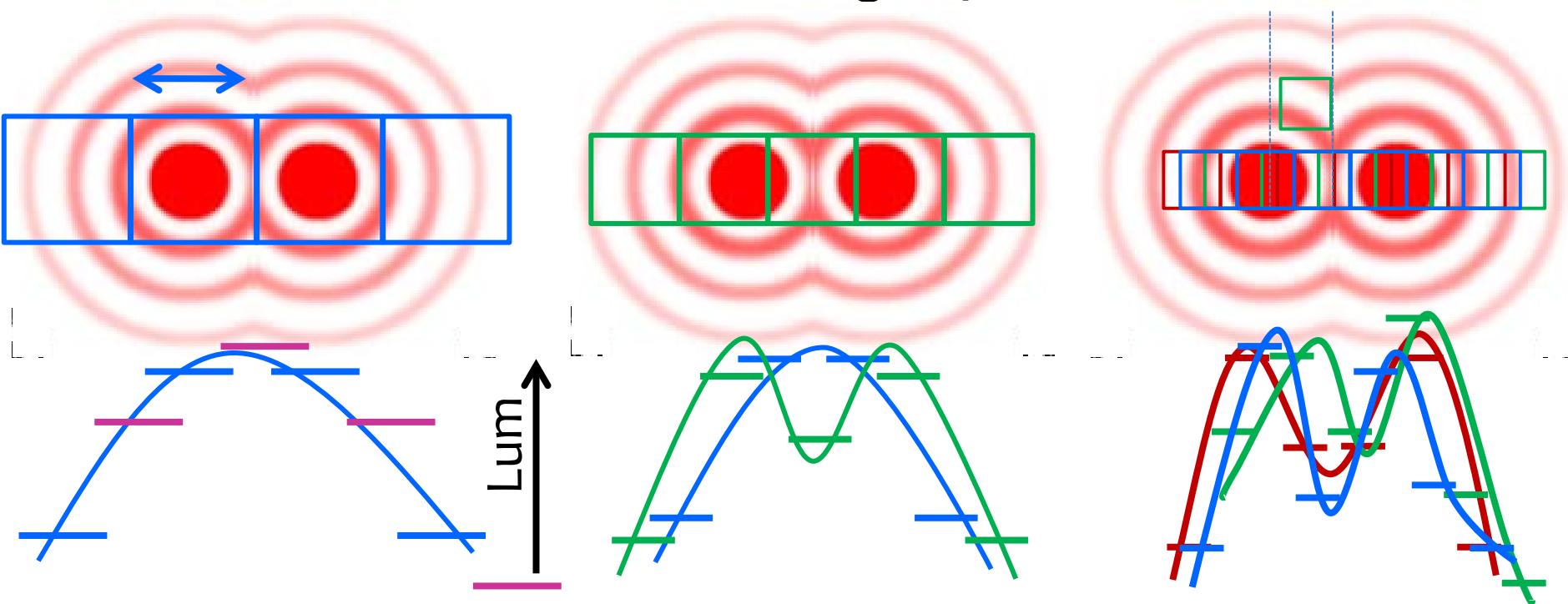


Caractéristiques d'une caméra

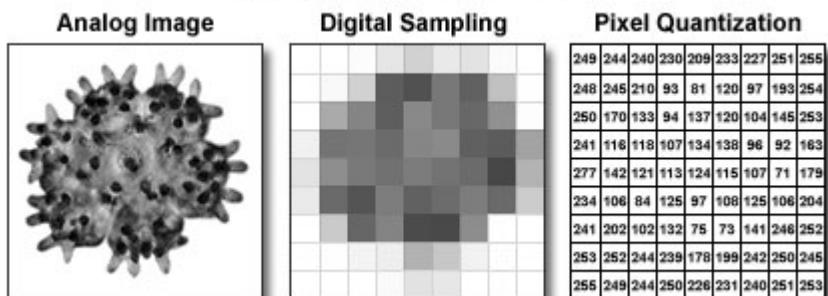
- La résolution spatiale
- La résolution temporelle : Sensibilité, architecture du transfert, binning
- Le rendement quantique ($q < 1$) : lié aux matériaux, la technique et à la λ
- Les bruits de fond
- La dynamique
- La linéarité : importante pour les études quantitatives

Résolution et acquisition d'image

Echantillonnage spatial



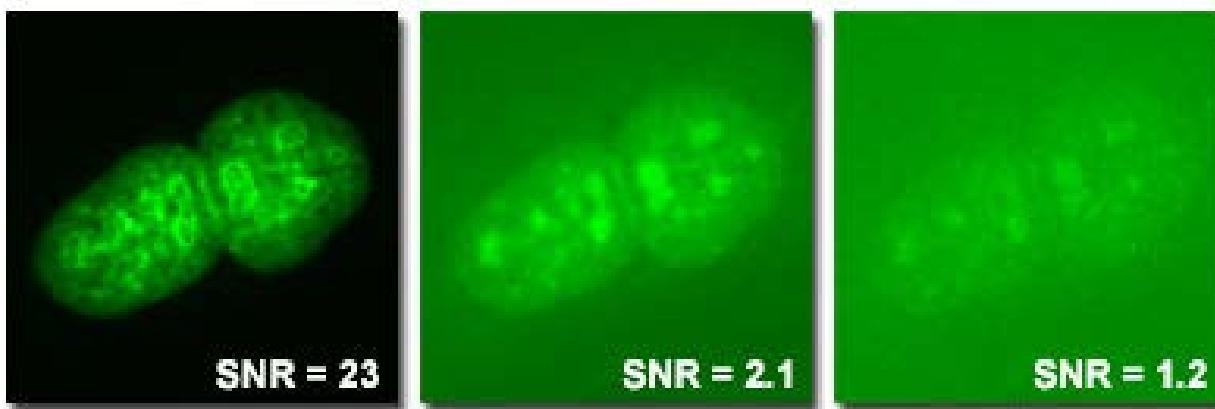
Taille du pixel optimal (Nyquist-Shannon) = résolution/2,3 : Cela permet d'avoir un minima entre les maxima quelque soit la position des pixels (cadre de lecture).



Exemple pour un 100X 1.4 d'ON à 488 nm
 Résolution 212 nm
 taille du pixel optimum \approx 92 nm
 Taille réelle 6.45 μm /100 donc 64.5 nm

Résolution et acquisition d'image

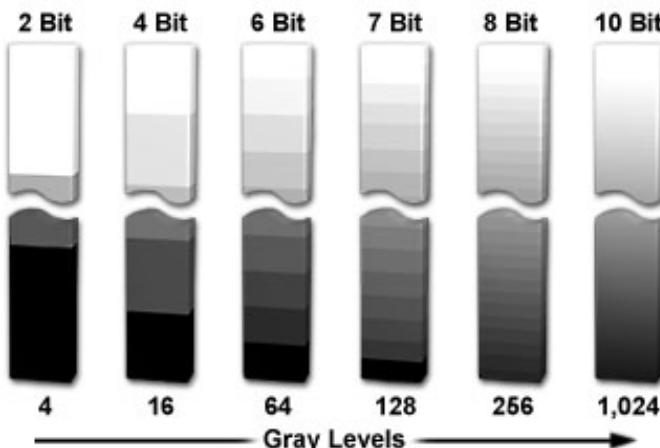
Ratio S/B et Dynamique



Bruits de fond :

- Bruit de Photon: dû aux caractéristiques de la lumière incidente
- Bruit d'obscurité : génération d' e^- par effet thermique
- Bruit de lecture : généré par l'électronique de la caméra

Bit Depth and Gray Levels in Digital Images



La dynamique :

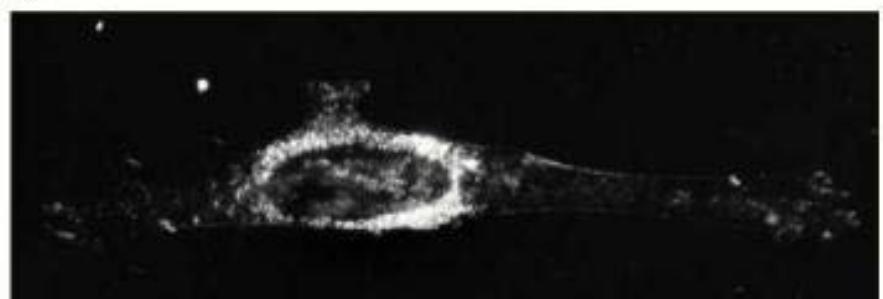
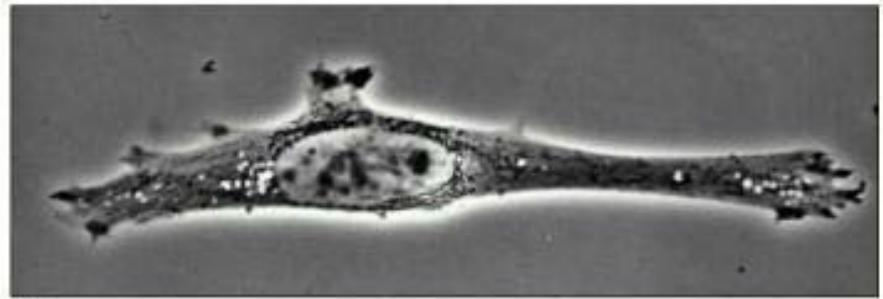
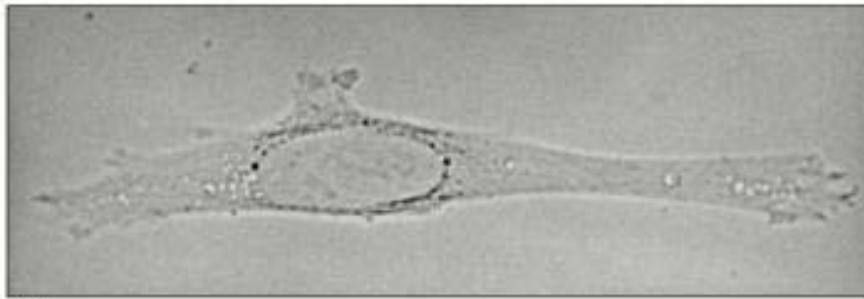
liée au bruit de fond et à la capacité des puits de potentiels (binning)
(ex : $5 \cdot 10^5 e^-/10 e^-$ soit 5000:1 adaptée à une image 12 bits 4096 niveaux de gris)

Ce qui vous attend

- ✓ Généralités
- ✓ Illumination
- ✓ Détection
- ✓ Aberrations et détérioration de l'image
- ✓ Résolution et acquisition d'image
- Amélioration des contrastes

Autres mode d'Illumination

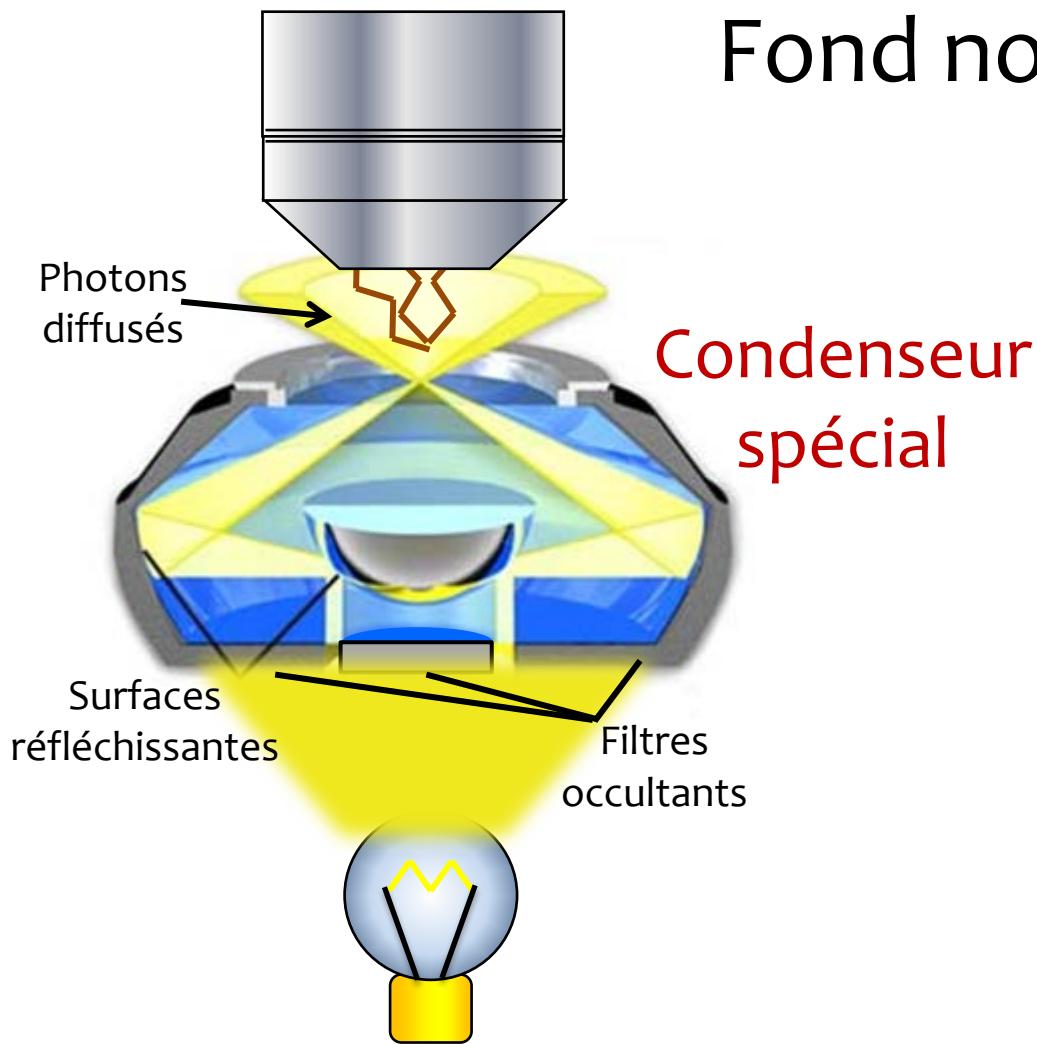
- Fond noir
- Contraste de phase
- Contraste Interférentiel Différentiel (DIC)



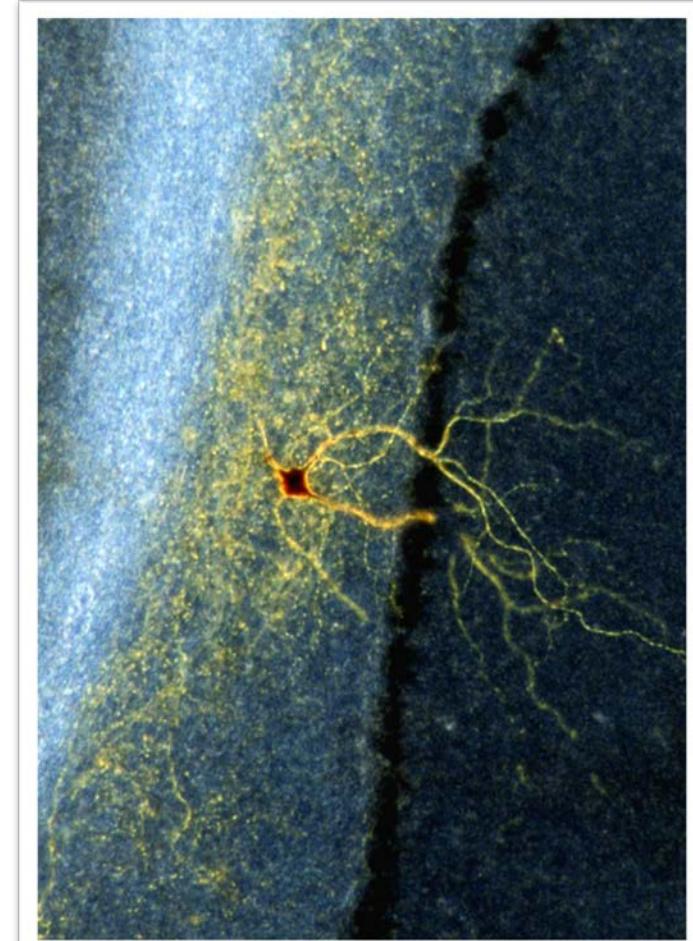
50 µm

Autres mode d'illumination

Fond noir



Seul les photons diffractés/diffusés par l'échantillon sont transmis et captés par l'objectif du fait de l'illumination structurée.



Combinaison d'images en fond noir et d'illumination polarisée
Avec l'autorisation du Dr Steve Edgley
<http://www.pdn.cam.ac.uk/groups/edgleylab/index.html>

Autres mode d'Illumination

Contraste de phase

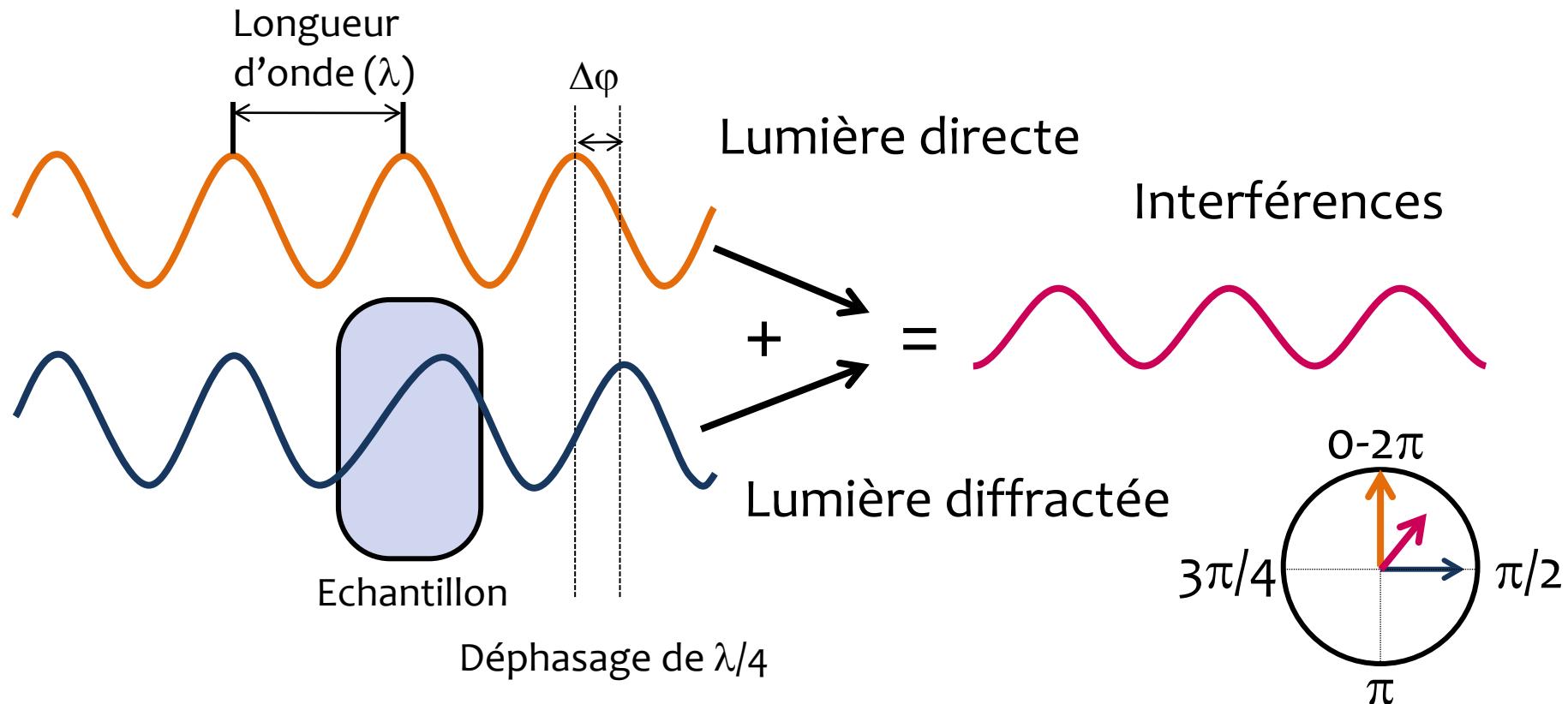


Fritz Zernicke,
Prix Nobel (1953).
Inventeur du
contraste de phase

- L'œil humain est uniquement capable de voir des différences d'intensité (amplitude) ou de couleur (λ).
- Les objets biologiques microscopiques sont souvent très transparents et donc peu contrastés car le flux lumineux transmis par les différentes parties des cellules est similaire.
- Par contre, l'indice optique des différents compartiments cellulaires est très variable ce qui induit des différences de vitesse des ondes donc des retards de phase des ondes.
- But : transformer des différences de phase en différences d'intensité

Autres mode d'Illumination

Contraste de phase

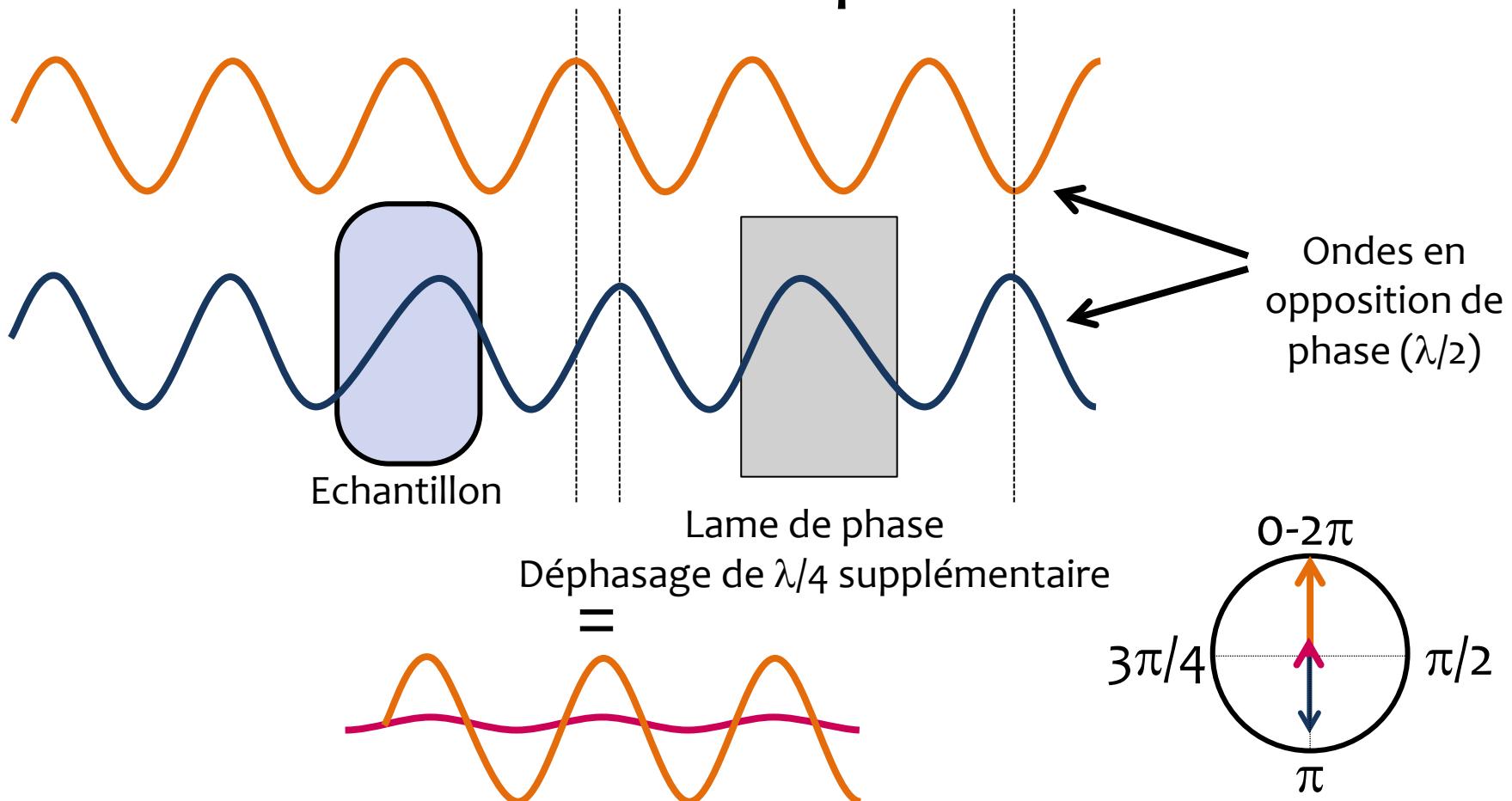


En moyenne un échantillon biologique entraîne un déphasage de $\lambda/4$ ($\pi/2$ en cosinus).

les interférences sont trop faibles pour induire un contraste décelable.

Autres mode d'Illumination

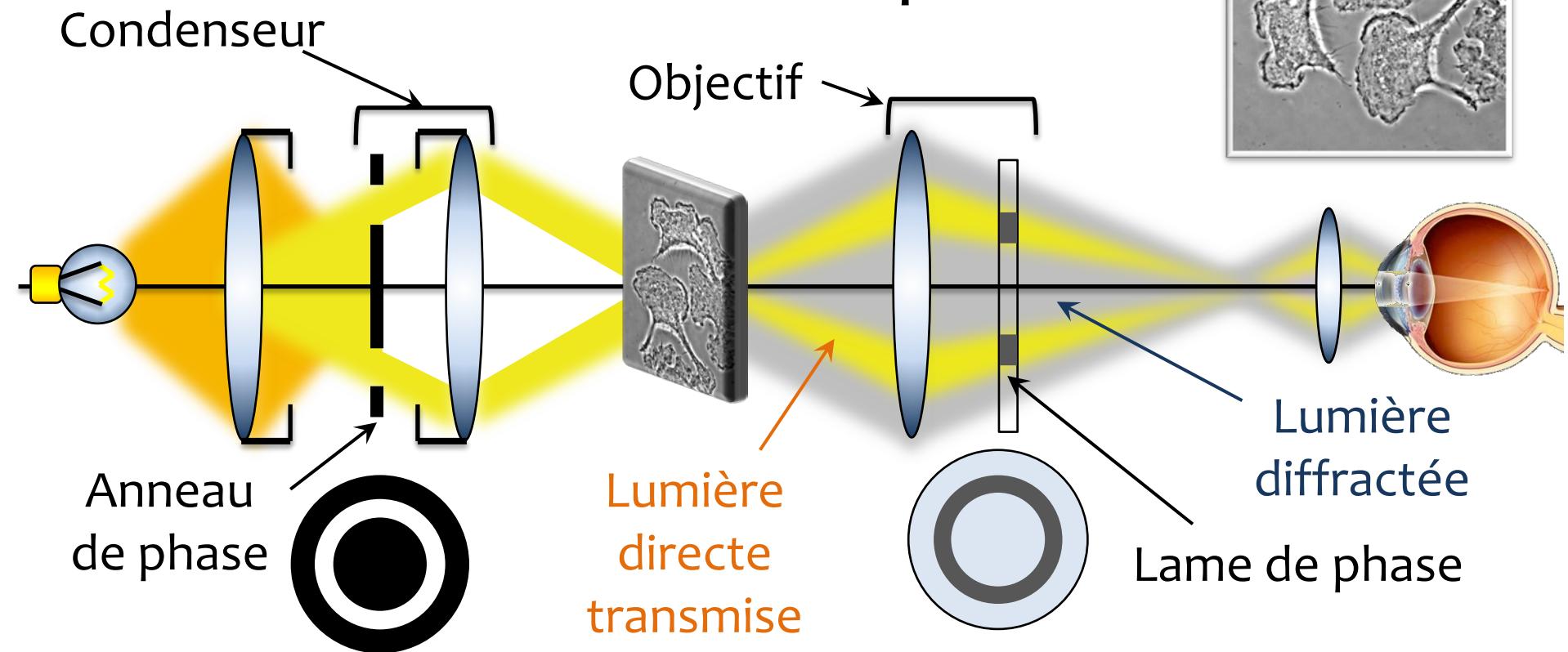
Contraste de phase



Pour obtenir un contraste maximal, il faut créer l'interférence en déphasant la lumière diffractée uniquement de $\lambda/2$.

Autres mode d'Illumination

Contraste de phase

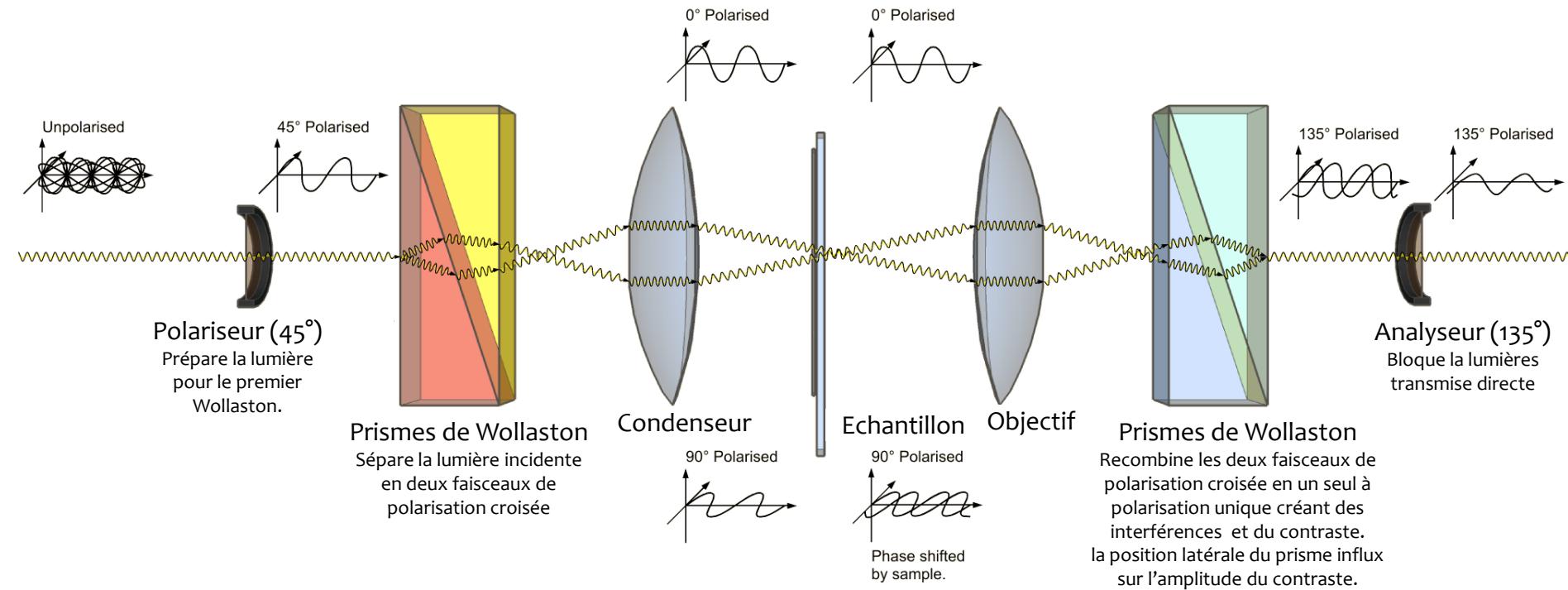


La lumière directe transmise (annulaire - jaune) est fortement atténuée par le cercle de la lame de phase et va interférer avec la lumière diffractée (grise sur le schéma) par l'échantillon pour former un contraste en noir et blanc (interférences destructive ($+\lambda/4$) ou constructive ($-\lambda/4$)).
 On obtient donc un déphasage différentiel de $\lambda/2$.

Autres mode d'Illumination

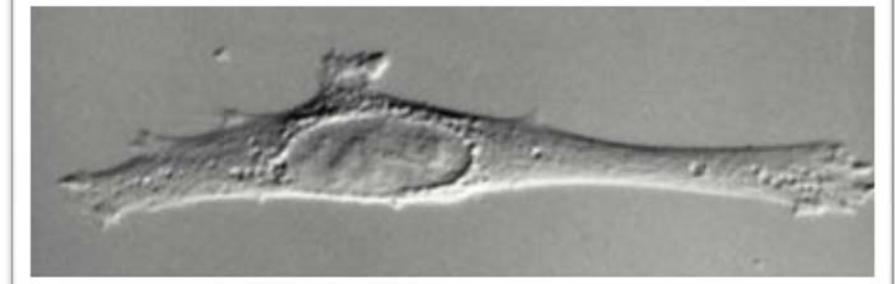
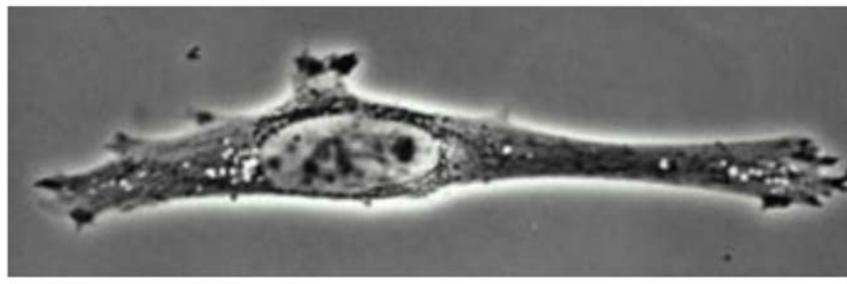
Contraste interférentiel différentiel :DIC (Nomarski)

Les prismes de Wollaston séparent la lumière en deux faisceaux de polarisations perpendiculaires (biréfringence). Lorsqu'ils sont recombinés par le deuxième Wollaston, il y a des interférences entre les deux rayons en fonction de la différence de leurs chemins optiques. Il en résulte une lumière grise si le trajet optique a été le même, et blanche ou noire s'il a été différent, donnant l'illusion d'un éclairage rasant. Ce type de contraste donne un effet de relief sur des préparations épaisses (idéal pour le patch-clamp).



Autres mode d'Illumination

Comparaison contraste de phase /DIC



Phase

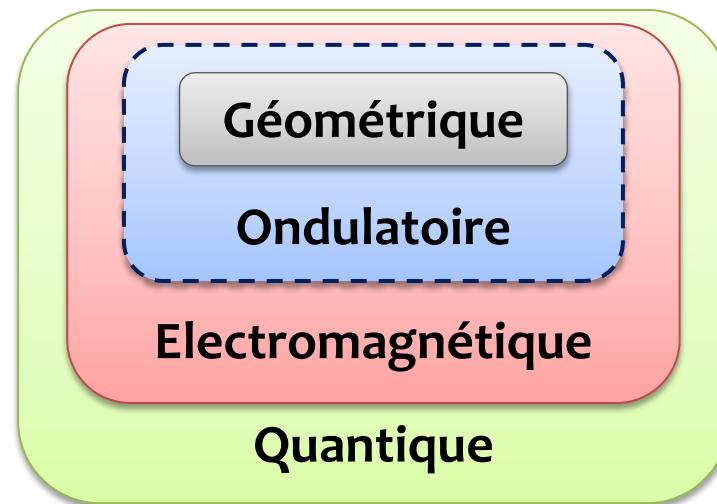
- Compatible avec l'utilisation de boite plastique
- Sensible au chemin optique parcouru
- Halos (contraste noir/blanc) autour des objets
- Insensible à l'orientation des structures (contraste "isotrope")

DIC

- Limité au verre
- Sensible à des variations d'indice
 - Pas de halos autour des objets
- Utilisation optimale de l'ouverture numérique donc meilleure résolution
 - Sensible à l'orientation des structures (effet pseudo-ombrage)
- Plus cher

Fin du premier round

Merci d'avoir tenu jusque là,
Prochaine étape : la microscopie de fluorescence



Commentaires, remarques, améliorations :
francois.michel@inserm.fr

Sources et Ressources

WEB divers

- Molecular expressions <http://micro.magnet.fsu.edu/index.html>
 - Microscopy U (Nikon) : <http://www.microscopyu.com>
- Microscopy resource system (Olympus): <http://www.olympusmicro.com/index.html>
- A whole world of microscopy knowledge (Zeiss): <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/index.html>
 - Wikipédia

Plate-formes d'imagerie

- PICSL <http://www.picsl.univ-mrs.fr/> : MICROSCOPIE OPTIQUE (PDF indisponible)
- BIC <http://www.bic.u-bordeaux2.fr/> : Microscopie à épi-fluorescence et microscopie confocale (PDF)
- Membres du [GDR2588](#) CNRS (microscopie fonctionnelle des systèmes vivants) et
du [RTfmf](#) (Réseau technique de microscopie de fluorescence multidimensionnelle).

Cours

- Arnaud Sergé (université de la Méditerranée – Marseille II)
 - Yves Husson (Université Joseph Fourier – Grenoble)
 - Serge Monneret (Institut Fresnel, Marseille)
- Maxime Dahan (Laboratoire Kastler Brossel, ENS)
- François Waharte (institut Curie, UMR144)

Handbooks

- Fondamentaux d'optique et d'imagerie numérique à l'usage des microscopistes (C Cibert, ed. Cépaduès)
 - Handbook of biological confocal microscopy, third edition (JB. Pawley ed. Springer)
 - Fundamentals of light microscopy and electronic imaging (DB. Murphy, ed Wiley-liss)

